



**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
Dipartimenti di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Settore Scientifico Disciplinare CHEM-05/A

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI SISTEMI NANOSTRUTTURATI PER APPLICAZIONI IN TERANOSTICA

**IL DOTTORE
FEDERICA LEONE**

**IL COORDINATORE
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI**

**IL TUTOR
PROF.SSA SERENA RIELA**

**CO TUTOR
DOTT.SSA MARINA MASSARO**

**CICLO XXXVIII
2025**

*A chi c'è sempre stato.
A chi ha camminato accanto a me.
A chi se ne è andato.
A chi ha creduto in me, fin dall'inizio.
E fino alla fine.
E a chi, più di chiunque altro, avrebbe voluto esserci.*

Sommario

1. Capitolo 1.....	3
1.1. Teranostica.....	3
1.2. Terapie chemo- e fotodinamiche.....	8
1.3. Nanomateriali in teranostica.....	13
1.4. Argille minerali in ambito medico.....	15
1.5. Halloysite.....	18
1.5.1. Biocompatibilità e biodegradabilità dell'halloysite.....	19
1.5.2. Funzionalizzazione degli HNT.....	21
1.5.3. Funzionalizzazioni supramolecolari.....	21
1.5.4. HNT funzionalizzati: modifiche covalenti sulla superficie esterna.....	23
2. Capitolo 2.....	26
2.1. Sistema a base di halloysite e protoporfirina IX.....	27
2.1.1. Caratterizzazione dei sistemi HNT-1 e HNT-2.....	30
2.1.2. Interazione con cationi metallici.....	36
2.1.3. Sintesi e caratterizzazione del sistema halloysite-metallo porfirina.....	38
2.1.4. Studio dell'attività fotosensibilizzante di HNT-2 e HNT-4.....	41
2.1.5. Film nanocompositi a base di chitosano e halloysite.....	44
2.1.6. Ancoraggio di biotina ai nanomateriali HNT-2 e HNT-4.....	48
2.2. Sistema a base di halloysite e oligo(fenilene etinileni).....	52
2.2.1. Caratterizzazione del sistema HNT-9.....	54
2.2.2. Studio dell'attività fotosensibilizzante di HNT-9.....	57
2.2.3. Caricamento della vancomicina per azione antibatterica.....	58
2.3. Sistema a base di halloysite e <i>molecular switch</i>	63
2.3.1. Ancoraggio covalente della sonda alocromica mediante approccio <i>Top Down</i>	64
2.3.2. Ancoraggio covalente della sonda alocromica mediante approccio <i>Bottom up</i>	71
2.3.3. Caratterizzazione del sistema HNT-17.....	73
2.3.4. Sintesi e caratterizzazione del nanomateriale HNT-17 caricato con nanoparticelle di Fe ₃ O ₄	78
2.3.5. Sintesi e caratterizzazione di un sistema a base di hectorite e sonda alocromica.....	85

2.4. Sistema a base di halloysite e naftalendiimmide	89
2.4.1. Caratterizzazione e studio delle proprietà fotodinamiche di HNT-27	91
2.4.2. Caricamento PNA sulla superficie esterna di HNT-27	92
2.4.3. Sistemi a base di halloysite e NDI asimmetrici.....	97
2.5. Sistemi a base di halloysite e BODIPY.....	100
2.5.1. Sintesi di una sonda a base BODIPY per il <i>sensing</i> del glutatione.....	102
2.5.2. Sintesi e caratterizzazione di un nanomateriale a base di halloysite e 34.....	104
2.5.3. Studio di <i>sensing</i> del glutatione	108
2.5.4. Sintesi di una sonda a base BODIPY per la terapia fotodinamica	110
2.5.5. Sintesi e caratterizzazione di un nanomateriale a base di halloysite e 39.....	112
2.5.6. Studio delle proprietà fotosensibilizzanti di 39	116
3. Conclusioni	119
4. Parte sperimentale	121
4.1. Materiali	121
4.2. Metodi	121
4.3. Sintesi	123
4.4. Titolazione di HNT-2 con ioni metallici	135
4.5. Studi dell'attività fotodinamica	135
4.6. Studi <i>in vitro</i>	137
4.7. Preparazione dei film di chitosano	138
4.8. Cinetiche di rilascio	138
4.9. Studio delle proprietà alocromatiche	139
4.10. Determinazione della percentuale di caricamento di Fe ₃ O ₄ NPs con il metodo del tiocianato	139
4.11. Studio dell'attività chemodinamica	140
4.12. Studio di <i>sensing</i> del glutatione	141
5. Curriculum studiorum	142
6. Bibliografia	146
7. Appendice 1	160
8. Appendice 2	162
9. Abbreviazioni	163
10. Ringraziamenti.....	165

1. Capitolo 1

1.1. Teranostica

Attualmente alcune malattie che sono la principale causa di mortalità necessitano fortemente di una diagnosi e un trattamento rapidi in tempi brevi. In tal senso, la teranostica si sta affermando come un approccio rivoluzionario per la lotta contro diverse patologie. Il termine “teranostica” si riferisce ad un approccio medico che combina la diagnosi e il trattamento di una malattia utilizzando agenti specifici che possono sia individuare che trattare le cellule malate (Figura 1).¹ Essa rappresenta un significativo passo in avanti nella medicina di precisione, offrendo speranza ai pazienti che potrebbero aver esaurito le opzioni terapeutiche tradizionali.

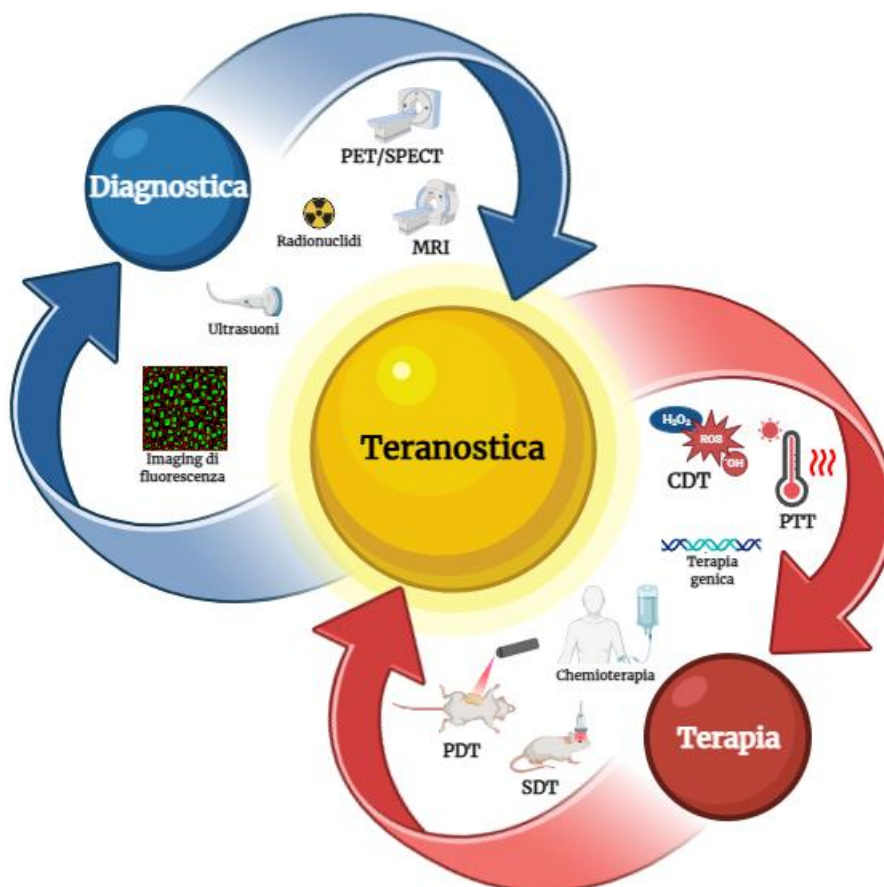


Figura 1. Applicazioni della teranostica

I recenti progressi hanno ampliato notevolmente il potenziale della teranostica, combinando diversi approcci come: chimica, fisica nucleare avanzata e tecnologie di diagnostica all'avanguardia per sviluppare nuove tecniche di *imaging* e opzioni terapeutiche precedentemente ritenute impossibili. L'uso di un approccio di tipo teranostico per la cura di una patologia offre diversi vantaggi, tra questi si può sicuramente annoverare la precisione terapeutica. Il concetto di teranostica implica la diagnosi e il trattamento delle cellule

utilizzando la stessa molecola o sistema, garantendo così un approccio citotossico mirato alle sole cellule malate sottoposte a *imaging*, risparmiando i tessuti sani.² Un altro vantaggio della teranostica è dato dalla possibilità di monitorare in tempo reale la risposta al trattamento che si sta somministrando ad un paziente tramite *imaging* non invasivo. Infine, un altro beneficio di questo tipo di approccio è la possibilità di adattare il trattamento in modo specifico alle esigenze di ciascun paziente, in modo da aumentare l'efficacia del trattamento e ridurre gli effetti collaterali.

La teranostica, quindi, consente di sfruttare differenti tecniche diagnostiche, tra cui la risonanza magnetica, la tomografia a emissione di positroni e la tomografia computerizzata. Al contrario di queste tecniche diagnostiche tradizionali, l'*imaging* a fluorescenza svolge un ruolo indispensabile per l'identificazione di diverse patologie grazie ai suoi numerosi vantaggi. Questa tecnica è altamente sensibile, poco invasiva, più sicura, utilizza strumenti prontamente disponibili, provoca pochi danni ai campioni biologici e non si ha la necessità di campionare *in vivo*. Essa consente di effettuare misure in tempo reale ad alta sensibilità e con alta risoluzione spazio-temporale.³ Tutto ciò ha reso le sonde fluorescenti la “*main force*” delle tecniche di *bioimaging*, le quali emettono fluorescenza nella regione ultravioletto-visibile-vicino infrarosso (UV-*vis*-NIR) e le loro proprietà fluorescenti sono sensibili alla natura dell'ambiente in cui si trovano. Queste sonde devono essere: biocompatibili, non immunogeniche, devono garantire una citotossicità sufficientemente bassa e una buona permeabilità cellulare.⁴

Un altro vantaggio da tenere in considerazione è che il segnale di fluorescenza delle sonde può essere modulato, in modo che si possano usare non solo composti la cui intensità di fluorescenza è data dall'accumulo in una determinata regione del nostro organismo, ma anche sonde la cui fluorescenza è attivabile. Per questo motivo, negli anni si sono sviluppate sonde fluorescenti capaci di rilevare una gamma sempre crescente di molecole bioattive correlate allo sviluppo di una malattia, ottenendo in questo modo, i cosiddetti “fluorofori attivabili”. In questo modo, si sono sviluppati i cosiddetti *molecular switch* o “interruttori molecolari”, i quali sono molecole che possono essere manipolate per passare da uno stato all'altro quando sottoposte a stimoli di diverso tipo.^{5, 6} Mentre i convenzionali fluorofori emettono luce solo quando irradiati con una radiazione di opportuna lunghezza d'onda di eccitazione, i fluorofori attivabili, invece, emettono fluorescenza solo dopo l'applicazione di uno stimolo esterno antecedente all'eccitazione. Quindi, solo il prodotto ottenuto in seguito ad una trasformazione chimica o fotochimica può essere eccitato e può emettere fluorescenza. Questi “interruttori” permettono di “accendere” la fluorescenza in una regione

definita dello spazio o in un preciso intervallo di tempo. Il controllo spazio-temporale sull'emissione di fluorescenza permette di monitorare eventi dinamici in diversi campioni con l'acquisizione di immagini di fluorescenza che sarebbero impossibili da ottenere con fluorofori convenzionali.⁷

Tramite questo approccio, risulta possibile rilevare ioni inorganici, DNA, RNA, amminoacidi, peptidi, anticorpi, macromolecole, ecc. Tra i peptidi, un ruolo fondamentale lo assume il glutathione (GSH), il quale è una delle biomolecole più importanti nei sistemi biologici.⁸ Esso partecipa a funzioni fisiologiche fondamentali, quali il mantenimento dell'equilibrio redox cellulare, la regolazione del metabolismo e la rimozione delle specie radicaliche.⁹ Il *sensing* del glutathione potrebbe risultare molto utile nell'individuazione di diverse patologie, tra cui cancro, Alzheimer e malattie cardiache, dal momento che queste sono legate a livelli anomali di GSH nelle cellule.¹⁰ In questo modo diventa possibile distinguere le cellule malate da quelle sane, dal momento che le prime presentano una concentrazione di glutathione notevolmente maggiore rispetto alle ultime.¹¹ Vi sono diversi sistemi che vengono usati per la rilevazione del GSH tramite *imaging* molecolare basato sulla fluorescenza, tra questi vi sono alcuni derivati di 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) (Figura 2). Ad esempio, derivati del BODIPY con dei sostituenti cloro in posizione 3 e 5, in seguito ad una reazione di sostituzione nucleofila di quest'ultimi e il GSH danno origine ad un derivato le cui caratteristiche di fotoluminescenza variano rispetto al BODIPY. Infatti, si osserva una diminuzione dell'intensità di fluorescenza della sonda e la consecutiva comparsa di nuovi picchi di emissione associati alla formazione delle specie mono-sostituite e di-sostituite (Figura 2).¹²

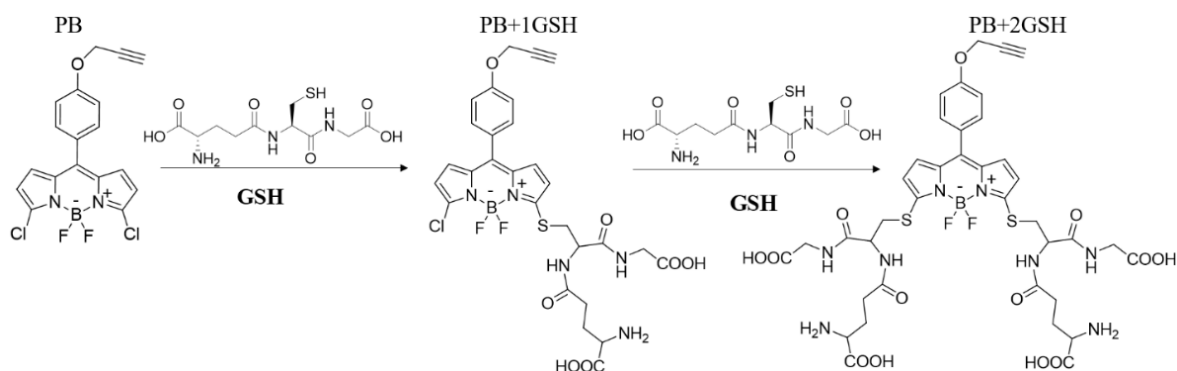


Figura 2. Reazione tra un derivato BODIPY e il glutathione per il *sensing*¹²

La possibilità di modificare lo *scaffold* di queste molecole ha permesso di migliorarne la versatilità, consentendo di personalizzarne le proprietà in modo da ottenere anche dei derivati in cui il glutathione può legarsi in modo reversibile alla sonda, consentendo così di

rilevare costantemente le variazioni della sua concentrazione e di effettuare un monitoraggio in tempo reale.¹³

L'uso di molecole la cui fluorescenza è attivabile in seguito a stimoli esterni, risulta vantaggioso anche per il monitoraggio dei cambiamenti di alcuni parametri cellulari come il pH intracellulare o il potenziale della membrana mitocondriale.¹⁴ Lo studio della variazione del pH cellulare può essere molto utile in ambito medico, perché permette di capire meglio i processi che regolano le funzioni delle cellule e di ottenere informazioni sulla struttura dei loro componenti interni.¹⁵ Il pH svolge un ruolo significativo in molteplici processi biologici, come la proliferazione cellulare, l'endocitosi e il trasporto di ioni. In condizioni fisiologiche normali, il pH citosolico e quello extracellulare sono rispettivamente pari a circa 7.2 e 7.4. Un pH anomalo nei compartimenti intracellulari porta a un'alterazione dell'omeostasi del pH nell'intera cellula, causando danni come la generazione di radicali liberi, l'interruzione della contrattilità della membrana, apoptosi cellulare e necrosi. Tutte queste alterazioni potrebbero portare allo sviluppo di diverse patologie quali il cancro o il morbo di Alzheimer. In particolare, poiché il pH nel microambiente tumorale è stato trovato essere più acido rispetto a quello dei tessuti sani, questa evidenza può essere sfruttata per la somministrazione di farmaci specifici o per sviluppare tecniche diagnostiche per il rivelamento precoce di tumori.¹⁶

Negli ultimi anni sono state sviluppate numerose sonde fluorescenti con caratteristiche e vantaggi diversi per il rilevamento e l'*imaging* del pH.¹⁷ Da un punto di vista chimico questo può essere effettuato attraverso la sintesi di opportune molecole, capaci di emettere fluorescenza in risposta a variazioni di pH dell'ambiente circostante. In questo contesto, il gruppo del Prof. Raymo ha sviluppato una serie di molecole basate su degli anelli eterociclici 2H,4H-benzo[1,3]oxazina e 2H,3H-indolo con caratteristiche alocromiche e fotocromiche (Figura 3).

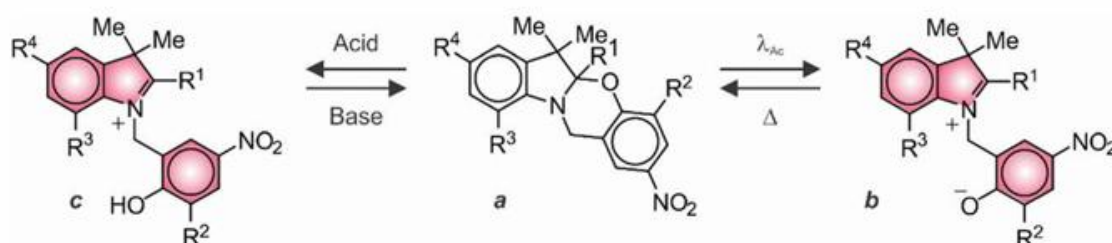


Figura 3. Trasformazione fotocromica ($a \rightarrow b$) e alocromica ($a \rightarrow c$) dell'anillo di oxazina⁷

Tale classe di molecole può infatti generare cromofori in dipendenza di una irradiazione ad un'opportuna lunghezza d'onda o variazioni di pH, in seguito ad apertura dell'anello ossazinico così come mostrato in Figura 3. Il legame C-O dell'oxazina, alla giunzione dei

due eterocicli, può essere scisso tramite radiazione di opportuna lunghezza d'onda dove assorbe il cromoforo 4-nitrofenossi. In questo modo si genera una specie zwitterionica in pochi picosencondi (struttura b in Figura 3), la quale si può riconvertire spontaneamente all'isomero originale in tempi molto brevi. Ciò identifica il carattere fotocromico del costruito molecolare. Questo anello però può anche assumere un comportamento alocromico: esso, infatti, si può aprire tramite acidificazione, portando così alla formazione di una forma protonata (struttura c in Figura 3) dell'isomero zwitterionico. L'introduzione di una base converte il 4-nitrofenolo nell'anione 4-nitrofenolato della specie zwitterionica, in modo da riformare l'oxazina iniziale. Un ruolo molto importante lo ha il gruppo nitro del frammento fenossi della specie chiusa, il quale controlla l'esito della trasformazione fotochimica: il suo spostamento da para a meta, rispetto all'atomo di ossigeno, trasforma il passaggio fotoindotto da reversibile a irreversibile. L'apertura e la chiusura dell'anello di oxazina possono essere sfruttate per controllare le proprietà fotofisiche di un qualsiasi cromoforo (R^1 in Figura 3) connesso al centro chirale della forma chiusa della molecola. Infatti, allo stato fondamentale, questo atomo di carbonio sp^3 isola elettronicamente il gruppo R^1 dall'eterociclo indolico. L'apertura dell'anello oxazinico porta ad un cambiamento di ibridazione del centro chirale da sp^3 a sp^2 e, solo allora, porta R^1 in coniugazione con l'eterociclo adiacente. Tale trasformazione strutturale sposta in modo batocromico l'assorbimento di R^1 , il quale può essere eccitato selettivamente con un'opportuna lunghezza d'onda di eccitazione per attivare la fluorescenza. La specie attiva può spontaneamente ritornare nella forma iniziale su una scala dei tempi nei microsecondi, spegnendo in questo modo la fluorescenza. Vi sono diversi tipi di cromofori fluorescenti R^1 , che possono essere legati anche attraverso un unico *step* sintetico all'oxazina; tra questi vi sono le cumarine (Figura 4).

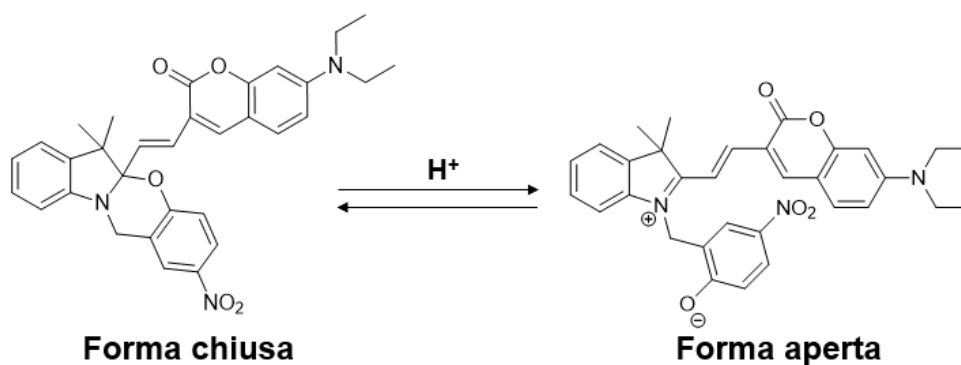


Figura 4. Apertura dell'anello di oxazina tramite pH

Nella forma aperta dell'anello oxazinico, il cromoforo cumarinico può estendere la delocalizzazione elettronica sull'indolo auxocromico. Ciò che si riscontra è che le lunghezze

d'onda di assorbimento ed emissione sono notevolmente diverse tra la forma aperta e quella chiusa dell'anello oxazinico, in particolare le prime sono significativamente più lunghe. Questo comportamento consente l'eccitazione selettiva delle due forme a lunghezze d'onda distinte e la raccolta delle loro emissioni in diverse finestre spettrali. Inoltre, le quantità delle due specie in equilibrio e, quindi, le relative intensità di fluorescenza cambiano con il pH. Un vantaggio significativo di questa famiglia di “interruttori” molecolari, rispetto ad altri composti fluorescenti, è la loro accessibilità sintetica e versatilità. A partire da precursori facilmente reperibili, sono necessari pochi passaggi sintetici per assemblare questi costrutti, offrendo così l'opportunità di prepararne quantità relativamente elevate.

Purtroppo l'utilizzo di tali sonde, seppur promettente, presenta degli svantaggi legati prevalentemente alla loro poca solubilità in ambiente fisiologico.

Per ovviare a tale problematica, sonde alocromiche del tipo discusso sopra, sono state ad esempio incorporate supramolecolarmente in polimeri anfifilici o legati covalentemente ad essi al fine di avere dei sistemi con aumentata solubilità in acqua.¹⁸

Similmente, derivati del BODIPY per il riconoscimento del GSH sono stati legati covalentemente, attraverso una reazione di *click chemistry*, sulla superficie di nanoparticelle di ossido di silicio, precedentemente modificate con delle catene di PEG per aumentarne ulteriormente la dispersione in ambiente acquoso. Il nanomateriale così ottenuto ha mostrato interessanti proprietà nel riconoscimento del GSH intracellulare, stabilità e biocompatibilità, che lo rendono promettente per applicazioni a lungo termine.

Da questi pochi esempi, risulta chiaro che l'utilizzo di strategie sintetiche basate su modifiche strutturali di molecole o l'uso di nanomateriali per la veicolazione di sonde fluorescenti, volte alla veicolazione delle stesse in ambiente fisiologico, rappresentano dei punti chiave per lo sviluppo di sistemi teranostici.

1.2. Terapie chemo- e fotodinamiche

I sistemi nanostrutturati permettono di integrare le diverse tecniche diagnostiche con strategie terapeutiche mirate, come la terapia fotodinamica (PDT) e la terapia chemodinamica (CDT). Quest'ultima è una terapia emergente per la cura dei tumori; che rispetto ai metodi di trattamento tradizionali, presenta numerosi vantaggi come: maggiore specificità e selettività verso le cellule tumorali, minore tossicità sistemica e minori effetti collaterali. La terapia chemodinamica sfrutta le reazioni Fenton o simil Fenton, innescandole direttamente nel microambiente tumorale (TME), in modo da portare alla morte delle cellule cancerose tramite la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).¹⁹ Tra le diverse

specie reattive dell'ossigeno, i radicali ossidrilici risultano particolarmente dannosi per le cellule tumorali, poiché possiedono una reattività superiore nei confronti dei componenti cellulari. Le reazioni di Fenton o *Fenton-like* sono in grado di generare un'ingente quantità di radicali $\cdot\text{OH}$ attraverso la decomposizione di H_2O_2 endogeno nelle cellule tumorali.²⁰ Tutto ciò porta allo stress ossidativo della cellula tumorale; biomolecole come proteine, lipidi e acidi nucleici in esse presenti vengono distrutte, inducendo così la morte delle cellule cancerose (Figura 5).²¹

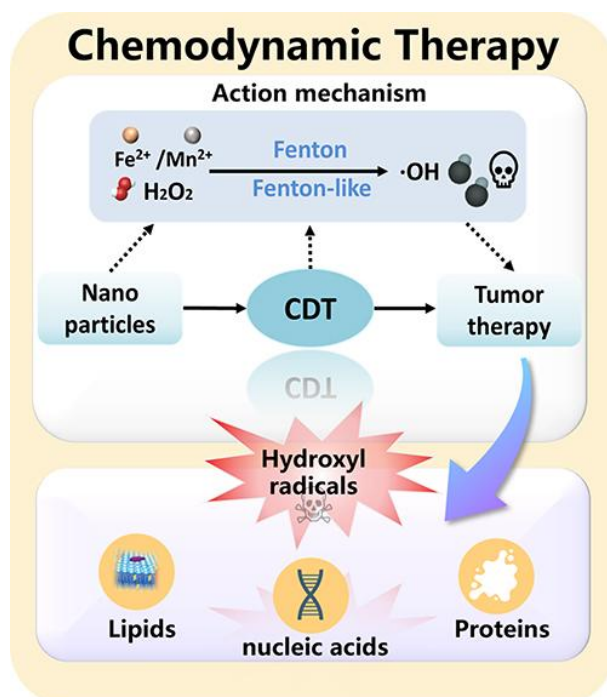


Figura 5. Rappresentazione grafica del meccanismo catalitico della CDT per il trattamento del cancro²²

Da un punto di vista chimico, l'attività chemodinamica di un determinato sistema, viene attivata attraverso opportuni catalizzatori. La scelta del catalizzatore rappresenta un aspetto cruciale per questo tipo di terapia, poiché esso deve essere capace di innescare reazioni di Fenton o *Fenton-like*, avere elevata efficienza catalitica e buona biocompatibilità. Generalmente, si utilizzano ioni di metalli di transizione (come Fe, Co, Ni, Cu e Mn), i quali possono esistere in più stati di ossidazione in modo da poter partecipare facilmente alle reazioni di ossidoriduzione. Tra questi i catalizzatori a base di Fe come, ad esempio nanoparticelle ferromagnetiche ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$), hanno riscontrato una notevole attenzione per le applicazioni biomediche grazie alla loro bassa tossicità, al superparamagnetismo e al basso costo.^{23, 24}

Anche la terapia fotodinamica è una terapia clinica emergente relativamente non invasiva, sempre più utilizzata per il trattamento dei tessuti tumorali, in particolare per quei tipi di cancro che consentono l'irraggiamento luminoso, come i tumori della pelle, ma può essere

usata anche per altri tipi di tumori, purché siano localizzati e non penetrino troppo in profondità nel tessuto.²⁵ La PDT è una terapia “ternaria”, in quanto richiede tre componenti che singolarmente non sono tossici: una molecola fotosensibile chiamata “fotosensibilizzatore” (PS), la luce e l’ossigeno molecolare. In particolare, il PS deve essere in grado di assorbire la luce, in modo da indurre danni ai tessuti in presenza di O_2 . Ciò porta alla generazione di ROS e di conseguenza citotossicità e morte delle cellule cancerogene per apoptosi o necrosi (Figura 6).

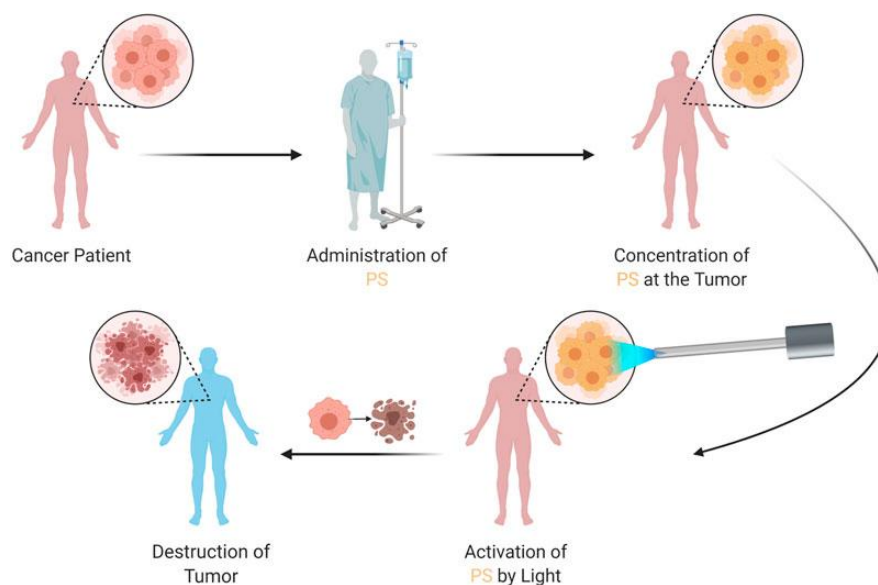


Figura 6. Applicazione terapeutica della PDT. Al paziente viene somministrato il fotosensibilizzatore che si concentra sul tumore. Il PS viene quindi attivato da una luce specifica, si generano specie reattive dell'ossigeno, con conseguente distruzione del tumore²⁶

Oltre a uccidere direttamente le cellule, la PDT può anche danneggiare i vasi sanguigni impedendo alle cellule malate di ricevere i nutrienti necessari per la loro crescita. Dal punto di vista terapeutico, l'intervallo di lunghezze d'onda utili per l'attivazione del PS è fra 600 e 800 nm perché questa radiazione è assorbita meno dai cromofori endogeni presenti nell'organismo. Il fotosensibilizzatore subisce un *intercrossing system* dallo stato eccitato di singoletto allo stato eccitato di tripletto. Quest'ultimo può dare origine a due diversi tipi di meccanismi. Nel meccanismo di tipo I, il PS può interagire direttamente con un substrato biologico tramite trasferimento di un elettrone o di un protone, portando alla formazione dell'anione superossido, del perossido di idrogeno e del radicale idrossile. Al contrario, nel meccanismo di tipo II, il fotosensibilizzatore può trasferire energia a molecole di ossigeno vicine che sono nel loro stato fondamentale di tripletto, $^3O_2$, eccitandole allo stato di singoletto, $^1O_2$. Quest'ultimo è una forma altamente reattiva di ossigeno che reagisce con molte biomolecole, tra cui lipidi, proteine e acidi nucleici. Dal momento che i tempi di vita dell' $^1O_2$ e dei ROS sono di circa 10-300 ns, queste specie possono diffondere nelle cellule

solo per meno di 20 nm; di conseguenza solo le molecole a loro vicine sono direttamente danneggiate dalla PDT.²⁷ Rispetto ai convenzionali trattamenti anticancro, come la chemioterapia, la terapia fotodinamica ha il vantaggio di possedere un preciso controllo spazio temporale del trattamento: il fotosensibilizzatore viene attivato solo nelle zone irradiate permettendo, in linea di principio, di distruggere il tessuto malato senza danneggiare troppo quello sano. Vi sono diverse classi di molecole che attualmente vengono impiegate per la PDT, tra queste si possono annoverare i derivati delle porfirine, delle ftalocianine, delle clorine, di alcuni complessi metallici, delle naftalenidiimmidi (NDI) e dei BODIPY (Figura 7).

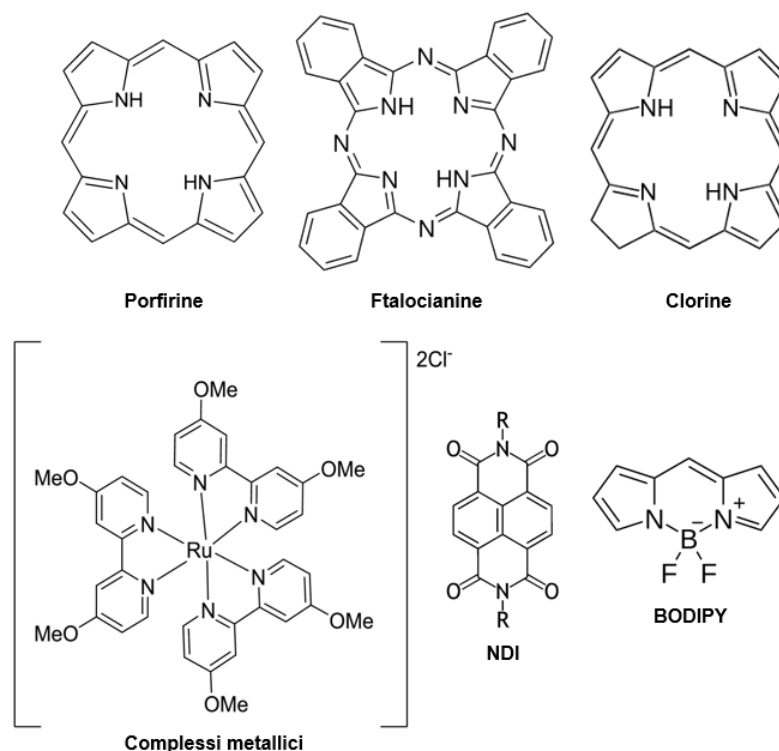


Figura 7. Strutture molecolari di vari fotosensibilizzatori

Tutti questi condividono delle caratteristiche chimiche comuni per cui possono essere utilizzati come fotosensibilizzatori in questo tipo di terapia: essi presentano un sistema coniugato esteso che permette un forte assorbimento nel visibile/NIR. In particolare, l'estensione del sistema π -coniugato permette di ottenere sistemi che assorbono a lunghezze d'onda più lunghe, in modo da far penetrare la luce più in profondità nei tessuti, aumentando in questo modo la generazione di ROS. Ad esempio, è stato progettato un sistema a sette anelli fusi in cui si è riscontrato che le strutture di coniugazione π estese conferiscono ai fotosensibilizzatori di cui sono costituiti un assorbimento a ≈ 880 nm (Figura 8).²⁸ Pertanto, grazie a questi nuovi PS con struttura elettronica estesa viene migliorato l'*imaging* a

fluorescenza nel NIR; inoltre, è stato anche dimostrato come l'impilamento π - π di questo tipo di fotosensibilizzatori può migliorare in modo efficiente la produzione di ROS.²⁸

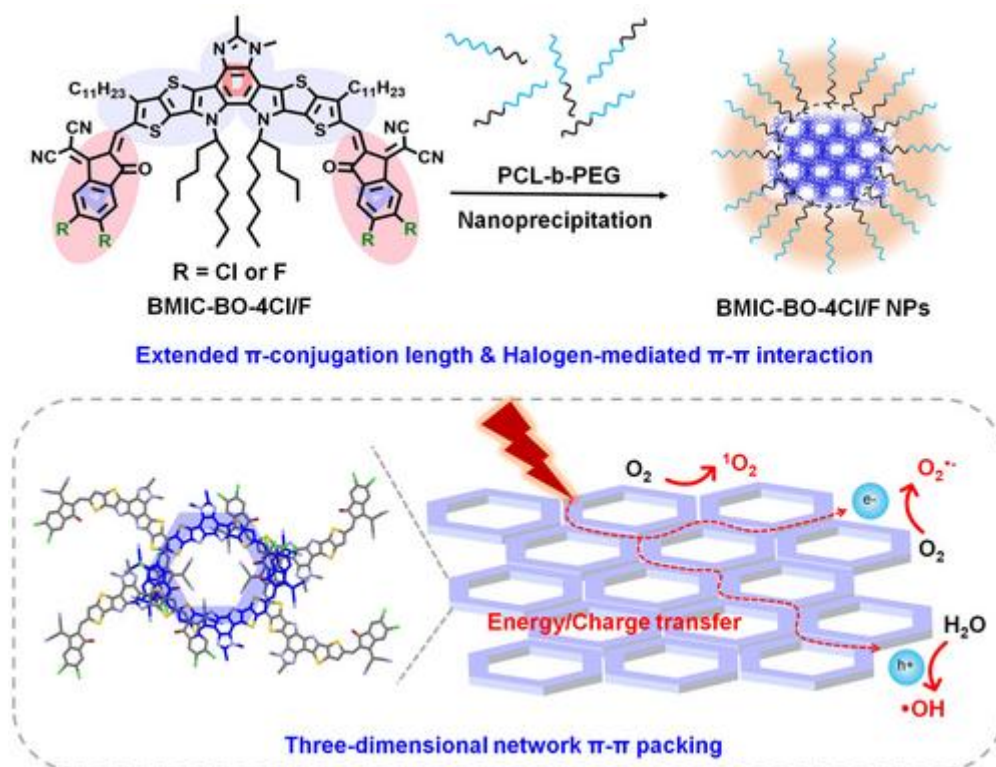


Figura 8. Rappresentazione schematica di un fotosensibilizzatore in cui l'estesa coniugazione π promuove il trasferimento di energia/carica e catalizza le reazioni fotochimiche per la PDT²⁸

La presenza di atomi pesanti, alogeni o metalli di transizione può contribuire a migliorare l'effetto fotodinamico del fotosensibilizzatore, in particolare essi aumentano l'interconversione dallo stato di singoletto a quello di tripletto grazie all'*heavy atom effect*. Ad esempio, per progettare fotosensibilizzatori a base BODIPY ad alta efficienza, è comune incorporare atomi di alogeno per migliorare l'*intersystem crossing*. Recentemente, sono state sviluppate diverse reazioni di alogenazione dei BODIPY per modificare le loro caratteristiche per il loro utilizzo nella PDT.^{29, 30} In particolare, l'introduzione di atomi di iodio mostra un effetto fotodinamico migliore rispetto all'introduzione di atomo di bromo.³¹ Anche la possibilità di coordinare ioni metallici in diversi tipi di fotosensibilizzatori ha permesso di migliorare l'efficienza per la terapia fotodinamica.³² Sono stati sviluppati complessi di Ru(II), Ir(III) e Pt(II) che stanno riscuotendo un crescente interesse come fotosensibilizzatori, non solo grazie alla caratteristica dell'effetto atomo pesante, ma anche perché presentano più configurazioni elettroniche di stato eccitato che possono essere sfruttate in percorsi citotossici sia dipendenti che indipendenti dall'ossigeno. Inoltre, le caratteristiche e proprietà dei fotosensibilizzatori a base di metalli nobili possono essere variate tramite l'alterazione dei ligandi del complesso. Questi possono essere modificati per

regolare: solubilità, lipofilia, lunghezza d'onda di assorbimento, selettività verso specifici *target* e farmacocinetica del complesso. Non solo i ligandi, ma anche i sostituenti di una molecola possono essere variati per modificare e migliorare le caratteristiche di un fotosensibilizzatore. Ad esempio, sono state confrontate diverse sostituzioni ariliche su posizioni meso di un derivato porfirinico: si è riscontrato che l'aumento del carattere elettron-donatore in posizione para sull'anello fenilico ha aumentato la resa quantica di fluorescenza e di generazione di ossigeno singoletto. Ciò non è stato riscontrato quando i gruppi elettron-donatore sono stati introdotti in posizione meta.³³

La terapia fotodinamica può essere usata non solo per la cura dei tumori, ma per numerose altre applicazioni, tra cui il trattamento delle infezioni batteriche: ciò ha portato all'origine della terapia fotodinamica antibatterica (aPDT), come coadiuvante alle comuni terapie per superare la farmaco resistenza agli antibiotici.

Per aumentare il potenziale dei fotosensibilizzatori e il loro effetto terapeutico, può risultare utile la loro incorporazione in un nanomateriale. Ciò può migliorare le caratteristiche del fotosensibilizzatore come: idrofilia, stabilità fotochimica, accumulo locale e biocompatibilità. La possibile combinazione di questi nuovi metodi terapeutici e della capacità di visualizzazione tramite *imaging* a fluorescenza in un unico nanomateriale, potrebbe portare alla formazione di un nuovo sistema teranostico.³⁴

1.3. Nanomateriali in teranostica

Negli ultimi anni, l'uso di nanomateriali si è rilevato essere molto vantaggioso per la diagnosi, il trattamento e la prevenzione di diverse patologie (Figura 9). La nanoteranostica sta avanzando sempre di più nelle sperimentazioni cliniche, ma l'aspetto importante da considerare nell'applicazione dei nanomateriali in campo medico, soprattutto negli organismi biologici, è la biocompatibilità. Pertanto, per la loro applicazione in biologia e medicina, è necessario considerare diverse condizioni. In primo luogo, i nanomateriali devono essere progettati per interagire con proteine e cellule senza interferire con le loro attività biologiche. In secondo luogo, essi non devono essere tossici e devono mantenere le loro proprietà fisiche anche dopo modifiche superficiali.³⁵ In letteratura sono riportati diversi tipi di nanosistemi che possono essere utilizzati a fini teranostici per diverse applicazioni. Le nanoparticelle di ossido di ferro ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$), ad esempio, sono nanocristalli che possono essere sfruttati per le loro proprietà magnetiche. Le $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ possono essere utilizzati come sonde di contrasto per risonanza magnetica.³⁶ Per conferire un'applicazione teranostica a queste nanoparticelle, le $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ opportunamente modificate con molecola *target* possono

essere usate per la veicolazione di molecole di farmaco per ottenere in questo modo un sistema *drug delivery*. Ad esempio, il metotressato (MTX), un farmaco antitumorale, è stato legato sulla superficie delle $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ che presentano dei gruppi amminici terminali.³⁷ Gli studi *in vitro* hanno dimostrato che le nanoparticelle, dopo l'internalizzazione cellulare, si accumulavano nei lisosomi, dove il MTX viene rilasciato a causa del basso pH e della presenza di proteasi. Inoltre, le nanoparticelle di ossido di ferro possono svolgere un duplice ruolo di *imaging*/terapia, grazie alla loro potenziale applicazione nell'ipertermia. Questa caratteristica è promettente nella terapia antitumorale poiché le cellule tumorali sono più suscettibili alle alte temperature rispetto alle cellule sane.³⁸

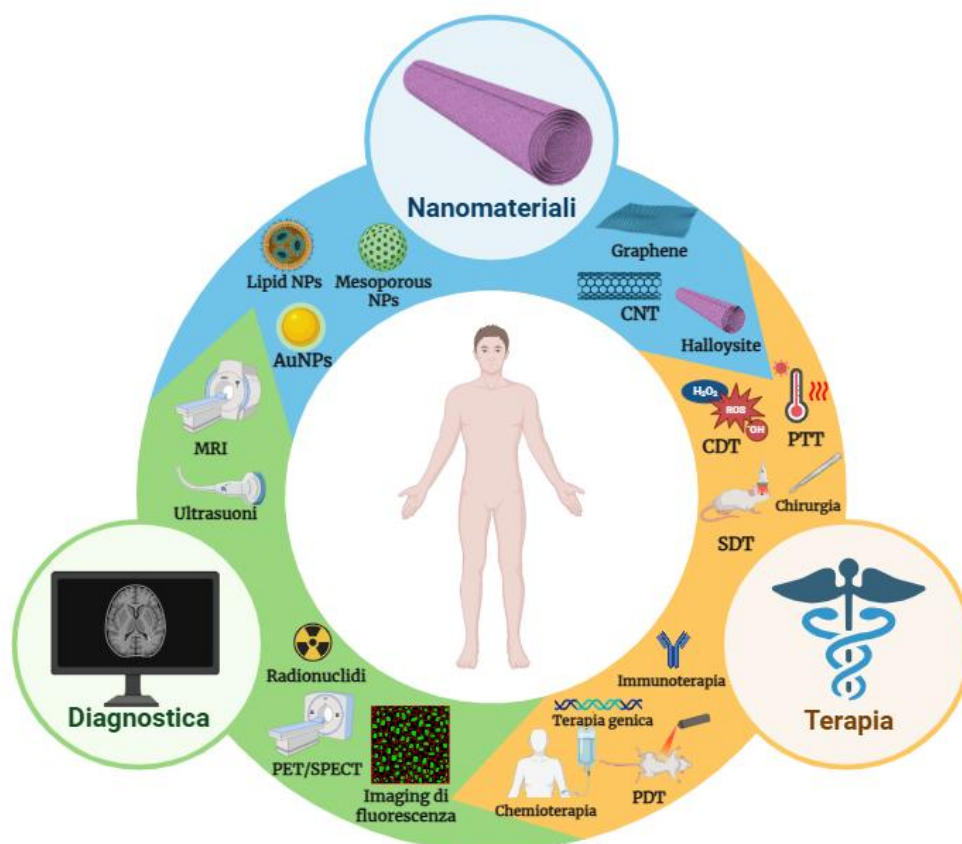


Figura 9. Applicazione dei nanomateriali in teranostica

Altre NPs come i *carbon dots* dopati con gadolinio (CDs) sono stati funzionalizzati con delle poliammidi anfoteriche in modo da sviluppare un sistema con interessanti proprietà teranostiche; in questo caso si sfruttano sia le caratteristiche dei CDs, nella fattispecie la loro capacità di *imaging*, che della poliammide capace di complessare siRNA.³⁹

Altri possibili sistemi teranostici a base di nanoparticelle d'oro (AuNPs) sono stati studiati in una varietà di ambiti correlati all'*imaging*, come la tomografia computerizzata, la fotoacustica e la spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS). Anche nel caso delle AuNPs è possibile ottenere dei sistemi di *drug delivery*, ad esempio è stato utilizzato il

chitosano come agente riducente e materiale di rivestimento per produrre nanoparticelle di Au.⁴⁰ Le nanoparticelle risultanti di chitosano-Au presentavano un'elevata carica positiva e si sono rivelate altamente efficienti nel caricare l'insulina tramite interazione elettrostatica. Tali coniugati sono stati studiati in un modello diabetico per controllare l'iperglicemia postprandiale. Inoltre, le AuNPs sono delle buone candidate per la terapia fototermica grazie alla loro caratteristica risonanza plasmonica superficiale: possono essere usate come trasduttori di energia che, se concentrate nelle aree tumorali e sottoposte a irradiazione laser, possono convertire la luce in calore e uccidere le cellule tumorali.

Anche i nanotubi di carbonio (CNT) vengono attualmente utilizzati per potenziali applicazioni in teranostica. In particolare, essi sono stati utilizzati per l'*imaging* Raman e fotoacustico e per il rilascio di geni e farmaci. Ad esempio, sono stati utilizzati dei CNT funzionalizzati per caricare e rilasciare sia farmaci, come MTX, che plasmidi.^{41, 42}

Tra i diversi nanomateriali che possono essere utilizzati in ambito teranostico, negli ultimi anni le argille hanno suscitato un crescente interesse, in virtù delle loro proprietà intrinseche e dei significativi vantaggi che presentano rispetto ai nanomateriali precedentemente discussi.

1.4. Argille minerali in ambito medico

Attualmente vi è un crescente interesse nello sviluppo di nuovi nanosistemi basati su risorse naturali rinnovabili e non tossiche, come le argille minerali. Esse sono ottenute dalla degradazione chimica delle rocce sedimentarie a causa dell'interazione con acqua, ossigeno, anidride carbonica e altri agenti atmosferici.⁴³

Dal punto di vista chimico, le argille sono dei fillosilicati, caratterizzati da una struttura formata da foglietti tetraedrici e ottaedrici che si alternano fino a formare degli strati. Il foglio tetraedrico è costituito da tetraedri silicio-ossigeno, collegati tra loro tramite tre vertici in comune, formando una rete a simmetria esagonale. Il quarto atomo di ossigeno di ciascun tetraedro è condiviso con il foglio ottaedrico adiacente. Il foglio ottaedrico, generalmente costituito da ioni di alluminio o magnesio in coordinazione ottaedrica con atomi di ossigeno e gruppi ossidrilici, completa l'unità strutturale di base. Ogni strato risultante ha uno spessore di circa 1 nm, mentre le sue dimensioni laterali possono variare da pochi decimi di nanometri fino a diversi micron.⁴⁴ Più strati possono aggregarsi e legarsi tra loro formando una struttura regolare, nella quale lo spazio tra gli strati è detto interstrato. La disposizione relativa dei fogli tetraedrici e ottaedrici consente di classificare i fillosilicati argillosi in tre principali categorie: 1:1, 2:1 e 2:1:1 (Figura 10).

- Nei fillosilicati 1:1, come la caolinite e l'halloysite, ogni strato è composto da un foglio tetraedrico accoppiato ad uno ottaedrico.
- Nei fillosilicati 2:1, come l'hectorite (Ht) e la montmorillonite (MMT), ogni strato è formato da un foglio ottaedrico inserito tra due fogli tetraedrici.
- I fillosilicati 2:1:1, come la cloisite, presentano uno strato 2:1 accoppiato a un ulteriore foglio ottaedrico.

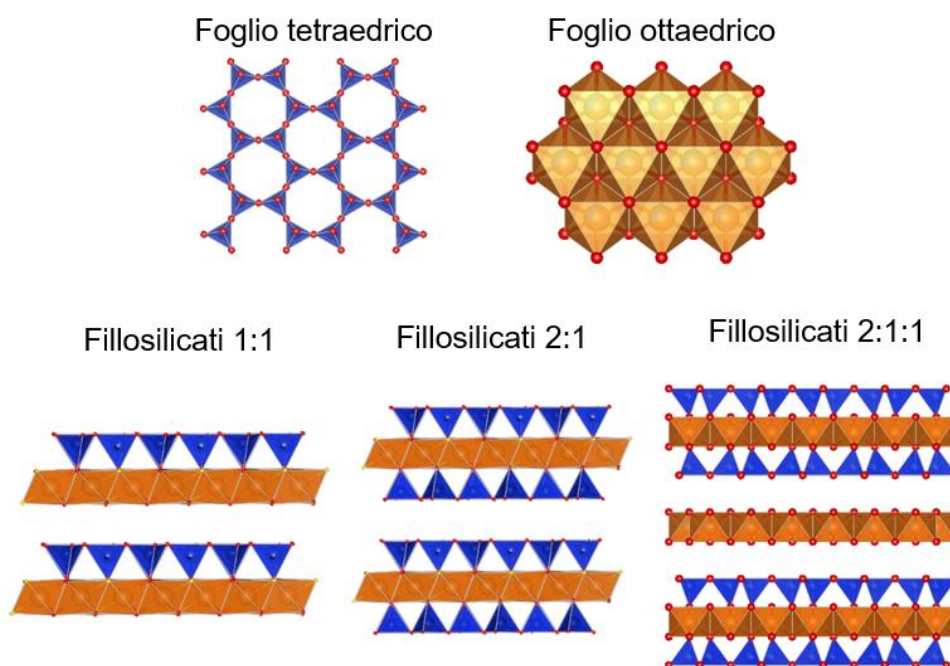


Figura 10. Rappresentazione grafica dei fogli tetraedrici e ottaedrici nei fillosilicati (in alto) e classificazione dei fillosilicati in funzione del numero di fogli tetraedrici e ottaedrici (in basso)⁴⁵

I nanomateriali a base di argille sono considerati importanti per il loro possibile uso sia in ambito terapeutico che diagnostico. L'uomo utilizza questo materiale da migliaia di anni per la creazione di utensili e oggetti in ceramica, ma anche per formulazioni mediche.⁴⁶

Le argille presentano numerosi vantaggi per i quali hanno possibili applicazioni in ambito biologico. Tra i vantaggi dell'uso di argille si possono sicuramente annoverare: l'ampia diffusione, il basso costo, la biocompatibilità, la dimensione e la morfologia delle particelle, l'area superficiale specifica e l'elevata densità di carica (Figura 11). Esse presentano proprietà uniche come l'intercalazione e l'adsorbimento di molecole di diversa natura chimica.⁴⁷

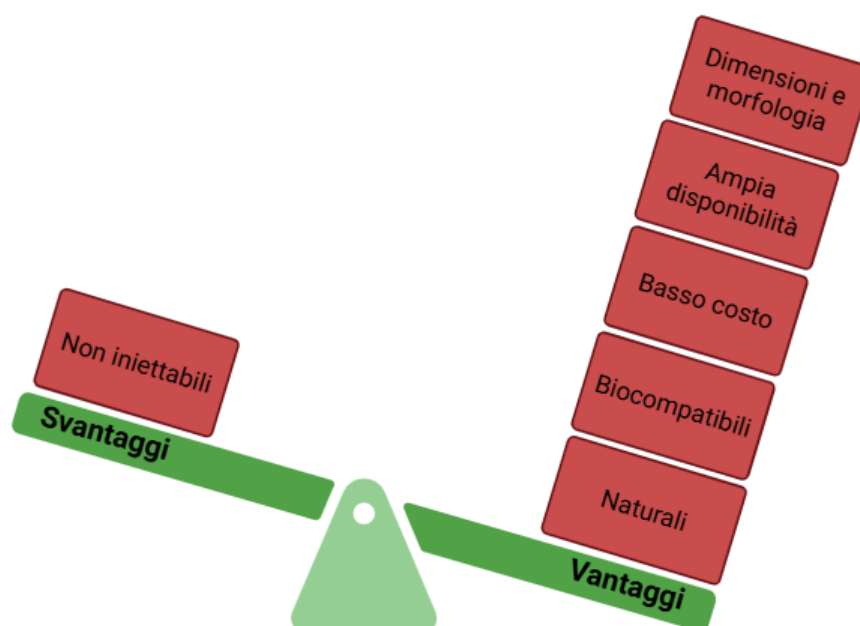


Figura 11. Vantaggi e svantaggi nell'uso di argille minerali

Negli ultimi anni si è riscontrato un crescente interesse sul possibile utilizzo di sistemi a base di argille minerali per applicazioni in teranostica.

Ad esempio, la superficie della montmorillonite è stata utilizzata per l'adsorbimento della doxorubicina e di un mezzo di contrasto per tomografia computerizzata. In questo modo si è ottenuto un sistema utile ai fini del *drug delivery* e con capacità di *imaging* medico.⁴⁸

Anche la paligorskite (Pal) è stata utilizzata per lo sviluppo di un potenziale sistema teranostico.⁴⁹ Dopo aver modificato la superficie esterna dell'argilla, a questa sono stati legati l'isotiocianato di fluoresceina e l'acido folico per individuare le cellule tumorali che sovraesprimono il recettore per il folato (Figura 12). Le immagini ottenute mediante microscopia confocale a scansione laser e i dati della spettroscopia ottica a emissione al plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES) hanno rivelato che il nanomateriale è stato internalizzato dalle cellule HeLa che sovraesprimono il recettore. Questi risultati hanno dimostrato che questo sistema potrebbe essere utilizzato per la diagnosi precoce dei tumori. Inoltre, questi nanomateriali potrebbero essere candidati per il rilascio mirato di farmaci antitumorali grazie alla loro struttura mesoporosa, combinando in un'unica struttura diagnosi e terapia del cancro.

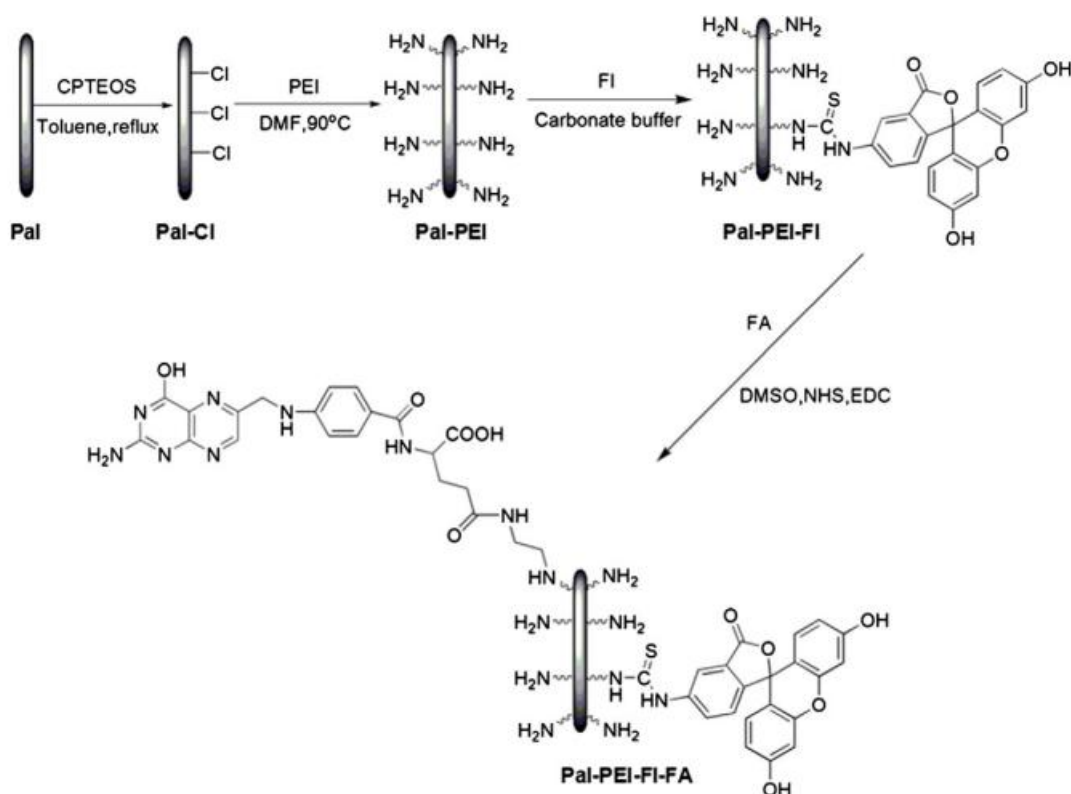


Figura 12. Rappresentazione schematica delle reazioni per modificare la paligorskite con biomolecole specifiche per il targeting delle cellule tumorali

Tra le varie argille minerali, l'halloysite presenta un alto potenziale per lo sviluppo di nanomateriali con potenziali applicazioni in ambito teranostico grazie alla morfologia tubolare cava di opportune dimensioni in grado di ospitare un gran numero di molecole, e alla possibilità di modifiche sulla superficie esterna, consentendo il legame sia con agenti per l'*imaging* che per il rilascio controllato di farmaci.

1.5. Halloysite

L'halloysite, come già detto, è un fillosilicato con stechiometria 1:1, la cui formula generale è $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 2$ per la forma completamente idratata).

Tale argilla minerale è uno dei prodotti di degradazione delle rocce vulcaniche, e viene estratta da depositi naturali presenti in tutto il mondo, mentre le forme più pure si trovano in paesi quali la Cina, Francia, Belgio e Nuova Zelanda.

In tali giacimenti, generalmente la lunghezza caratteristica del tubo è tra 600–900 nm, con un diametro esterno di circa 50 nm e un diametro interno di circa 15 nm. In relazione alle condizioni geologiche e di cristallizzazione, l'halloysite si presenta in varie morfologie. La morfologia tubolare è la più comune, e per tale motivo ci si riferisce ad essa con il termine nanotubi di halloysite (HNT).

Gli HNT sono considerati un materiale mesoporoso con una superficie specifica di 50–60 m²/g e una densità apparente di 2.53 g/cm³.

Come tutte le argille minerali, come già detto, gli HNT sono costituiti da una superficie esterna di gruppi silossanici mentre un lume costituito da gruppi alluminolici (Figura 13). Sulla superficie esterna sono inoltre presenti dei gruppi silanolici, Si-OH, come difetti strutturali. Essi sono probabilmente causati da anomalie nel processo geologico di formazione del materiale, che portano alla rottura parziale dei legami Si-O-Si.

Grazie a questa differente composizione chimica delle superfici, gli HNT mostrano, in un ampio range di pH, una parziale carica negativa sulla superficie esterna, mentre risultano positivi su quella interna.

Il potenziale zeta caratteristico complessivo degli HNT è di circa -30 mV a pH 4–8. La stabilità delle dispersioni acquose di tali materiali dipende fortemente dal pH e dalla carica superficiale presente in funzione di questo.⁵⁰ Infatti esse risultano poco stabili a pH acidi, per via delle aggregazioni dei tubi, mentre molto stabili a pH basici, quando i tubi sono dispersi.

A pH neutri come quello fisiologico la carica positiva, interna, e quella negativa, esterna, sono bilanciate e i tubi sono leggermente aggregati. In questo caso la semplice sonicazione delle dispersioni rende queste stabili e quindi utilizzabili per applicazioni biomediche.⁵¹

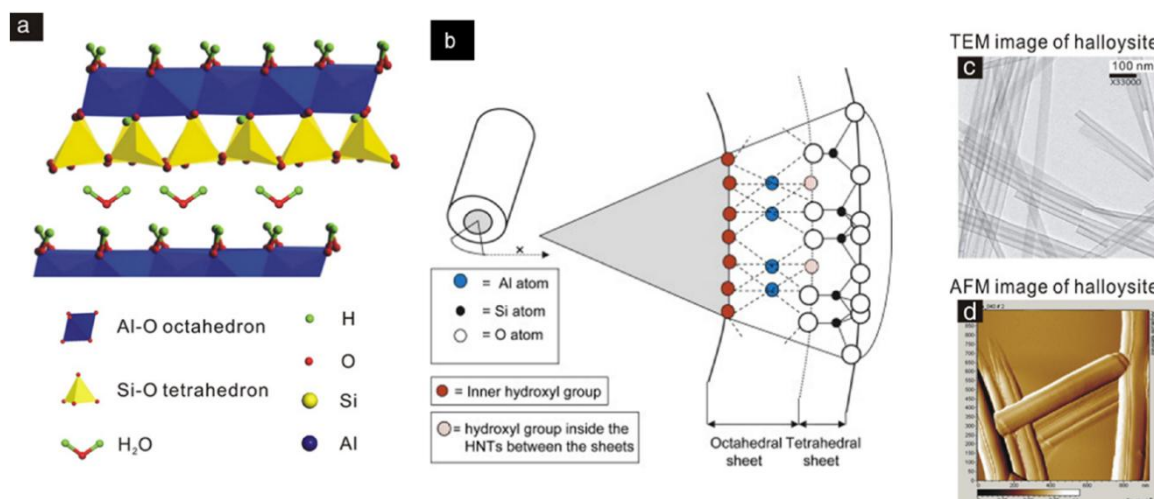


Figura 13. Diagramma schematico di (a) struttura cristallina di HNT, (b) struttura del nanotubo, (c-d) immagini TEM e AFM dell'halloysite⁵²

1.5.1. Biocompatibilità e biodegradabilità dell'halloysite

L'halloysite è risultata essere un materiale biocompatibile negli ultimi anni in diversi studi effettuati su colture cellulari e modelli di invertebrati. Tale caratteristica la rende adatta a svolgere la funzione di *nanocarrier* per la veicolazione di farmaci, come ad esempio i

chemioterapici antitumorali nel trattamento delle patologie oncologiche.⁵³ Il contatto tra i nanotubi di halloysite e le cellule biologiche si stabilisce per attrazione fisica, dovuta alla differenza di carica elettrostatica che esiste tra la parete cellulare e gli HNT (*pristine* o modificati) (Figura 14).

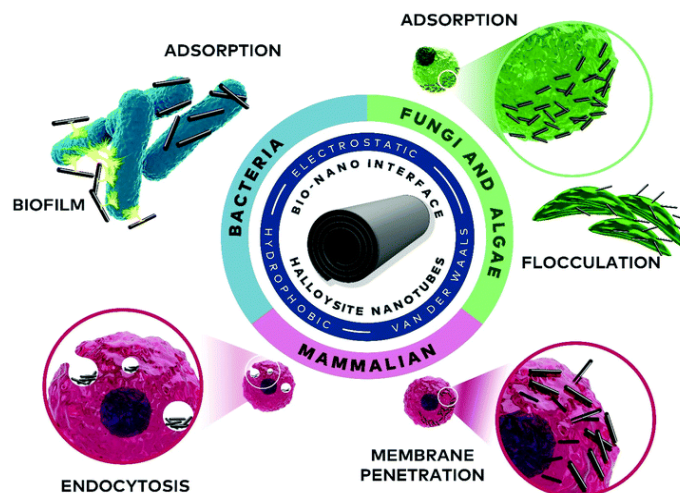


Figura 14. Interazione tra HNT e cellule di alghe, batteri e mammiferi

Da tali studi è emerso che la tossicità dell'halloysite, esattamente come tutte le sostanze, è funzione della concentrazione impiegata, ma comunque nelle condizioni adoperate ai fini terapeutici, questa risulta non tossica.⁵⁴ Inoltre, dal momento che l'halloysite viene rimossa in maniera efficace dall'organismo da parte dei macrofagi, può essere considerata un materiale sano e biocompatibile. Tuttavia, poiché non esistono meccanismi biologici di degradazione dell'allumino-silicato nel corpo, l'halloysite non può essere iniettata per via endovenosa.

Studi di internalizzazione cellulare mediante microscopia confocale hanno mostrato inoltre la capacità degli HNT di penetrare all'interno delle cellule e di accumularsi attorno ai nuclei. Tale caratteristica, fondamentale affinché l'halloysite possa correttamente veicolare all'interno delle cellule i farmaci, non risulta comunque essere dannosa per le cellule umane, dal momento che non va ad impedirne la proliferazione.⁵⁵

Studi *in vitro* hanno mostrato che trattando i globuli rossi umani con concentrazioni crescenti di HNT, fino ad un certo valore soglia non si arrecava emolisi.²¹ In organismi modello, come ad esempio vermi del tipo *Caenorhabditis Elegans*, è stato osservato come gli HNT si accumulino solo nel sistema digestivo non causando tossicità.²² Similmente somministrando gli HNT a esemplari di *Zebrafish*, si è osservato un accumulo nel tratto gastrointestinale a cui seguiva eliminazione dal corpo senza osservarne la presenza nel sistema circolatorio.²

Studi recenti sui topi hanno comunque mostrato che la prolungata somministrazione di tale argilla porta all'accumulo dell'alluminio; ed inoltre, che esiste una dose consigliata giornaliera che non deve essere superata.²⁵

1.5.2. Funzionalizzazione degli HNT

Dal punto di vista chimico, la differente composizione chimica delle superfici permette di introdurre opportune molecole organiche per la sintesi di nuovi nanomateriali che aumentano il già vasto campo di applicazione degli HNT. Le modifiche delle superfici possono essere effettuate sia attraverso una funzionalizzazione supramolecolare che tramite modifiche covalenti delle superfici esterne.

1.5.3. Funzionalizzazioni supramolecolari

Le interazioni che si instaurano fra gli HNT e le molecole organiche possono essere:²⁷

- Elettrostatiche, si instaurano tra le superfici esterne dei nanotubi di halloysite, cariche negativamente, e molecole organiche cariche positivamente oppure tra il lume carico positivamente, e molecole organiche cariche negativamente.
- Idrofobiche, si instaurano in mezzi acquosi dal momento che il lume allositico risulta essere più idrofobico rispetto al mezzo in cui i farmaci sono dispersi.
- Legami a idrogeno, si instaurano prevalentemente con la cavità degli HNT.
- Forze di Van der Waals.

I vantaggi nell'utilizzo dei nanotubi di halloysite come *carrier* per la veicolazione dei farmaci sono legati al fatto che sono in grado di incrementare la biodisponibilità di molecole organiche idrofobiche in mezzi fisiologici acquosi, ma anche alla possibilità di ottenere dei sistemi a rilascio lento e prolungato nel tempo.⁵⁶

Questo tipo di interazione è stato utilizzato anche per ottenere dei sistemi per potenziali applicazioni in teranostica. In particolare è stato sviluppato un sistema a base di halloysite con applicazioni nella terapia fototermica, la quale è una tecnica medica minimamente invasiva che usa la luce per generare calore e distruggere selettivamente le cellule tumorali, risparmiando i tessuti sani circostanti. Per fare ciò, il verde indocianina (ICG), un colorante organico con proprietà di conversione fototermica uniche, è stato caricato nel lume degli HNT, ottenendo così un nanomateriale fototermico con elevate proprietà di conversione luce-calore. Si è riscontrato che irradiando il nanomateriale per 2 min con laser NIR a 808 nm si ottiene un aumento di temperatura locale, inoltre esso risulta essere stabile per più cicli

di irradiazione.⁵⁷ Ulteriori studi hanno sfruttato l'interazione tra l'ICG e l'halloysite per ottimizzarne le prestazioni in ambito teranostico. In particolare, gli HNT sono stati marcati con isotiocianato di fluoresceina (FITC), ottenendo la combinazione HNT-FITC-ICG, strutturalmente stabile grazie al ruolo degli HNT come *nanocarrier* e agente protettivo. Il nanomateriale è stato successivamente rivestito con una membrana eritrocitaria (RBCM) al fine di migliorarne la biocompatibilità (Figura 15). Grazie all'effetto fototermico dell'ICG, l'irradiazione del sistema con un laser a 808 nm ha determinato un significativo aumento della temperatura, sufficiente a indurre la morte delle cellule tumorali. Per incrementare la specificità di *targeting*, il nanocomposito HNT-FITC-ICG-RBCM è stato infine funzionalizzato con anticorpi anti-EpCAM, mostrando un accumulo selettivo e marcato nei tessuti tumorali.⁵⁸

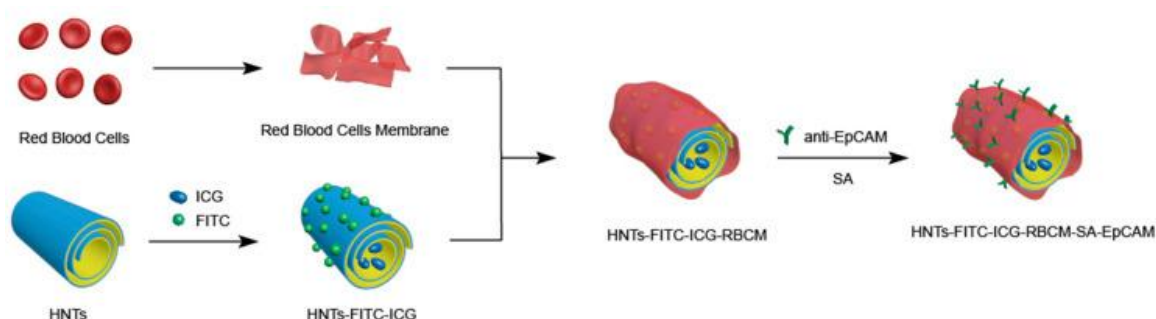


Figura 15. Rappresentazione schematica per l'ottenimento del sistema HNT-FITC-ICG-RBCM-EpCAM⁵⁸

L'approccio supramolecolare risulta vantaggioso anche per conferire proprietà fotofisiche all'argilla tramite il caricamento di specifiche molecole funzionali. In questo contesto ad esempio, il lume allositico è stato utilizzato per il caricamento di una molecola bicromoforica, formata dall'unione della curcumina con il BODIPY (CURBO).⁵⁹ Il nanomateriale ibrido ottenuto, composto da halloysite e CURBO, ha dimostrato una biocompatibilità nettamente superiore rispetto al solo sistema bicromoforico, rendendolo promettente per applicazioni nel *bioimaging*. Inoltre, grazie all'aumentata disponibilità in ambiente acquoso del cromoforo, il sistema HNT/CURBO mostra interessanti proprietà fotofisiche quali ad esempio un'emissione nel rosso, non osservata nel caso della sola molecola, aprendo le porte a future applicazioni come sonda fluorescente per l'*imaging* cellulare.

Ulteriori ricerche hanno sfruttato questo stesso approccio per adsorbire pigmenti e coloranti, come il carminio d'indaco, utilizzando l'halloysite al fine di migliorarne le proprietà ottiche, termiche e di resistenza all'ossidazione. In questo modo, l'impiego degli HNT consente di incrementare la stabilità dei coloranti.⁶⁰ Inoltre, l'halloysite si è dimostrata un ottimo *carrier* biocompatibile per *quantum dots*, come le nanoparticelle di CdSe o FeSe, che possono essere

utilizzate per la doppia marcatura di cellule umane, sia *nell'imaging* in campo oscuro sia in fluorescenza.

Questo approccio apre nuove prospettive per un'etichettatura cellulare biocompatibile ed efficiente, con potenziali applicazioni nelle terapie cellulari e nell'ingegneria tissutale. Tali risultati confermano ulteriormente il ruolo dell'halloysite come involucro sicuro e non tossico, capace di racchiudere e proteggere punti quantici fluorescenti all'interno del lume dei nanotubi.⁶⁰

1.5.4. HNT funzionalizzati: modifiche covalenti sulla superficie esterna

Le caratteristiche chimico-fisiche dei nanotubi di halloysite possono essere modulate mediante il legame covalente sulla superficie esterna di molecole organiche e non.²⁰

La modifica covalente della superficie esterna è comunemente ottenuta attraverso *grafting* di organosilani con opportuni gruppi funzionali (Figura 16). Le reazioni di *grafting* possono verificarsi in toluene, in miscele di acqua/alcol o in condizioni *solvent free* sotto irradiazione a microonde.⁶¹ L'introduzione di gruppi funzionali sugli HNT consente di ottenere nuovi nanomateriali con prestazioni migliori per il caricamento e/o il rilascio di diverse molecole.⁶¹ Pertanto, partendo da organosilani con funzionalità amminiche, azido, tioliche o clorate terminali sono stati ottenuti diversi tipi di nanomateriali (Figura 16).⁶² La funzionalizzazione covalente delle superfici dell'halloysite si è dimostrata una strategia efficace per la sintesi di sistemi ibridi destinati al trasporto e al rilascio controllato di farmaci.⁶³

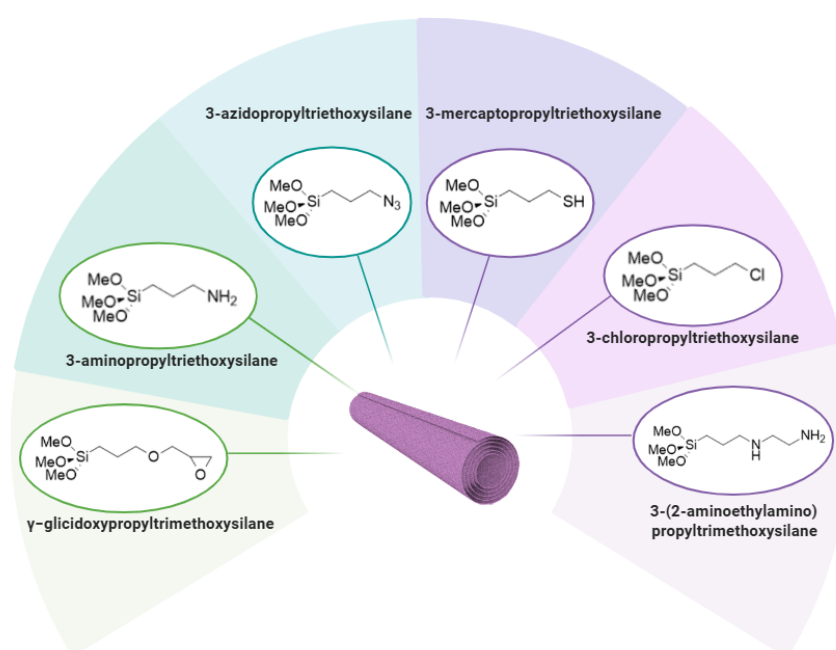


Figura 16. Modifiche covalenti sulla superficie esterna dell'halloysite

Dal momento che l'halloysite non presenta proprietà fotoluminescenti, è possibile legare covalentemente specifiche molecole che permettano di utilizzare l'argilla nel campo del *bioimaging*. In un recente studio, i *nanocluster* d'oro sono stati legati in modo covalente alla superficie esterna degli HNT, dando origine a un nanomateriale caratterizzato da eccellenti proprietà fotoluminescenti, particolarmente promettenti per applicazioni in campo teranostico. È stato osservato che questi nanocompositi vengono facilmente assorbiti dalle cellule A549 e che, all'aumentare della loro concentrazione, inducono una massiccia morte cellulare per apoptosi. Tale effetto tossico, dipendente dalla concentrazione, potrebbe quindi essere sfruttato per la terapia antitumorale sia a fini diagnostici che terapeutici. Infatti, la fluorescenza dei *nanocluster* d'oro ancorati agli HNT permette di tracciare e monitorare la distribuzione del nanomateriale, sia in esperimenti *in vitro* sia in modelli *in vivo*.⁶⁴

Un ulteriore vantaggio nell'uso dell'halloysite per applicazioni biomediche è data dalla possibilità di utilizzarla come *filler* per la creazione di nuovi materiali nanocompositi.⁶⁵ Negli ultimi anni è stata posta particolare attenzione all'uso di biopolimeri, come polisaccaridi, proteine e poliesteri sintetici biodegradabili (chitina, chitosano, proteine, gelatina, amido e altri polimeri naturali) grazie alle loro eccellenti proprietà, elevata sostenibilità e basso costo.⁶⁶

L'halloysite ha trovato largo impiego in ambito biomedico, sia singolarmente che in coniugazione con diverse tipologie di biopolimeri (Figura 17). Nonostante essa possa presentare delle limitazioni, come la mancanza di proprietà fotoluminescenti, queste problematiche possono essere superate modificando covalentemente tali nanomateriali con sonde fluorescenti utilizzabili nel campo del *bioimaging*. Tutto ciò ha permesso di ottenere nanomateriali a base di HNT con potenziali applicazioni in teranostica.⁶⁷

Per quanto detto in questa introduzione, lo scopo di questa tesi è sviluppare dei sistemi fluorescenti basati sull'halloysite con potenziali applicazioni in ambito teranostico. Per l'ottenimento di tali sistemi sono state previste diverse strategie sintetiche. Nei capitoli che seguono verranno prese in considerazione differenti sonde fluorescenti, come protoporfirina IX, oligo(fenilene etinileni), sonde alocromiche, naftalenidiimmidi e BODIPY, le quali sono state legate covalentemente sulla superficie esterna dell'halloysite, opportunamente modificata con diversi organosilani, tramite appropriate reazioni. Tutti i nanomateriali sono stati opportunamente caratterizzati per confermare le avvenute reazioni e sono state studiate le relative applicazioni in diversi ambiti biologici.

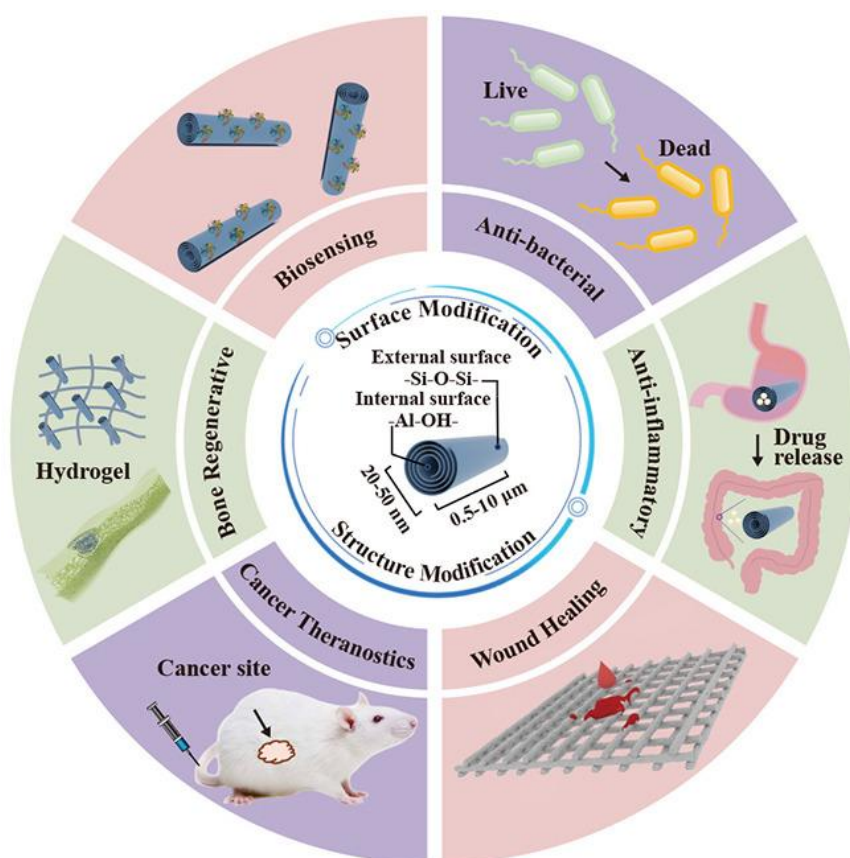


Figura 17. Applicazioni biomediche dell'halloysite⁶⁷

2. Capitolo 2

In questa sezione verranno mostrati i risultati e la relativa discussione inerenti alla realizzazione di diversi sistemi a base di halloysite opportunamente funzionalizzata per potenziali applicazioni in ambito teranostico.

A tal proposito verranno discusse diverse strategie sintetiche basate sulla modifica della superficie esterna degli HNT attraverso un approccio covalente, funzionalizzazioni supramolecolari o combinazioni di entrambi.

In Figura 18, sotto riportata, sono schematicamente rappresentati i principali composti sintetizzati con le potenziali relative applicazioni.

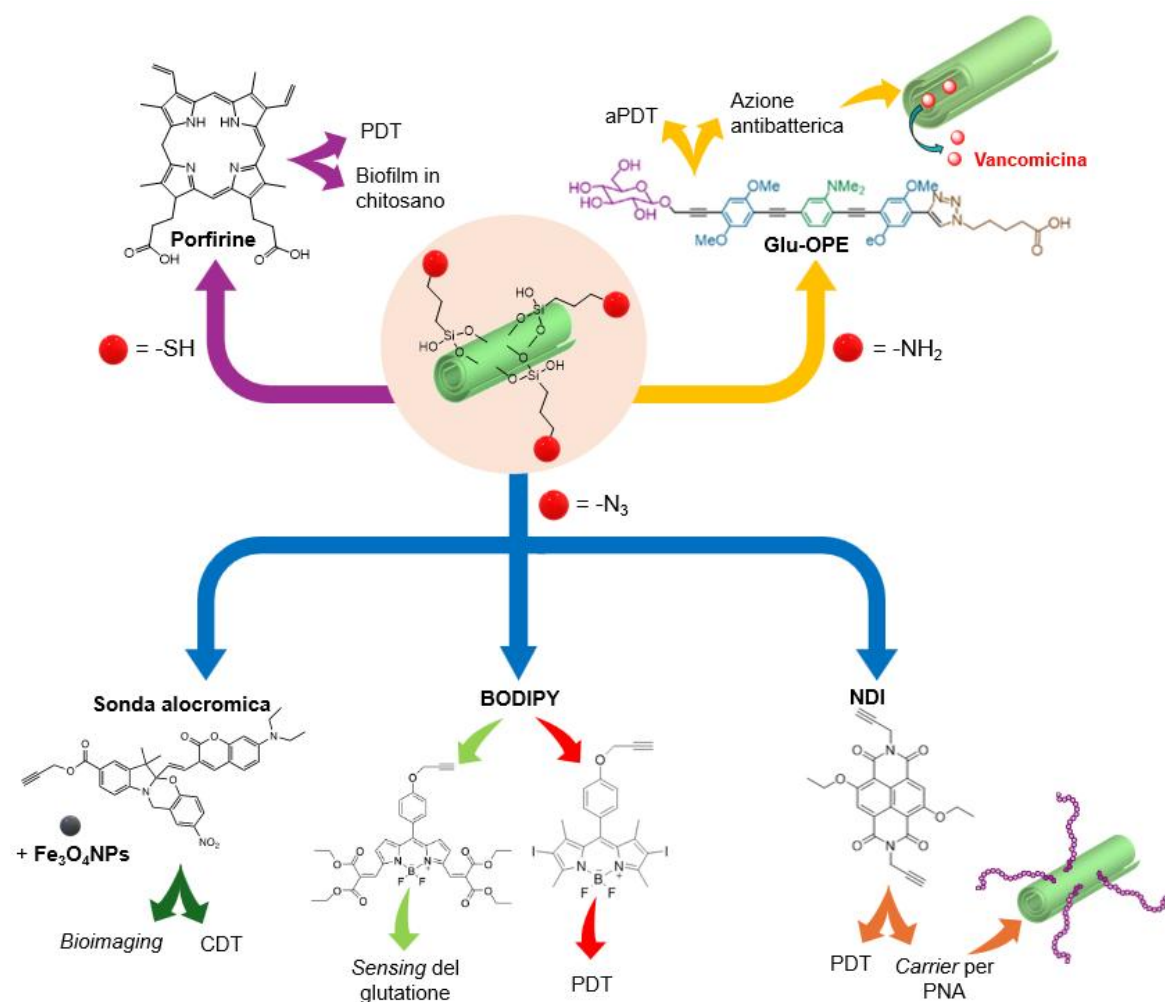


Figura 18. Schema sui diversi sistemi ottenuti

2.1. Sistema a base di halloysite e protoporfirina IX

Le porfirine sono un'importante classe di composti macrociclici presenti in natura in vari sistemi biologici e giocano un ruolo fondamentale nel metabolismo degli esseri viventi.⁶⁸ Esse infatti, se opportunamente irradiate sono capaci sia di produrre specie reattive all'ossigeno comportandosi da agenti fotodinamici sia di agire come specie reattive per la terapia fototermica.

Tra le diverse porfirine, la protoporfirina IX (PPIX) ha riscontrato un notevole successo, grazie anche alle sue peculiarità chimico-fisiche, nelle applicazioni biomediche. Rispetto ai convenzionali trattamenti anticancro, come la chemioterapia, la terapia fotodinamica ha il vantaggio di possedere un preciso controllo spazio-temporale del trattamento: il fotosensibilizzatore viene attivato solo nelle zone irradiate permettendo, in linea di principio, di distruggere il tessuto malato senza danneggiare troppo quello sano. Essa in particolare, è storicamente utilizzata come fotosensibilizzante nel campo della terapia fotodinamica. La PPIX purtroppo presenta diverse limitazioni per il diretto utilizzo in campo biologico sia poichè risulta scarsamente solubile in acqua, sia per la sua tendenza a formare aggregati in soluzione che ne spengono la fluorescenza, inficiando di conseguenza le sue proprietà fotodinamiche.⁶⁹ Per ovviare a tali criticità negli anni si sono sviluppati diversi sistemi *carrier* o modifiche del nucleo porfirinico. È stato sviluppato un sistema di rilascio basato sull'accoppiamento della protoporfirina IX con nanoparticelle d'oro, capace di veicolare in modo efficace il fotosensibilizzatore all'interno delle cellule (Figura 19). Questo tipo di nanostruttura è stato impiegato con successo nella terapia fotodinamica per il trattamento dei tumori.⁷⁰ Sono stati sviluppati anche dei *nanocluster* di nanoparticelle di ossido di ferro superparamagnetico (SPIONs) rivestite con PPIX (Figura 19). Questo sistema è stato usato sia a fini diagnostici, come agenti di contrasto per la risonanza magnetica, che a fini terapeutici grazie alla loro applicazione nella PDT.⁷¹ Tuttavia, queste piattaforme presentano alcune criticità, tra cui il possibile rischio di *quenching* della fluorescenza dovuto alla presenza dell'oro delle nanoparticelle e la possibilità di effetti collaterali legati alle proprietà magnetiche e allo stress ossidativo indotto dagli SPIONs.

La veicolazione con gli HNT potrebbe rappresentare una valida strategia per l'ottenimento di nanomateriali con potenziale applicazione in campo biologico per il trattamento dei tumori.

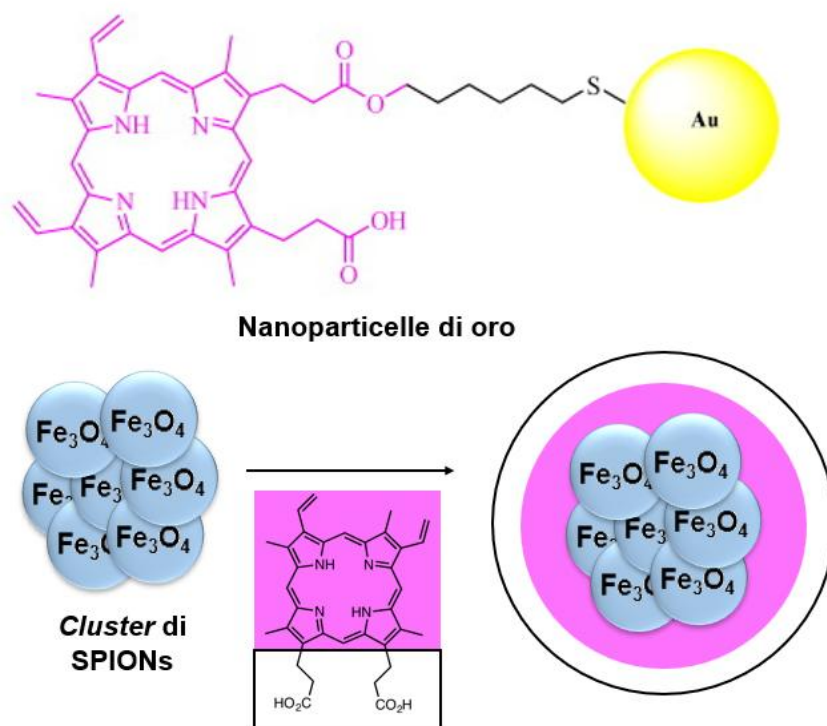
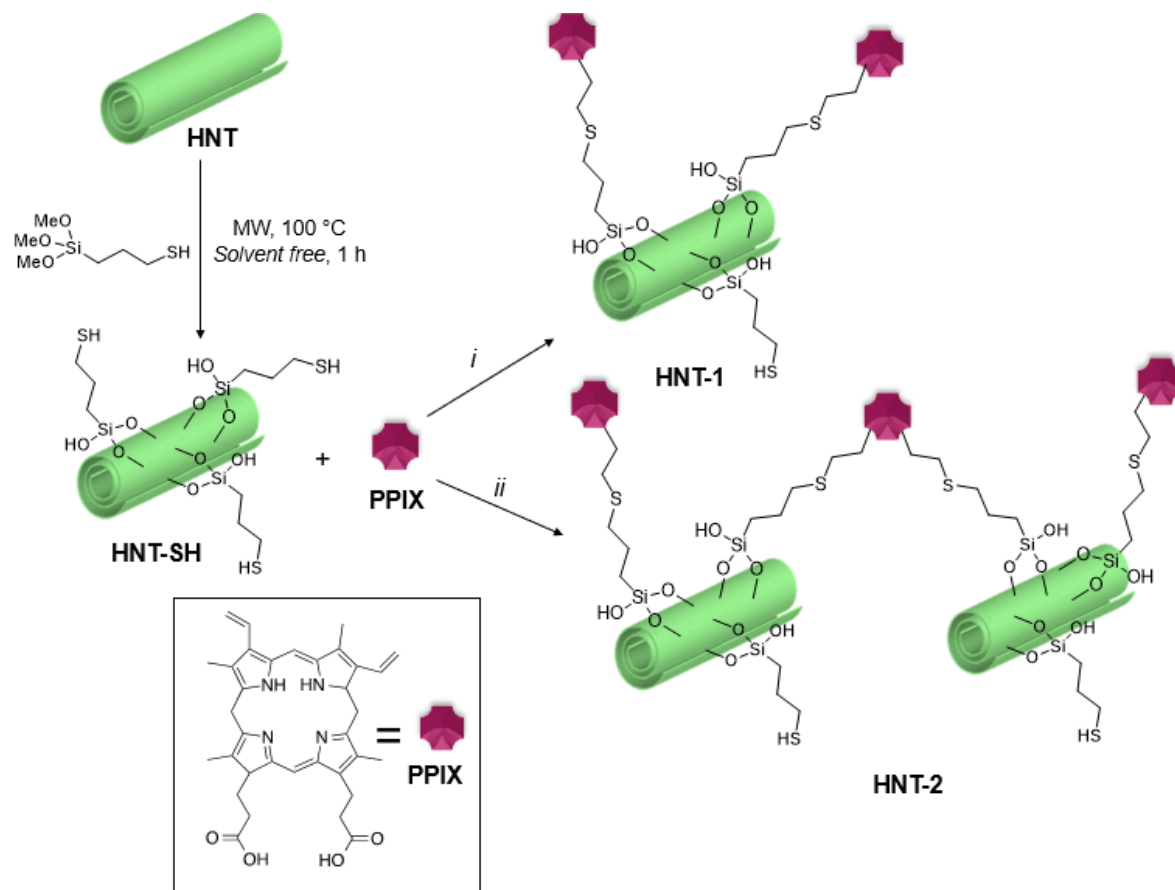


Figura 19. Rappresentazione schematica dei sistemi a base di nanoparticelle d'oro o SPIONs e PPIX

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un nanomateriale a base di HNT e PPIX come mostrato nello Schema 1. Nel primo passaggio, la superficie esterna degli HNT è stata modificata attraverso reazione con il 3-mercaptopropiltrimetossisilano secondo una metodica nota in letteratura.⁷² In particolare, per questo tipo di modifica, una miscela contenente l'argilla e l'organosilano è stata sottoposta a irradiazione con le microonde (MW) in condizioni *solvent-free* per un tempo di irradiazione di 1 h e alla temperatura di 100 °C. Dopo il *work-up* il nanomateriale ottenuto è stato analizzato mediante analisi termogravimetrica (TGA) che ha permesso di stimare una percentuale di porzione organica sull'halloysite che risulta essere pari all'1.2 %p/p, che corrisponde ad un grado di funzionalizzazione del materiale pari a 0.16 mmol g⁻¹. Il nanomateriale così ottenuto, **HNT-SH**, nel secondo passaggio è stato impiegato per l'ancoraggio della PPIX mediante una reazione *thiol-ene*.⁷³ Al fine di trovare le migliori condizioni sperimentali per l'ottenimento del nanomateriale finale con il più alto grado di funzionalizzazione, per tale sintesi si sono esplorate due diverse vie sintetiche (Schema 1). La prima prevede l'irraggiamento UV a 260 nm di una dispersione di **HNT-SH** in metanolo, a temperatura ambiente per un tempo di irraggiamento di 1 h, ottenendo **HNT-1** secondo una metodica "tradizionale" riportata in letteratura per sistemi simili.⁷⁴ Il secondo metodo, invece, prevede la sintesi di **HNT-2** con l'utilizzo delle microonde in condizioni *solvent free* per un tempo di irradiazione di 1 h a 100 °C, in presenza di una quantità catalitica di AIBN come iniziatore radicalico.⁷⁵ Dopo il

work-up, tramite analisi termogravimetrica è stata stimata una percentuale di caricamento della porzione organica sulla superficie esterna dei nanotubi di halloysite di circa il 2.1 %p/p per la reazione sotto irraggiamento UV e di ca. il 3.7 %p/p nel secondo. Come si può osservare, la reazione condotta tramite microonde risulta essere più vantaggiosa rispetto a quella condotta tramite la metodica tradizionale. Infatti, è stato possibile ottenere una percentuale di caricamento maggiore in assenza di solvente dopo solo un'ora di irradiazione.



*Schema 1. Rappresentazione schematica delle strutture ipotizzate dei nanomateriali **HNT-1** e **HNT-2** ottenuti con i due diversi percorsi: (i) $h\nu$, MeOH, t.a., 24 h; (ii) AIBN, MW, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h in condizioni prive di solventi*

Sulla base del rapporto stechiometrico tra i gruppi tiolici presenti sul nanomateriale **HNT-SH** e la porzione porfirinica ancorata sui nanomateriali **HNT-1** e **HNT-2** ottenuti tramite i due diversi approcci (con un grado di funzionalizzazione di 0.16 mmol g^{-1} per i gruppi tiolici e 0.04 e 0.07 mmol g^{-1} per PPIX rispettivamente ottenuta tramite UV e microonde), si può concludere che sono ancora presenti gruppi tiolici sulla superficie dell'argilla; questo potrebbe essere dovuto all'ingombro sterico della protoporfirina IX.

Inoltre, a seconda della procedura sintetica utilizzata, si è ipotizzato che nel caso dell'irradiazione tramite lampada UV siano rimasti dei gruppi vinilici, della PPIX, liberi e disponibili per ulteriori reazioni; al contrario nel caso dell'irradiazione con microonde, il gruppo vinilico di PPIX che non reagisce nella reazione *thiol-ene* subisce un'ulteriore

reazione di autoaddizione, portando alla formazione di una struttura più organizzata in cui, probabilmente, le molecole di PPIX potrebbero essere legate a ponte tra due tubi diversi o tra di loro (Figura 20).

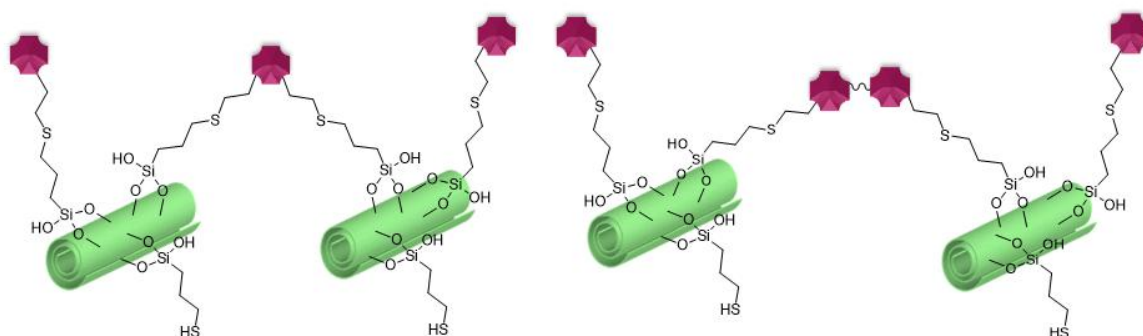


Figura 20. Possibili strutture organizzate del nanomateriale **HNT-2**

2.1.1. Caratterizzazione dei sistemi HNT-1 e HNT-2

Al fine di confermare l'avvenuta modifica sulla superficie esterna dei nanotubi e di verificare eventuali cambiamenti strutturali e/o morfologici in dipendenza della metodologia sintetica utilizzata, sono state effettuati degli studi mediante spettroscopia FT-IR, analisi termogravimetriche e indagini tramite spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS).

In Figura 21 sono riportati gli spettri FT-IR dei nanomateriali sintetizzati attraverso le due vie sintetiche e per confronto quelli dei due precursori, **HNT-SH** e PPIX.

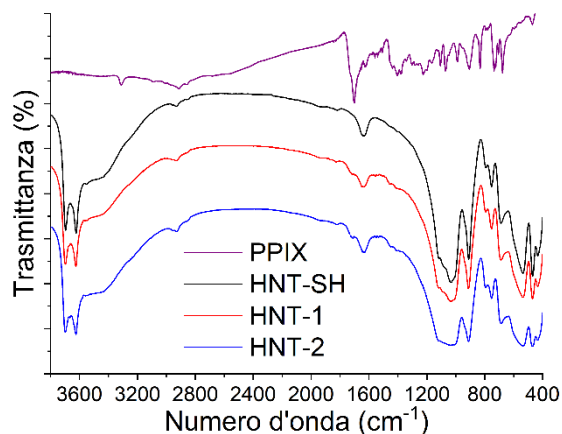


Figura 21. Spettri FT-IR della PPIX e dei nanomateriali **HNT-SH**, **HNT-1** e **HNT-2**

Come è possibile osservare, nello spettro FT-IR del nanomateriale **HNT-SH** sono presenti tutte le bande caratteristiche sia degli HNT che dei gruppi organici, così come riportato in letteratura.⁷⁶ In particolare, si possono osservare due bande a ca. 3620 e 3490 cm^{-1} che corrispondono alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi ossidrilici del lume interno e dell'acqua interstiziale e delle bande a ca. 1115 e 1031 cm^{-1} corrispondenti alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi Si-O e Si-O-Si. Sono inoltre presenti delle bande intorno a 753 e 690

cm^{-1} derivanti dalle vibrazioni di *stretching* dei legami perpendicolari Si-O e una banda a 912 cm^{-1} attribuibile alla deformazione del legame O-H dei gruppi Al-O-H interni. La banda osservabile a ca. 1635 cm^{-1} è invece attribuibile alle vibrazioni di *bending* dei gruppi ossidrilici delle molecole di acqua.⁷⁷ Infine, le bande presenti a ca. 2985 e 2885 cm^{-1} sono relative alle vibrazioni di *stretching* simmetrico e asimmetrico dei gruppi metilenici dell'organosilano.⁵²

In seguito all'ancoraggio della PPIX, nello spettro FT-IR dei nanomateriali ottenuti sia con le MW che con irraggiamento UV, sono presenti, oltre alle bande già discusse, ulteriori bande. In particolare, si possono osservare le vibrazioni di *stretching* dei gruppi C=C e C=N, degli anelli pirrolici della PPIX nel *range* $1540\text{--}1385 \text{ cm}^{-1}$, e la presenza di una banda allargata a ca. 1700 cm^{-1} attribuibile alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi carbossilici, che cade nello stesso intervallo di lunghezza d'onda della tipica banda di *bending* dell'acqua dell'halloysite.^{78, 79}

In Figura 22 sono riportate le curve termogravimetriche dei due nanomateriali ottenuti attraverso i diversi approcci e HNT e **HNT-SH** per confronto.

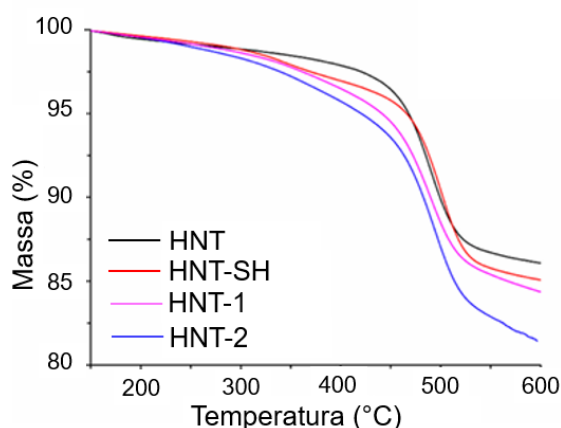


Figura 22. Curve termogravimetriche dei nanomateriali HNT, **HNT-SH**, **HNT-1** e **HNT-2**

Entrambi i campioni hanno mostrato una perdita in massa nella regione di $450\text{--}550 \text{ }^{\circ}\text{C}$, indicata come ML_{500} . Quest'ultima è dovuta all'espulsione delle due molecole d'acqua nella zona interstrato degli HNT.⁸⁰ Inoltre, dall'analisi quantitativa del residuo fisso a $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (MR_{600}) è stato possibile calcolare le percentuali di caricamento discusse precedentemente. In particolare, si può affermare che le caratteristiche strutturali dell'halloysite non sono state alterate dato che i valori MR_{600} per i due nanomateriali sono simili; ma si ha avuto l'effettivo legame con PPIX, dato che il MR_{600} dei due nanomateriali è minore di quello di **HNT-SH**. Per confermare ulteriormente la presenza dei diversi gruppi funzionali presenti sulla superficie dei nanomateriali sintetizzati, sono state eseguite analisi XPS. La *survey* e gli

spettri di C1s, N1s e O1s di **HNT-2** sono riportati in Figura 23. L'analisi effettuata sul nanomateriale ottenuto per irraggiamento UV è riportata in Appendice 1.

Come è possibile osservare nella *survey* (Figura 23a) sono presenti, oltre ai segnali caratteristici degli HNT (Al2s, Al2p, Si2s e Si2p), la presenza di atomi di C, N e O, con picchi rispettivamente a 284.39 eV (C1s), 399.09 eV (N1s) e 531.64 eV (O1s).⁸¹

Dalla deconvoluzione degli spettri relativi ai vari atomi è stato possibile ricavare ulteriori informazioni sui vari gruppi funzionali presenti nel nanomateriale. In Figura 23b è riportato lo spettro relativo ai picchi del C1s. Come è possibile osservare, la deconvoluzione dei dati sperimentali dà origine a tre diverse bande a ca. 284.40 eV, 286.33 eV e 288.28 eV corrispondenti ai gruppi C=C, C=O/C=N e O-C=O. Similmente, lo spettro relativo all'N1s è stato deconvoluto in tre picchi centrati a ca. 397.11 eV, 399.44 eV e 402.03 eV corrispondenti rispettivamente ai gruppi C=N, C-N-C e N-C (Figura 23c). Anche lo spettro di O1s è stato deconvoluto in tre picchi centrati a 528.42 eV, 531.52 eV e 533.67 eV, corrispondenti rispettivamente ai gruppi C=O, O-Si-O e O-Al-O (Figura 23d).

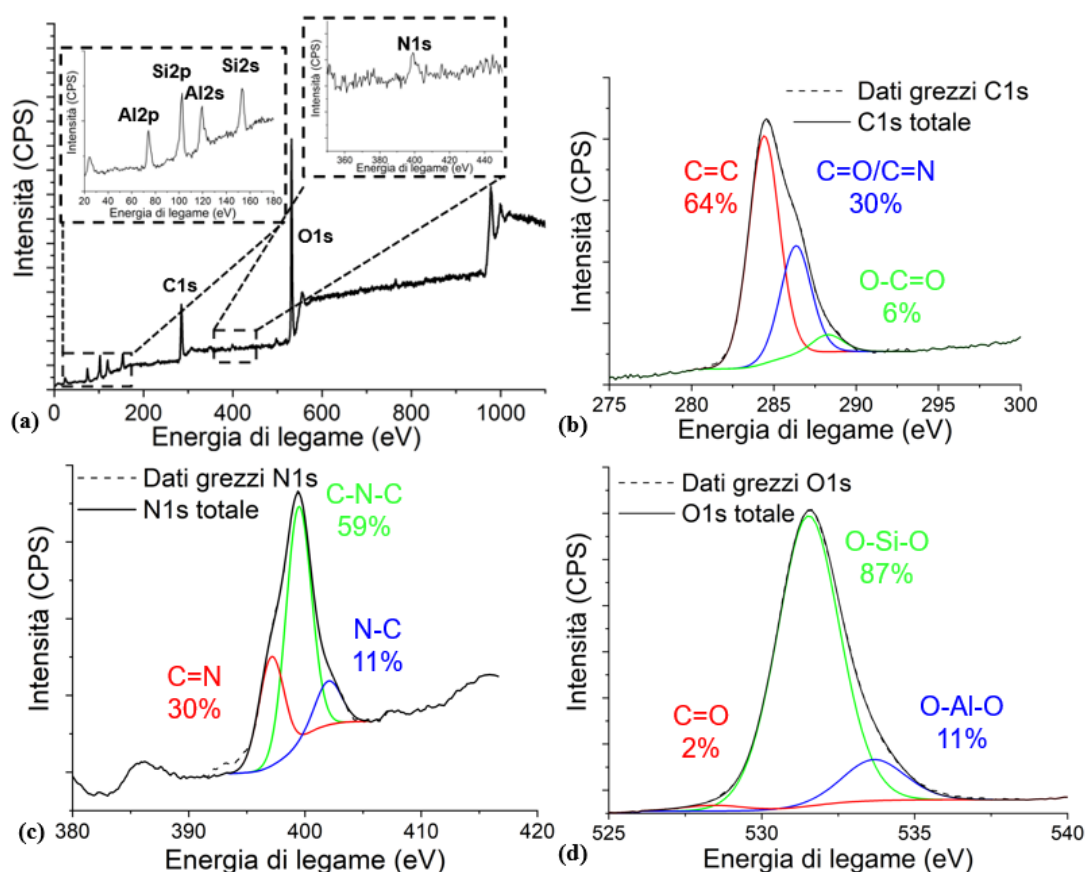


Figura 23. (a) Survey relativa al nanomateriale **HNT-2**, (b) deconvoluzione di C1s, (c) deconvoluzione di N1s, (d) deconvoluzione di O1s

Dall'analisi XPS è stato inoltre possibile ricavare informazioni quantitative sui gruppi presenti. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1. Stessi risultati sono stati ottenuti

dall'analisi XPS sul nanomateriale ottenuto per via tradizionale, indicando che la diversa via sintetica porta solo ad un diverso caricamento della protoporfirina IX sull'halloysite e dunque rappresenta la procedura sintetica ottimale per la sintesi di questa tipologia di nanomateriali.

Tabella 1. Percentuale degli atomi C, N e O e dei diversi gruppi funzionali per i nanomateriali **HNT-1** e **HNT-2**

	HNT-1	HNT-2
C%	45	45
C=C	64	64
C=O/C=N	30	31
O-C=O	6	5
N%	3	2
C-N-C	59	61
C=N	30	28
N-C	11	11
O%	52	53
O-Si-O	87	86
O-Al-O	11	12
C=O	2	2

Le proprietà colloidali dei nanomateriali ottenuti sono state studiate mediante misure DLS. Questi studi consentono di valutare le proprietà strutturali dei nanomateriali analizzando la loro mobilità in acqua e misurando il coefficiente medio di diffusione traslazionale. Quest'ultimo tiene conto delle dimensioni, della forma e della sfera di idratazione delle particelle che diffondono in ambiente acquoso, ma tiene anche in considerazione potenziali fenomeni di aggregazione.⁸² Dall'analisi DLS, tramite l'equazione di Stokes-Einstein (Eq. 1), è possibile calcolare il diametro idrodinamico apparente (D_h) dei nanomateriali, che dà un'idea delle dimensioni dei nanomateriali in esame e dell'esistenza di eventuali fenomeni di aggregazione tra di essi.

$$D = \frac{kT}{6\pi r\eta} \quad (Eq. 1)$$

Dove D è il coefficiente di diffusione, k è la costante di Boltzmann, T è la temperatura assoluta del sistema, r è il raggio idrodinamico della particella, che si assume essere sferica, η è la viscosità del fluido o del mezzo in cui avviene la diffusione. È stato riscontrato che il nanomateriale **HNT-1** presenta un valore di D_h prossimo a quello di HNT indicando una simile diffusione in mezzi acquosi. Al contrario **HNT-2** presenta un valore di D_h maggiore

indicando la presenza di una struttura più organizzata in accordo con quanto ipotizzato in seguito alla sintesi (Tabella 2).

Misure di potenziale ζ hanno mostrato, in entrambi i casi, che i nanomateriali sintetizzati mostrano valori di potenziale ζ più negativi rispetto alla sola halloysite (Tabella 2), attribuibili alla presenza di gruppi carbossilati nel cuore porfirinico sulla superficie esterna di HNT che non hanno reagito alla reazione *thiol-ene*.

Tabella 2. Misure di DLS e potenziale ζ dei nanomateriali HNT, **HNT-1** e **HNT-2**

	Dimensione media (nm)	Potenziale ζ (mV)
HNT	295 ± 16	-18 ± 1
HNT-1	293 ± 12	-22 ± 1
HNT-2	471 ± 13	-25 ± 1

La morfologia dei due nanomateriali è stata investigata tramite *High Angular Annular Dark Field - Scanning Transmission Electron Microscopy* (HAADF-STEM) e tramite microscopia a trasmissione elettronica (TEM), accoppiata con spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDX) (Figura 24).

Si può osservare come in entrambi i casi, in seguito alla reazione *thiol-ene*, la struttura tubolare dell'halloysite sia stata preservata. Infatti, entrambi i nanomateriali esibiscono la caratteristica struttura tubolare cava dell'halloysite ma con morfologia diversa a seconda della strategia sintetica utilizzata. Le immagini TEM (Figura 24A, E) mostrano chiaramente le diverse morfologie dei nanomateriali ottenuti con i due approcci sintetici. La Figura 24A mostra la morfologia del nanomateriale ottenuto per irraggiamento UV. Come è possibile osservare, le molecole organiche sono uniformemente distribuite sulla superficie esterna di HNT, come mostrato dalla mappatura elementale che evidenzia gli atomi di azoto (Figura 24B-C) estrapolati mediante sonda EDX. Le misure EDX (Figura 24D) mostrano anche la presenza di atomi di C e N, accanto agli elementi tipici dell'halloysite. Tutte queste evidenze confermano ulteriormente l'avvenuta funzionalizzazione. Al contrario, il nanomateriale ottenuto per irraggiamento alle microonde mostra una struttura ben organizzata (Figura 24E). Ciò conferma l'ipotesi discussa precedentemente in cui si è pensato che, oltre alla reazione *thiol-ene* tra il nanomateriale **HNT-SH** e la PPIX, quest'ultima possa reagire con sé stessa attraverso una reazione *ene-ene*, creando un ponte tra diversi tubi. La mappatura elementale degli atomi di N mostra che questi ultimi sono uniformemente distribuiti sulla

superficie di HNT e tra i diversi tubi (Figure 24F e 24G). Anche l'indagine EDX ha mostrato gli elementi sia della parte organica che dell'halloysite (Figura 24H).

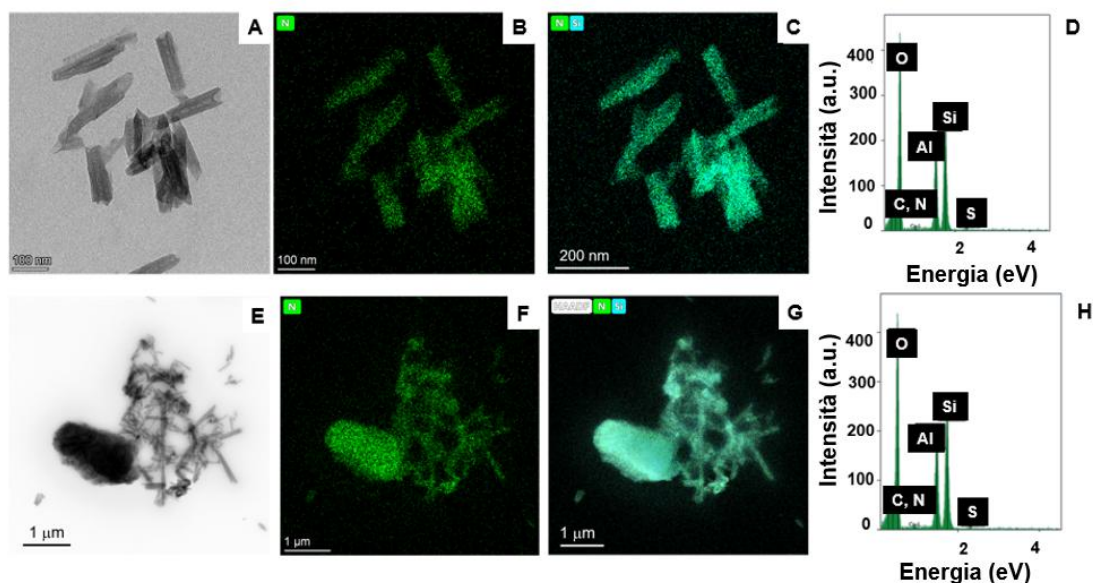


Figura 24. (A) TEM, (B-C) mappature elementali ottenute tramite EDX, (D) spettro EDX di **HNT-1**; (E) TEM, (F-G) mappature elementali ottenute tramite EDX, (H) spettro EDX di **HNT-2**

Sono stati effettuati ulteriori caratterizzazioni e studi sul nanomateriale **HNT-2** ottenuto tramite irradiazione alle microonde. Un'ulteriore conferma dell'avvenuta modifica della superficie esterna dell'halloysite con la protoporfirina IX è stata fornita dallo studio delle proprietà spettroscopiche UV-vis e di fluorescenza del nanomateriale **HNT-2**. Lo studio delle proprietà fotofisiche di **HNT-1** è riportata in Appendice 1.

In Figura 25 è riportato lo spettro di assorbimento UV-vis di una dispersione di **HNT-2** in DMSO, che mostra le caratteristiche bande di assorbimento di PPIX. È possibile riscontrare la banda di Soret a ca. 400 nm e le quattro bande Q nell'intervallo 500-700 nm.⁸³ Come è possibile osservare nello spettro, quest'ultime non sono ben definite, se confrontate con quelle della sola PPIX nello stesso solvente, a causa dello *scattering* dell'argilla.⁸⁴ Inoltre, dal confronto della banda di Soret della PPIX con quella della stessa ancorata sugli HNT è possibile osservare come questa, in seguito al legame covalente con l'argilla abbia subito uno *shift* batocromico di ca. 10 nm. Come noto in letteratura, lo spostamento verso il rosso del massimo di assorbimento delle porfirine, è attribuito ad un aumento dell'acidità dell'intorno chimico della molecola.⁸⁵ Poiché la superficie esterna dell'halloysite possiede caratteristiche acide,⁸⁶ lo spostamento della lunghezza d'onda di assorbimento della PPIX nel nanomateriale **HNT-2** fornisce un'ulteriore conferma del suo legame covalente con l'argilla. Lo spettro di fluorescenza del nanomateriale mostra un'intensa emissione tra 590 e 700 nm, con un massimo che si registra a 630 nm, in maniera simile alla sola PPIX.

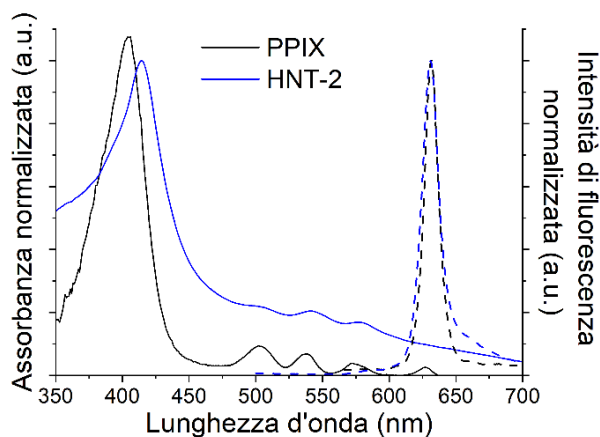


Figura 25. Spettri di assorbimento (linea continua) e di emissione (linea tratteggiata) della PPIX e del nanomateriale **HNT-2** (1 mg mL^{-1} , DMSO)

2.1.2. Interazione con cationi metallici

Il nanomateriale **HNT-2** è stato utilizzato per valutare la complessazione con dei cationi metallici divalenti, tra i quali Co(II) , Cu(II) e Zn(II) , tramite titolazione spettrofluorimetrica, al fine di verificare che il legame covalente della PPIX con gli HNT non influenzi le proprietà complessanti della porfirina. In figura 26 sono riportati gli spettri di fluorescenza delle titolazioni del materiale **HNT-2** con ioni Co^{2+} (Figura 26a), Cu^{2+} (Figura 26b) e Zn^{2+} (Figura 26c). Infatti, la cavità delle porfirine è in grado di complessare la maggior parte degli ioni metallici per formare le metalloporfirine. Queste molecole possiedono proprietà fotofisiche particolarmente vantaggiose, tra cui l'assorbimento e l'emissione a lunghezze d'onda elevate, un'elevata efficienza nella generazione di ossigeno singoletto e una ridotta tossicità *in vivo*. Tali caratteristiche hanno suscitato l'interesse per potenziali applicazioni in ambito biomedico, in particolare possono essere utilizzate come agenti di contrasto per la risonanza magnetica, come fotosensibilizzatori nella terapia fotodinamica, come agenti per il *bioimaging* e in altre applicazioni biomediche.⁸⁷ Tra le diverse metalloporfirine, le cobalto-porfirine (CoPP), sono coinvolte nella sovraregolazione dell'espressione della proteina citoprotettiva eme-ossigenasi-1 in vari tipi di cellule, aumentando quindi la loro resistenza allo stress ossidativo e attenuando diversi tipi di malattie.⁸⁸ Invece, le zinco-porfirine sono state usate come piattaforma di *imaging* molecolare a doppia funzione per l'*imaging* a fluorescenza e per la risonanza magnetica.⁸⁹ Anche le porfirine di rame sono state studiate per le applicazioni nella terapia fotodinamica e come leganti del DNA. Inoltre, la tomografia a emissione di positroni (PET), nell'ambito della medicina nucleare, impiega complessi di porfirine chelati con ^{64}Cu ed è considerata una delle terapie guidate da immagini per il trattamento del cancro.⁹⁰

Come si può osservare l'intensità dei picchi di emissione, in tutti i casi studiati, decresce all'aumentare della concentrazione degli ioni metallici indicando un'interazione tra gli stessi e la porfirina. È interessante notare come non si sia osservato alcun spostamento della lunghezza d'onda di emissione, escludendo la formazione di ecciplessi, come riportato in letteratura per studi su molecole di PPIX libere,⁹¹ indicando ancora una volta la validità della strategia sintetica proposta.

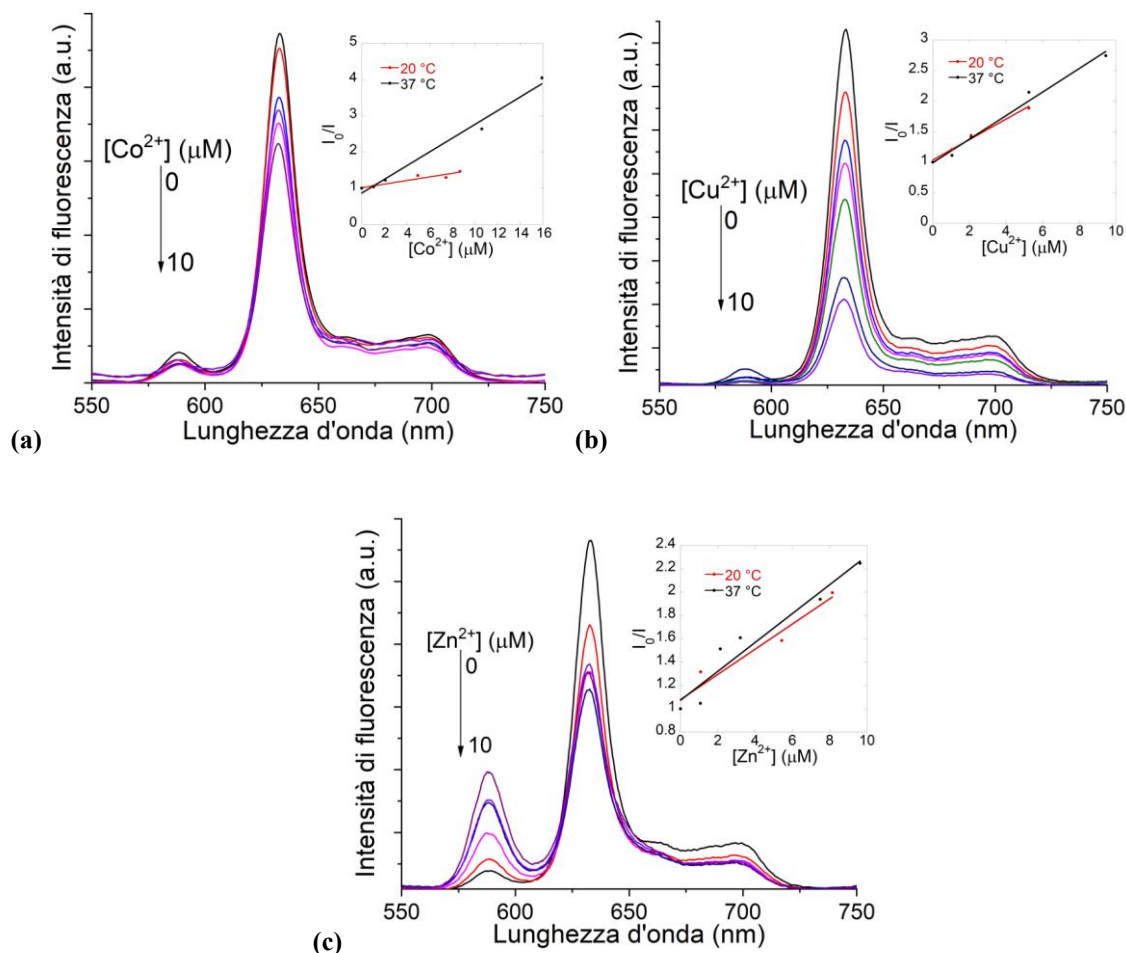


Figura 26. Andamento della fluorescenza della dispersione di **HNT-2** (0.1 mg mL⁻¹) all'aggiunta di diverse concentrazioni di ioni metallici (a) Co²⁺, (b) Cu²⁺ e (c) Zn²⁺ in metanolo. L'inserto mostra il grafico Stern-Volmer della fluorescenza di **HNT-2** in presenza degli ioni metallici a due diverse temperature

Al fine di studiare la tipologia di *quenching*, che si verifica in seguito alla complessazione degli ioni metallici ad opera del nanomateriale, questo è stato ulteriormente analizzato utilizzando l'equazione di Stern-Volmer a due diverse temperature (20 e 37 °C):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (Eq. 2)$$

dove I_0 e I sono le intensità di fluorescenza del nanomateriale **HNT-2** rispettivamente in assenza o in presenza di ioni metallici, $[Q]$ è la concentrazione di ioni metallici e K_{SV} è la costante di *quenching*. Come mostrato negli inserti della Figura 26, l'andamento ottenuto

riportando il valore di I_0/I in funzione di $[Q]$ mostra, in tutti i casi studiati, un andamento lineare, da cui è stato possibile ricavare il valore di K_{SV} . I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3. Come si può osservare, tale valore aumenta all'aumentare della temperatura per ogni singolo caso, indicando che il processo di *quenching* è dinamico.⁹²

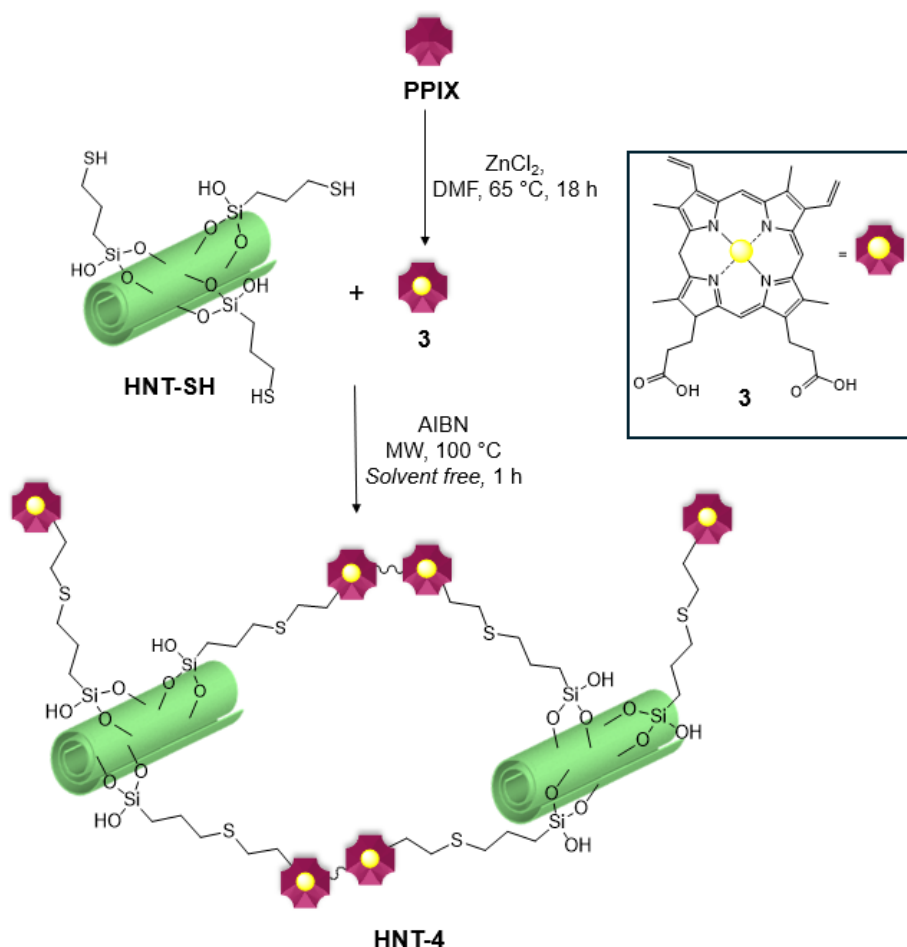
Tabella 3. K_{SV} del processo di *quenching* degli ioni $Co(II)$, $Cu(II)$ e $Zn(II)$ a due diverse temperature

Ioni metallici	Temperatura (°C)	K_{SV} ($10^5 M^{-1}$)
Co^{2+}	20	0.49
	37	1.89
Cu^{2+}	20	1.67
	37	1.92
Zn^{2+}	20	1.08
	37	1.24

Una volta confermato che le capacità complessanti della PPIX vengono mantenute in seguito al legame covalente con gli HNT, si è deciso di sintetizzare un nuovo nanomateriale, utilizzando come fotosensibilizzante una zinco porfirina, poiché è noto in letteratura che le zinco porfirine mostrano proprietà biologiche e fotodinamiche superiori se comparate alle semplici.

2.1.3. Sintesi e caratterizzazione del sistema halloysite-metallo porfirina

Per quanto precedentemente detto, al fine di ottenere un materiale a base di halloysite legato covalentemente ad una zinco-porfirina si è prima provveduto alla sintesi di quest'ultima. Tale sintesi è stata realizzata mediante complessazione della PPIX con cloruro di zinco.⁹³ Questa è stata successivamente fatta reagire con il nanomateriale **HNT-SH** in condizioni analoghe a quelle precedentemente descritte (Schema 2). Dopo il *work-up*, il nanomateriale **HNT-4** ha mostrato, come stimato tramite TGA, un grado di funzionalizzazione di 0.32 mmol g^{-1} che corrisponde ad una percentuale di caricamento della porzione organica, rispetto al precursore **HNT-SH** del 12.0 %p/p (con un grado di funzionalizzazione pari a 0.16 mmol g^{-1}) (Figura 27a). Tale valore risulta nettamente superiore rispetto al grado di funzionalizzazione di **HNT-2** (grado di funzionalizzazione dello 0.07 mmol g^{-1}) e questo potrebbe essere dovuto alla maggiore reattività di **3** rispetto a PPIX che potrebbe portare alla formazione di nanomateriali con strutture più complesse. Infatti, a seguito del maggior grado di funzionalizzazione ottenuto, si è ipotizzato, come verrà confermato in seguito, che oltre al singolo tubo modificato ci potessero essere delle strutture in cui una o più metallo porfirine si trovano a ponte tra due tubi.



Schema 2. Rappresentazione schematica della struttura ipotizzata per il nanomateriale **HNT-4** ottenuto dalla sintesi tra **HNT-SH** e **3**

Tale ipotesi è stata verificata tramite misure DLS, le quali hanno mostrato un D_h del nanomateriale **HNT-4** di ca. 1061 ± 57 nm, indicando la diffusione in ambiente acquoso, di nanomateriali più grandi, in accordo con la struttura sopra ipotizzata.

L'avvenuta funzionalizzazione è stata anche confermata tramite spettroscopia FT-IR (Figura 27b). Anche in questo caso, lo spettro FT-IR del nanomateriale **HNT-4** presenta le tipiche bande degli HNT e della PPIX come sopra discusso.^{78, 79}

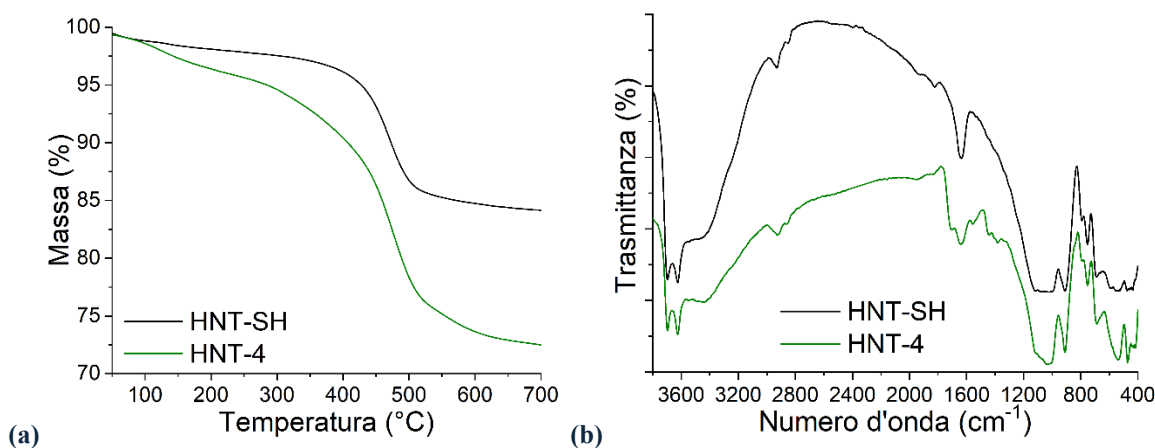


Figura 27. (a) Curve termogravimetriche di **HNT-SH** e **HNT-4**, (b) spettri FT-IR di **HNT-SH** e **HNT-4**

Le immagini TEM riportate in Figura 28 mostrano che da un punto di vista morfologico il nanomateriale **HNT-4** presenta, ancora una volta, la tipica struttura tubulare dell'halloysite organizzata in strutture più compatte in cui il composto **3** è uniformemente distribuito sulla superficie degli HNT, come mostrato dalla mappatura elementare EDX (Figura 28). Le analisi EDX mostrano non solo la presenza di atomi di C e N della protoporfirina, e confermano la presenza dello zinco, oltre agli elementi tipici dell'halloysite.

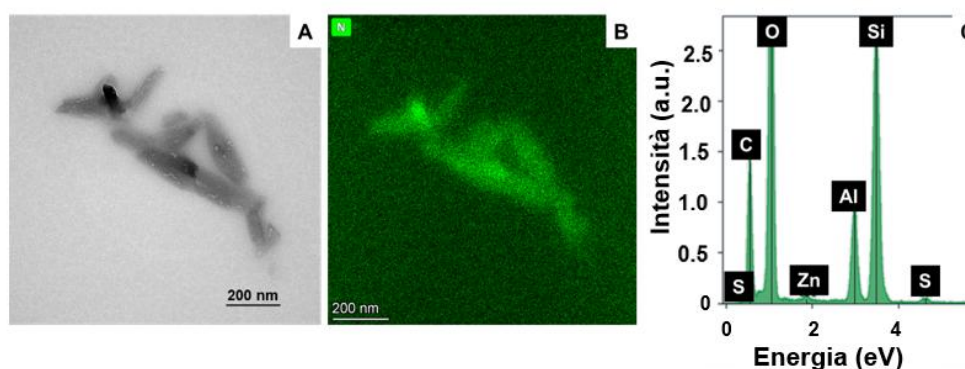


Figura 28. (A) TEM, (B) mappature elementali ottenute tramite EDX, (C) spettri EDX di **HNT-4**

Da un punto di vista delle proprietà fotofisiche, analogamente a quanto osservato per il nanomateriale **HNT-2**, una dispersione del nanomateriale **HNT-4** in DMSO, presenta le tipiche caratteristiche di assorbimento ed emissione di **3** (Figura 29).⁴³ In particolare lo spettro UV-vis presenta la tipica banda di Soret a ca. 418 nm e due bande Q a ca. 546 e 581 nm,⁹⁴ mentre lo spettro di fluorescenza mostra la tipica banda di emissione della porfirina a ca. 590 nm e un'ulteriore banda a ca. 630 nm, derivante da processi di trasferimento elettronico tra il sistema π della porfirina e lo ione Zn^{2+} .

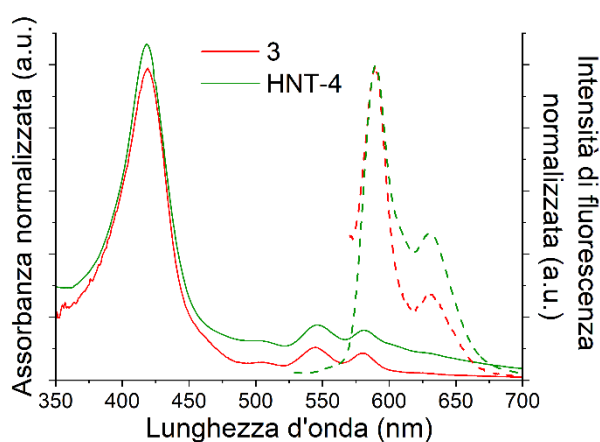


Figura 29. Spettri di assorbimento (linea continua) e di emissione (linea tratteggiata) di **3** e del nanomateriale **HNT-4** (1 mg mL^{-1} , DMSO)

2.1.4. Studio dell'attività fotosensibilizzante di HNT-2 e HNT-4

Ad oggi, come precedentemente descritto, la PPIX è una delle molecole più utilizzate come fotosensibilizzatore per la terapia fotodinamica. Per verificare che, una volta immobilizzata sulla superficie esterna degli HNT, essa, continui a mostrare proprietà fotodinamiche sono stati condotti degli esperimenti, sia dal punto di vista chimico che biologico.

Dal punto di vista chimico la capacità di generare $^1\text{O}_2$ sia del nanomateriale **HNT-2** che di **HNT-4** si può determinare tramite sonde specifiche le cui proprietà chimico-fisiche, quali ad esempio le proprietà fotofisiche, vengono modificate in seguito a reazione con specie ROS generate in soluzione. Nel caso della PPIX, la sonda più comunemente utilizzata è l'1,3-difenilisobenzofurano (DPBF). Il DPBF mostra infatti uno spettro di assorbimento caratterizzato dalla presenza di un massimo a ca. 415 nm. A seguito di reazione con l' $^1\text{O}_2$, si forma un endoperossido attraverso una reazione di cicloadizione [4+2] (Figura 30) che decomponendosi origina l'1,2-dibenzoilbenzene (DBB), con proprietà spettrali diverse rispetto al DPBF.⁹⁵ Dunque, mediante analisi spettroscopica, è possibile determinare la presenza o meno di ROS in soluzione, e quindi stimare le proprietà fotodinamiche di una determinata specie.

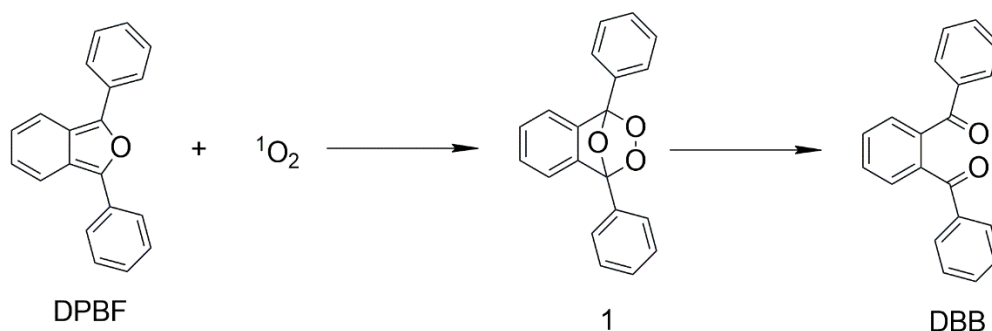


Figura 30. Reazione di $^1\text{O}_2$ con DPBF

Nello specifico è stato quindi monitorato il cambiamento dello spettro di assorbanza del DPBF durante l'irradiazione con laser a 650 nm (200 mW) (Figura 31). L'intensità del segnale di assorbanza del DPBF mostra una progressiva diminuzione in presenza dei nanomateriali (utilizzati alle concentrazioni di 0.5 mg mL^{-1} per **HNT-2** e 0.1 mg mL^{-1} per **HNT-4**, corrispondenti ad una concentrazione di 0.02 mM); ciò suggerisce che durante l'irraggiamento dei nanomateriali sia stato prodotto $^1\text{O}_2$ e che questo abbia reagito con il DPBF portando, come già detto, alla formazione del DBB.

Al contrario, in assenza dei nanomateriali **HNT-2** e **HNT-4**, l'assorbanza del DPBF rimane invariata. Un comportamento analogo è stato osservato anche in presenza dei soli HNT, confermando che la componente attiva responsabile della generazione di ossigeno singoletto

è riconducibile alla presenza dei fotosensibilizzatori PPIX e **3** legati sulla superficie esterna dell'halloysite.

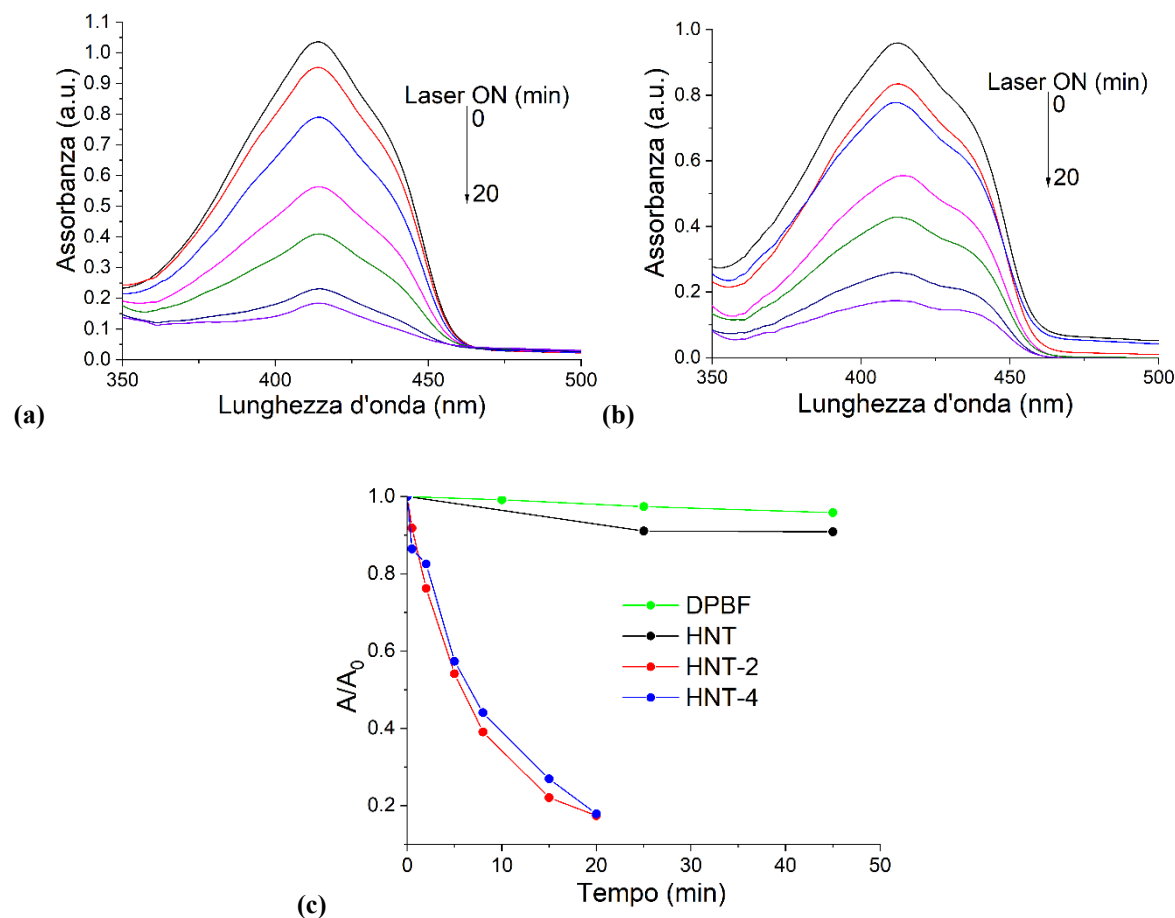


Figura 31. Spettri di assorbimento di dispersioni di DPBF e **HNT-2** (a) o **HNT-4** (b) in DMSO durante irradiazione a 650 nm per 20 minuti. (c) Grafico delle variazioni dell'assorbanza del DPBF a 413 nm rispetto al tempo di irradiazione in assenza (controllo) e in presenza di HNT, **HNT-2** o **HNT-4** in DMSO

Dalla pendenza della retta che si ottiene riportando in un grafico la variazione di assorbanza del DPBF in funzione del tempo di irradiazione è possibile calcolare la resa quantica di produzione di ossigeno singoletto ($\Phi_{\Delta(^1O_2)}$), utilizzando come standard di riferimento il blu di metilene (MB) ($\Phi_{\Delta(^1O_2)_{MB}} = 0.52$ in DMSO).^{96, 97} Le rese quantiche dell'ossigeno singoletto sono state calcolate secondo la seguente equazione:

$$\Phi_{\Delta(^1O_2)_{nanomateriale}} = \Phi_{\Delta(^1O_2)_{MB}} \times \frac{S_{nanomateriale} \times F_{MB}}{S_{MB} \times F_{nanomateriale}} \quad (Eq. 3)$$

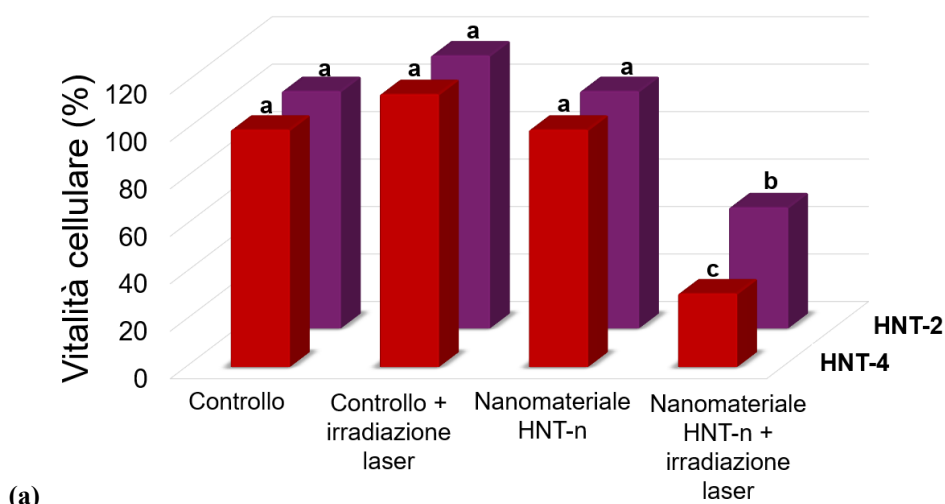
dove $\Phi_{\Delta(^1O_2)_{nanomateriale}}$ è la resa quantica di ossigeno singoletto per i due nanomateriali e $\Phi_{\Delta(^1O_2)_{MB}}$ rappresenta la resa quantica di ossigeno singoletto di MB ($\Phi_{\Delta(^1O_2)_{MB}} = 0.52$ in DMSO). S è la pendenza della retta della differenza di assorbanza del DPBF (413 nm) al variare del tempo di irradiazione e F è il fattore di correzione dell'assorbanza, il quale è dato da $F = 1 - 10^{-OD}$ (OD alla lunghezza di irradiazione di 650 nm). I valori di $\Phi_{\Delta(^1O_2)}$ trovati sono

stati pari a 0.20 e 0.45 rispettivamente per **HNT-2** e **HNT-4**, mostrando una maggiore produzione di $^1\text{O}_2$ da parte del materiale funzionalizzato con la zinco porfirina rispetto a quello con la sola porfirina.⁹⁸ Ciò ha confermato che la complessazione degli ioni Zn^{2+} nella protoporfirina IX, nel composto **3**, amplifica l'efficienza dell'effetto fotosensibilizzante, rendendo il nanomateriale **HNT-4** più promettente per le applicazioni in PDT.

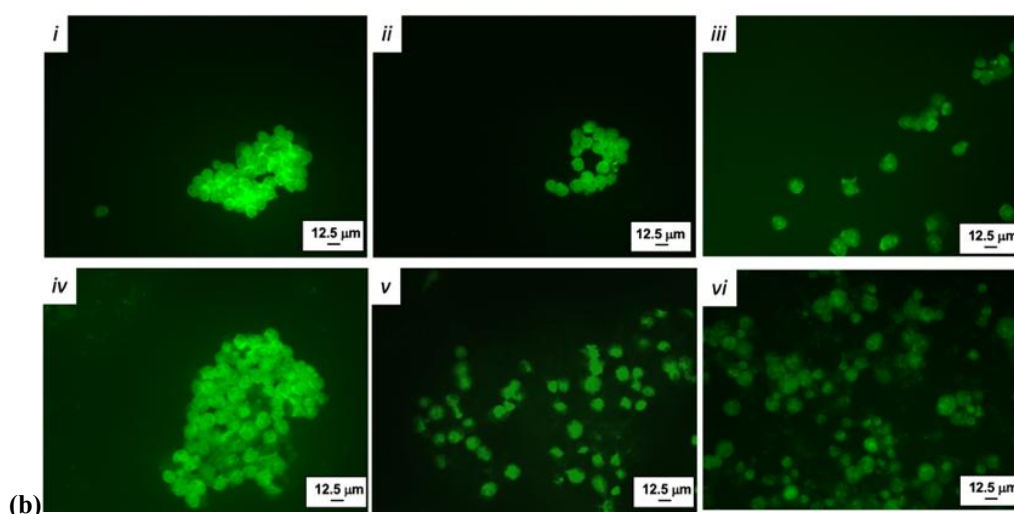
Dal punto di vista biologico, la fototossicità dei nanomateriali sintetizzati è stata studiata su linee cellulari di leucemia multifarmaco-resistenti (HL-60R) mediante saggio MTS in assenza o in presenza di luce. Sono state scelte queste cellule perché, essendo una linea cellulare in sospensione, possono essere irradiate in modo più efficiente nelle condizioni sperimentali scelte. Inoltre, essendo una linea cellulare farmacoresistente, rappresenta un modello più “completo” per valutare l'efficacia del trattamento. Infine, le cellule HL-60R hanno un tempo di duplicamento relativamente breve (circa 24 h), che le rende ideali per esperimenti a breve termine.

Inizialmente, le cellule HL-60R sono state incubate con **HNT-2** e **HNT-4** per 24 h al buio. Come mostrato nella Figura 32a, non è stato osservato alcun impatto significativo sulla vitalità cellulare, suggerendo che entrambi i nanomateriali sono biocompatibili in assenza di luce e possono essere utilizzati come potenziali fotosensibilizzatori per la PDT.⁹⁹ Al contrario, dopo irradiazione laser (650 nm, 5 min, 200 mW), in presenza di entrambi i nanomateriali, si è osservata una significativa diminuzione della vitalità cellulare, indicando che la combinazione nanomateriali/laser è in grado di esercitare fototossicità. È interessante notare che la vitalità cellulare risulta ca. tre volte più bassa in presenza del nanomateriale **HNT-4** confermando ulteriormente le maggiori proprietà fotodinamiche delle metallo porfirine rispetto alle sole porfirine.

Al fine di studiare ulteriormente gli effetti antiproliferativi fotoindotti dai materiali sintetizzati, sono stati studiati i cambiamenti morfologici delle cellule prima e dopo l'irradiazione laser mediante colorazione delle stesse con arancio di acridina (Figura 32b). Come si può osservare dalla Figura 32bi, le cellule del gruppo di controllo, trattate con il laser (Figura 32bii) o con entrambi i nanomateriali **HNT-2** (0.95 mg mL^{-1}) e **HNT-4** (0.16 mg mL^{-1}) sono vive ed emettono una fluorescenza verde in una struttura circolare che mostra una struttura cromatinica organizzata. Al contrario, dopo l'irradiazione laser ed in presenza dei nanomateriali (Figura 32biv e 32bvi, rispettivamente), sono state identificate cellule precocemente apoptotiche, in quanto presentano una condensazione della cromatina nucleare sotto forma di macchie verdi dense, frammentazione nucleare e perdita della funzione di membrana.



(a)



(b)

Figura 32. (a) Valutazione della citotossicità dopo trattamento con controllo, controllo laser, **HNT-2** e **HNT-4** sotto irradiazione laser. I dati rappresentano le medie $\pm$ deviazioni standard (SD) di 3 esperimenti indipendenti. In ogni grafico, le lettere diverse sopra ogni colonna indicano differenze significative ($p < 0.05$) nella vitalità cellulare; (b) immagini rappresentative di microscopia a fluorescenza dei cambiamenti morfologici nei nuclei delle cellule HL-60R analizzati mediante colorazione con arancio di acridina; (ingrandimento 40 $\times$); i) controllo, ii) controllo laser; iii) **HNT-2**; iv) **HNT-2** + laser; v) **HNT-4** e vi) **HNT-4** + laser

2.1.5. Film nanocompositi a base di chitosano e halloysite

Viste le proprietà mostrate dai due nanomateriali sintetizzati **HNT-2** e **HNT-4**, al fine di sviluppare un potenziale sistema nanocomposito per la terapia fotodinamica per il trattamento di tumori della pelle, questi sono stati impiegati come *filler* di film di chitosano. Polimeri nanocompositi ottenuti dalla combinazione di un biopolimero con *filler* inorganici, quali appunto le argille, rappresentano infatti una classe di materiali che negli anni ha trovato applicazione in diversi campi, grazie alle notevoli *performance* meccaniche che essi presentano. È noto in letteratura che l'introduzione di HNT in biopolimeri porta all'ottenimento di nanocompositi con migliori proprietà meccaniche e termiche rispetto al

polimero di partenza.⁶⁵ Il chitosano in particolare, essendo un biopolimero cationico, potrebbe interagire maggiormente con i nanomateriali **HNT-2** e **HNT-4** grazie all'instaurarsi di interazioni di tipo legame a idrogeno favorevoli tra i gruppi ammonio o idrossilici e i gruppi carbossilati presenti sulla superficie esterna dei nanotubi di halloysite risultando in un film nanocomposito con *performance* meccaniche migliori rispetto al solo chitosano (Figura 33).

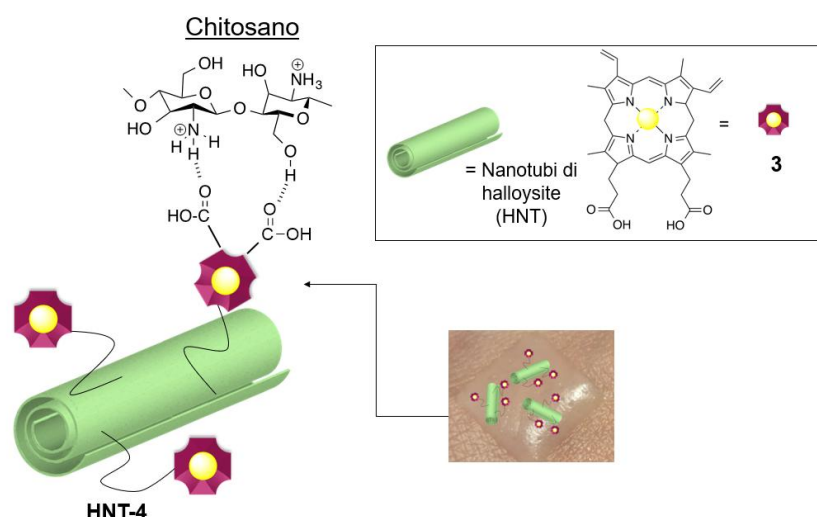


Figura 33. Possibili interazioni tra il chitosano e il nanomateriale **HNT-4** nel nanocomposito

I film di chitosano contenenti **HNT-2** e **HNT-4** sono stati ottenuti per *casting* utilizzando una quantità di *filler* pari al 5% rispetto al peso di chitosano (Figura 34). Di tali film sono state quindi studiate le proprietà meccaniche tramite analisi meccanica dinamica (DMA).

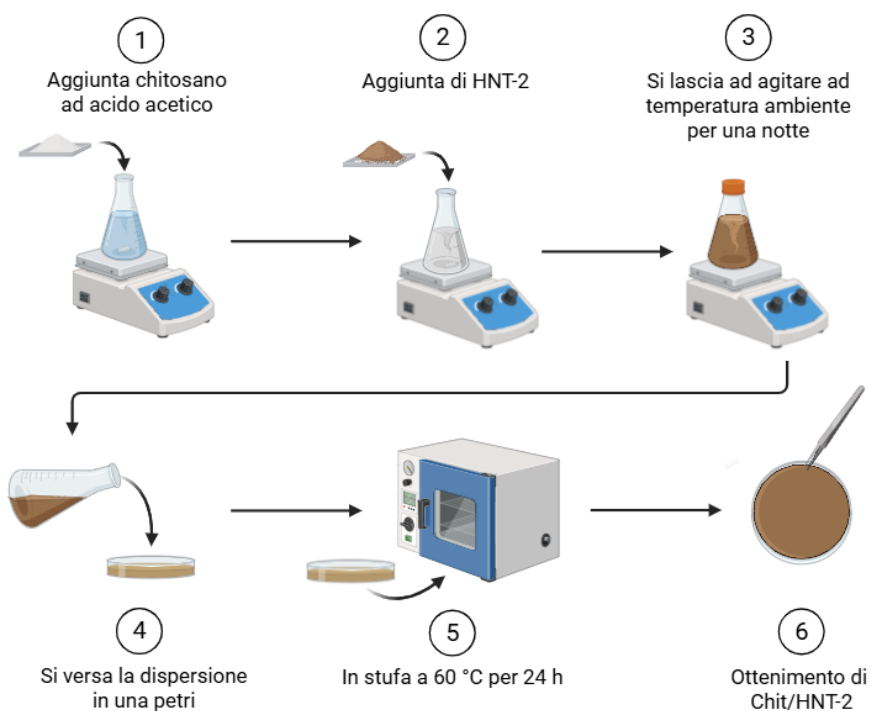


Figura 34. Schematizzazione della preparazione del film a base di chitosano e **HNT-2**

In Figura 35a sono riportate le curve sforzo-deformazione presenti in letteratura del solo chitosano e del film nanocomposito **Chit/HNT**¹⁰⁰ per confronto, in Figura 35b vi sono le curve sforzo-deformazione dei film nanocompositi **Chit/HNT-2** e **Chit/HNT-4**.

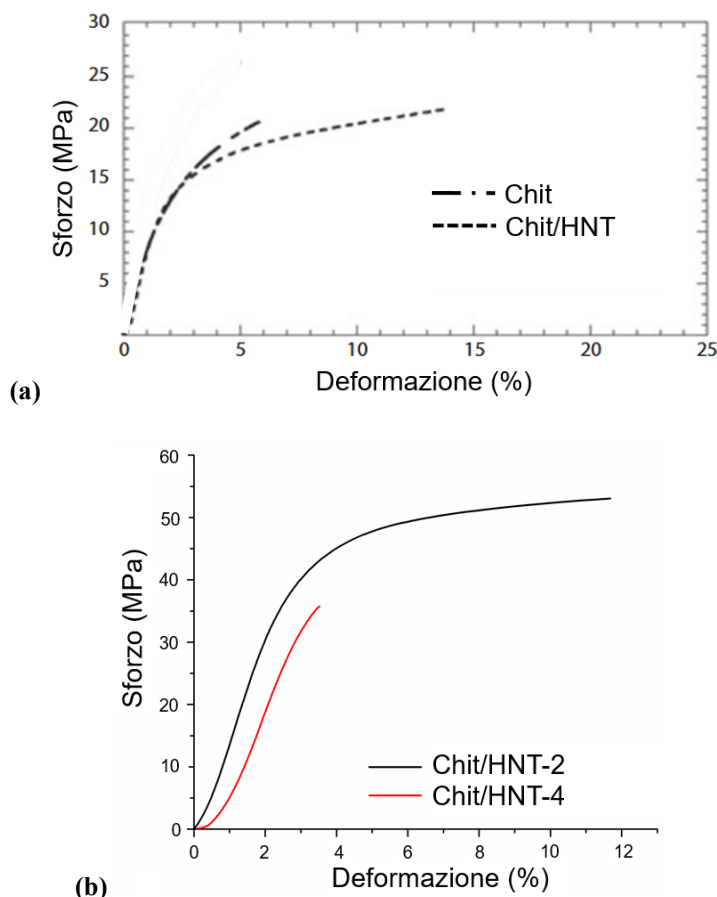


Figura 35. (a) Curve sforzo-deformazione per film di chitosano e film nanocomposito di **Chit/HNT**¹⁰⁰ (b) Curve sforzo-deformazione per film nanocompositi di **Chit/HNT-2** e **Chit/HNT-4**

Le proprietà di trazione sono state studiate in termini di modulo elastico (E), sforzo al punto di rottura (σ_r) e allungamento massimo (ε_r). I risultati ottenuti sono mostrati in Tabella 4, dove sono riportati i dati dei film nanocompositi **Chit/HNT**, **Chit/HNT-2** e **Chit/HNT-4**, e per confronto quelli del solo chitosano.

Come si può osservare il film **Chit/HNT-4** presenta i valori più bassi per tutti i parametri di trazione mentre il film **Chit/HNT-2** presenta valori di E ed σ_r simili a quelli del solo chitosano, mentre ε_r è significativamente ridotto, in maniera analoga a quanto riportato per **Chit/HNT**. Nel caso del film **Chit/HNT-4**, il valore basso di modulo elastico è indice dell'ottenimento di un film nanocomposito più flessibile rispetto agli film ottenuti e che dunque potrebbe risultare promettente per applicazioni topiche.

Tabella 4. Modulo elastico, sforzo al punto di rottura e allungamento massimo dei film a base di chitosano

	E (MPa)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
Chit	1805	55.1	28.1
Chit/HNT	1785	54.1	12.1
Chit/HNT-2	1799	56.1	11.6
Chit/HNT-4	1327	35.7	3.52

Al fine di comprendere meglio la disposizione dei nanomateriali nei film ottenuti, sono stati condotti degli studi morfologici tramite microscopio a forza atomica (AFM). L'analisi topografica riportata in Figura 36 (e in Appendice 1) mostra in tutti i casi la formazione di uno strato omogeneo di chitosano con i nanotubi di halloysite uniformemente distribuiti in esso.

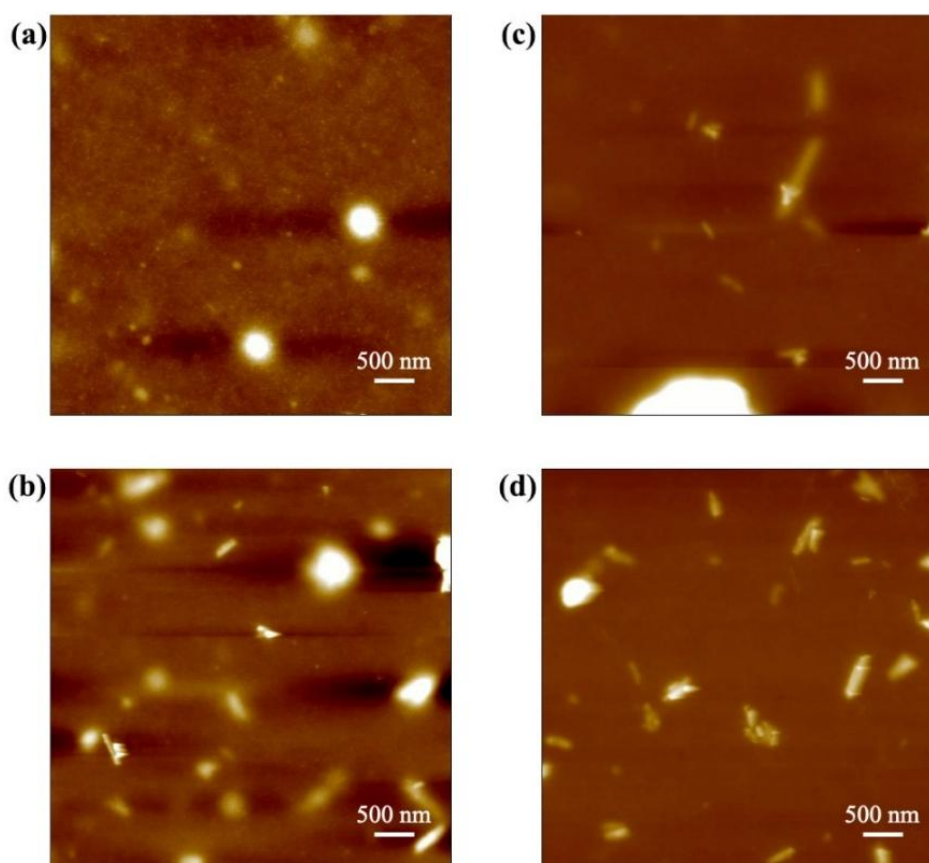
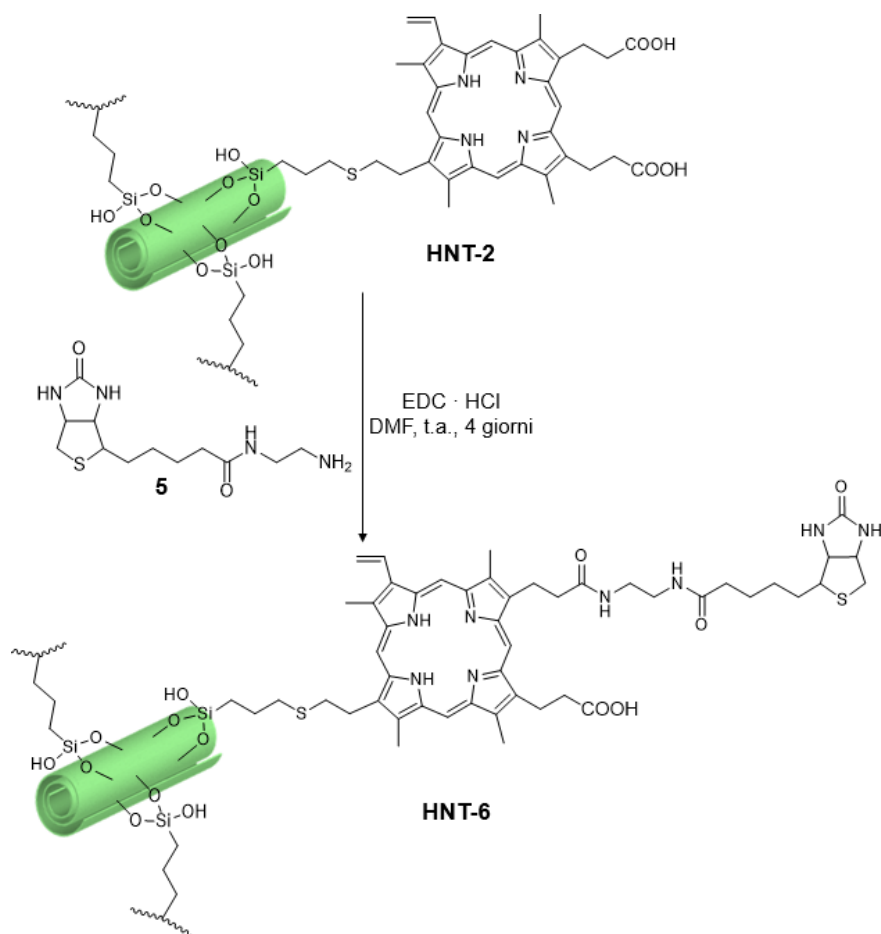


Figura 36. Immagine AFM di (a) Chit, (b) Chit/HNT, (c) Chit/HNT-2, (d) Chit/HNT-4

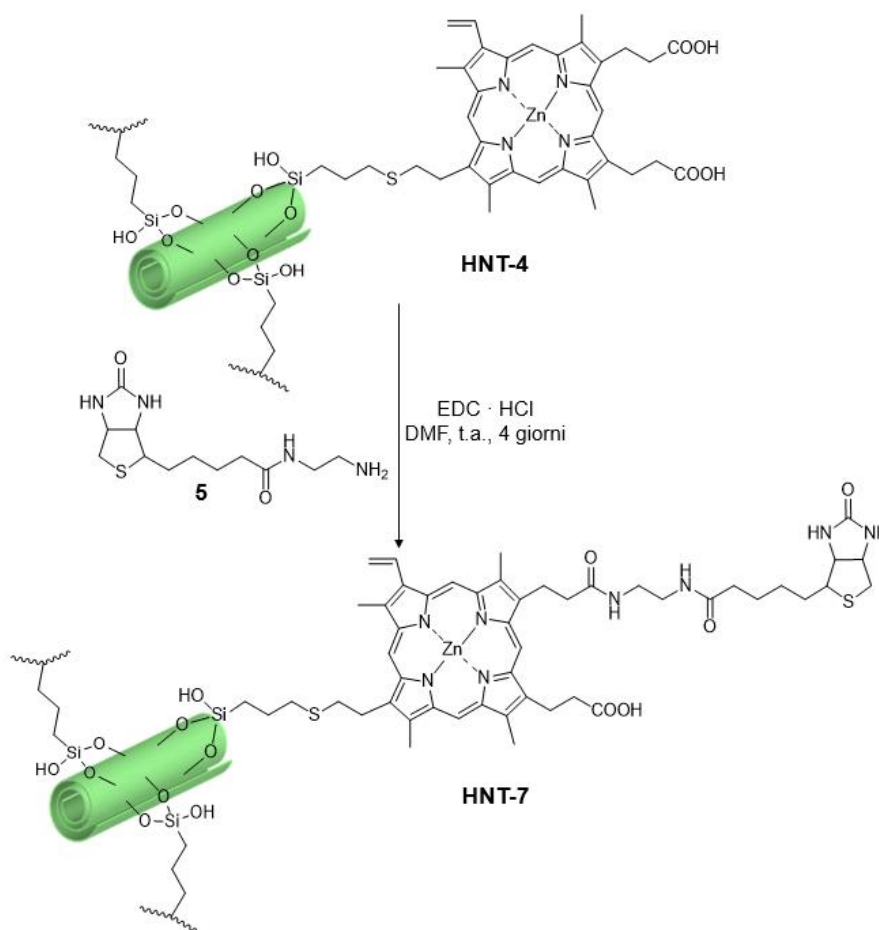
2.1.6. Ancoraggio di biotina ai nanomateriali HNT-2 e HNT-4

Ai fini di ottenere un sistema per il *drug delivery* per future applicazioni in ambito biomedico i nanomateriali **HNT-2** e **HNT-4**, che posseggono ancora dei gruppi carbossilici liberi, sono stati post-modificati usando la biotina come molecola *target*.¹⁰¹ Quest'ultima è un micronutriente essenziale per la proliferazione cellulare. Dal momento che, al contrario delle cellule sane, quelle tumorali sovraesprimono i recettori per la biotina,¹⁰² ciò potrebbe facilitare l'endocitosi mediata dal recettore nelle cellule tumorali. Per tale scopo i due nanomateriali sono stati fatti reagire con una biotina opportunamente modificata, la 2'-aminoetilammide biotina (**5**) in DMF in presenza di 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC) come agente condensante, come riportato negli Schemi 3 e 4. Dopo il *work-up* i nanomateriali **HNT-6** e **HNT-7**, ottenuti rispettivamente a partire da **HNT-2** e **HNT-4**, sono stati analizzati mediante TGA, la quale ha permesso di stimare un caricamento pari all'1.0 %p/p e all'1.5 %p/p. Considerando quindi il rapporto stechiometrico tra i gruppi carbossilici liberi presenti nei materiali di partenza e la funzionalizzazione in seguito alla reazione con la biotina 2'-aminoetilammide, si evince che non tutti i gruppi -COOH hanno reagito.



Schema 3. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale biotinilato **HNT-6**

L'avvenuta post-modifica è stata ancora una volta verificata tramite spettroscopia FT-IR (Figura 37). Dal confronto tra gli spettri di **HNT-2** e **HNT-6**, si riscontrano delle differenze dovute alla presenza della biotina. Come si può osservare dalla Figura 37a, lo spettro FT-IR di **6** mostra le bande di vibrazione tipiche della biotina, tra le quali si hanno quelle relative ai moti di *stretching* e di deformazione dei gruppi $\text{-CH}_2\text{-}$ a ca. 2930 e 2845 cm^{-1} , la banda di deformazione del legame C-O a 1639 cm^{-1} e il corrispondente *stretching* C=O a 1481 cm^{-1} . Infine, si possono riscontrare le vibrazioni dovute alle deformazioni dello scheletro C-C della biotina (tra 1316 cm^{-1} e 1269 cm^{-1} circa).¹⁰³ Anche in Figura 37b, si possono riscontrare delle differenze tra gli spettri FT-IR di **HNT-4** e **HNT-7** dovute alla presenza della biotina. In particolare, si riscontrano le stesse bande tipiche che sono state descritte precedentemente per **HNT-6**.



Schema 4. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale biotinilato **HNT-7**

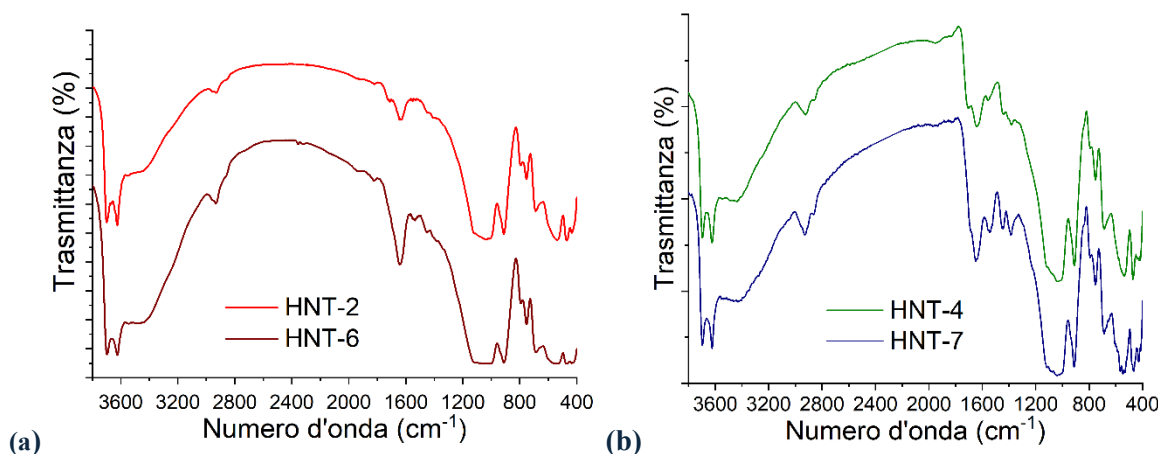


Figura 37. Spettri FT-IR di (a) **HNT-2** e **HNT-6**, (b) **HNT-4** e **HNT-7**

La morfologia del nanomateriale **HNT-6** è stata indagata tramite HAADF-STEM. In Figura 38 si riscontra che la morfologia del nanomateriale risulta differente in seguito alla post-modifica. Ciò probabilmente è causato dalla presenza della biotina sulla superficie degli HNT. In particolare, i tubi risultano agglomerati tra loro. Ancora una volta, la presenza della biotina è stata verificata tramite indagine EDX in cui è possibile osservare gli elementi caratteristici della porzione organica, oltre a quelli dell'halloysite. Così come dalla mappatura elementare dello zolfo (presente nella biotina) risulta che esso è uniformemente distribuito sulla superficie del nanomateriale **HNT-6**.

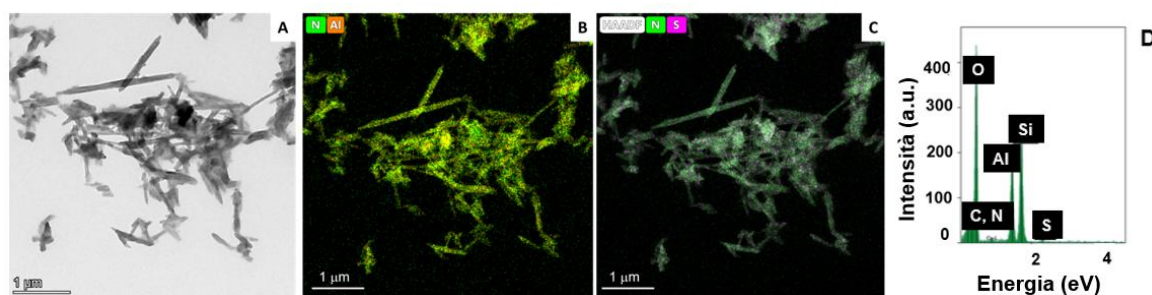


Figura 38. (A) TEM, (B-C) mappatura elementare ottenute tramite EDX, (D) spettro EDX di **HNT-6**

I risultati ottenuti confermano il grande potenziale dei nanomateriali a base di HNT come sistemi innovativi e modulabili per la terapia fotodinamica, offrendo prospettive molto promettenti per il trattamento mirato del cancro. In particolare, il sistema sviluppato, basato sull'halloysite funzionalizzata covalentemente e impiegata come *filler* in piattaforme biomediche a base di chitosano, si è dimostrato un candidato di grande interesse, soprattutto per una possibile applicazione nel trattamento delle neoplasie cutanee. L'integrazione tra halloysite e chitosano consente di ottenere un materiale biocompatibile e stabile, capace di veicolare agenti fotoattivi in modo controllato e di ottimizzare l'efficacia della terapia fotodinamica. Si può pensare che, in futuro, le ricerche saranno orientate all'ottimizzazione

della formulazione del nanocomposito e alla valutazione delle sue prestazioni in modelli *in vivo*, per confermarne la sicurezza e l'efficacia in condizioni biologiche reali.

2.2. Sistema a base di halloysite e oligo(fenilene etinileni)

Una classe di molecole organiche che può essere sfruttata in campo biologico è quella degli oligo(fenilene etinileni) (OPE). Essi sono oligomeri lineari luminescenti con gruppi aromatici ed etinilenici coniugati che hanno suscitato notevole interesse in diversi ambiti grazie alla loro versatilità sintetica, alle proprietà fotofisiche e fotochimiche (Figura 39).¹⁰⁴

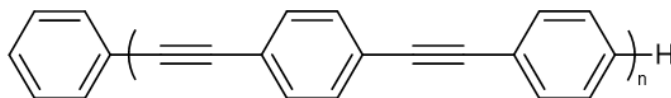


Figura 39. Struttura generale di un oligo(fenilene etilene)

Questa classe di molecole può essere utilizzata nella terapia fotodinamica grazie alla loro capacità di generare ROS, in particolare ossigeno singoletto. Negli anni, sono state adottate diverse strategie sintetiche volte a modificare il *core* aromatico degli OPE per ottenere composti con migliorate proprietà fotodinamiche (Figura 40).^{105,106,107}

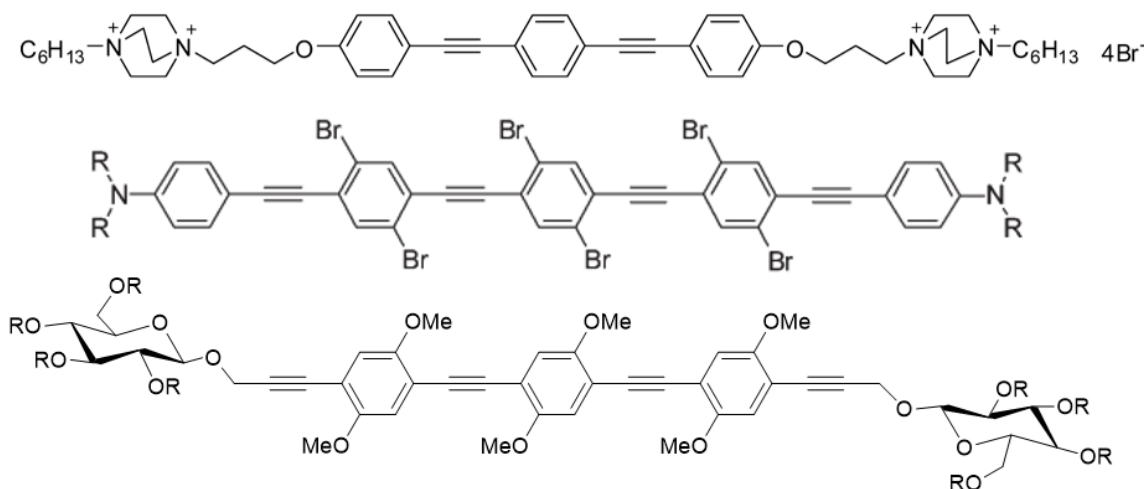
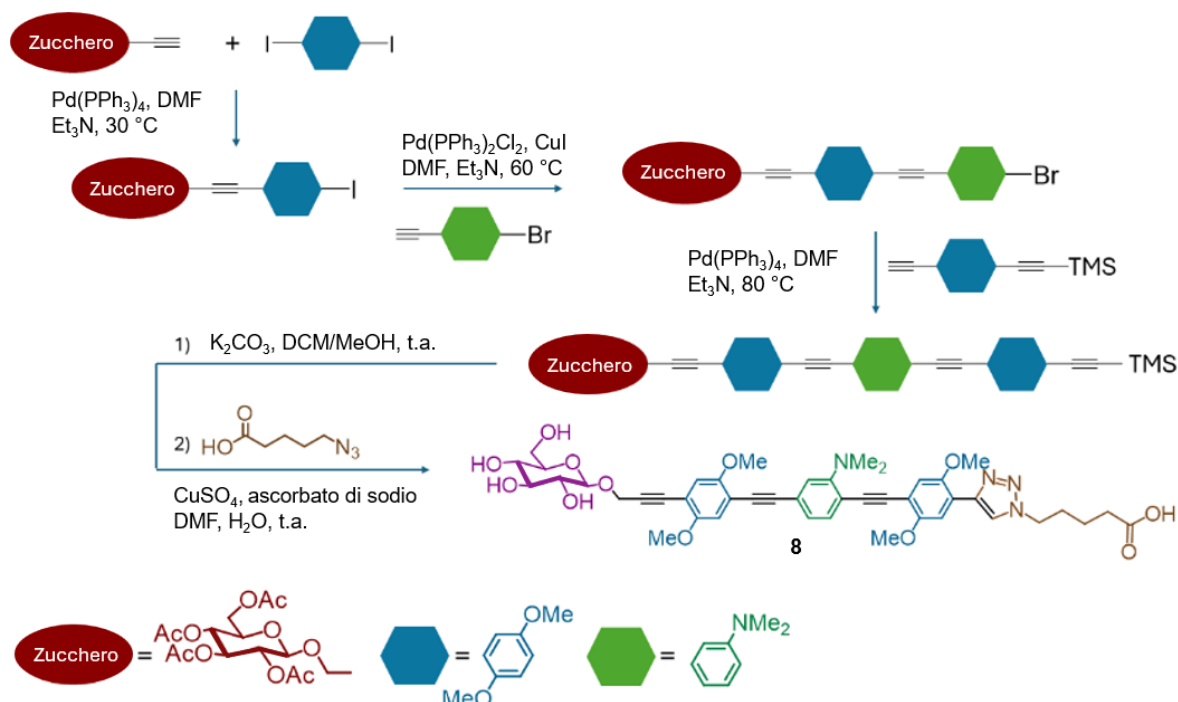


Figura 40. Rappresentazione di diverse strutture di OPE per applicazioni nella terapia fotodinamica

Come altre molecole organiche con azione biologica, anche gli OPE hanno delle limitazioni, come la limitata solubilità in ambiente acquoso per il loro potenziale uso clinico.¹⁰⁸ L'incorporazione di tali molecole in argille minerali, specialmente negli HNT, potrebbe risultare vantaggioso per un utilizzo biologico.

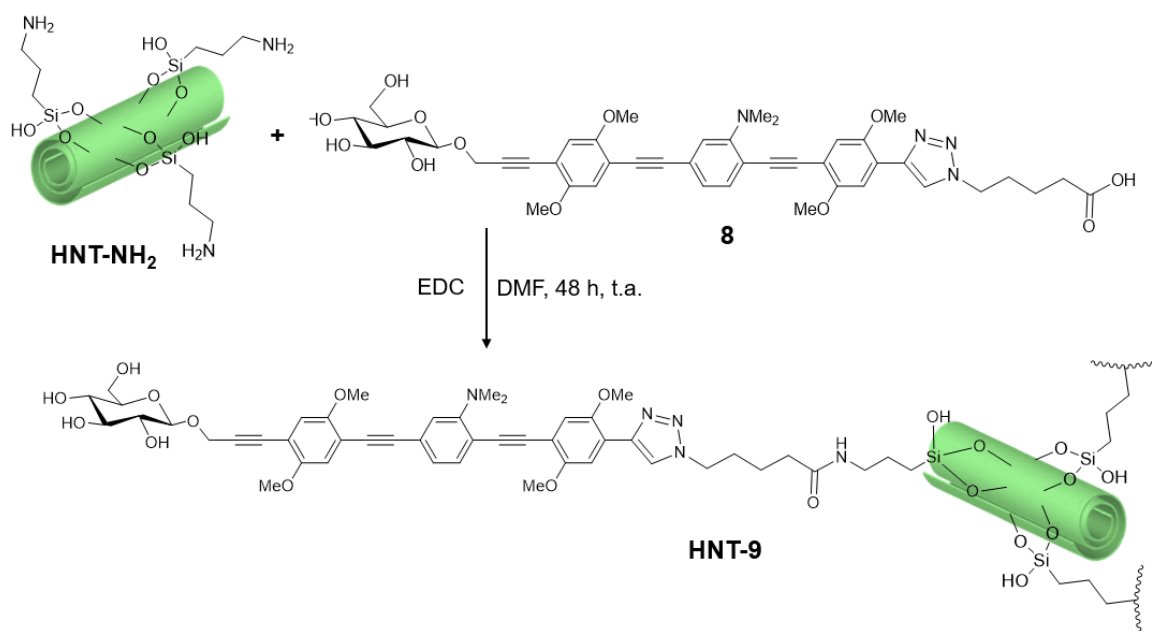
In questo caso, vista la natura della molecola, e in previsione di utilizzare il nanomateriale nel campo antibatterico per il trattamento delle ferite cutanee, si è optato per un approccio covalente. Tale approccio garantisce una stabilità alla molecola e riproducibilità nella sintesi, e allo stesso tempo lascia la cavità interna degli HNT vuota, che potrebbe essere utilizzata dunque per caricare altri antibiotici per un'azione sinergica. Per tale motivo, un derivato OPE, opportunamente sintetizzato secondo la Schema sintetico sotto riportato, recante sia

un'unità di glucosio, per aumentarne la solubilità in ambiente acquoso che un gruppo carbossilico terminale, è stato ancorato, sulla superficie esterna degli HNT.



Schema 5. Rappresentazione schematica della sintesi di **8**

In particolare, a degli HNT precedentemente modificati con il 3-amminopropiltrimetossisilano per dare origine al nanomateriale **HNT-NH₂**, è stato ancorato **8** attraverso una condensazione ammidica mediata da EDC secondo la procedura riportata nello Schema 6. In particolare la reazione è stata condotta a temperatura ambiente, per un tempo di reazione di 48 h. Dopo il *work-up*, il nanomateriale **HNT-9** è stato sottoposto ad analisi termogravimetrica che ha permesso di quantificare quanto **8** si fosse legato alla superficie esterna degli HNT. Da questa analisi è risultata una percentuale di caricamento di **8**, rispetto al nanomateriale **HNT-NH₂** di circa l'1.0 %p/p, corrispondente ad un grado di funzionalizzazione di 0.01 mmol g⁻¹. Sulla base dei rapporti stechiometrici di **HNT-NH₂** e **HNT-9** (rispettivamente pari a 0.63 mmol g⁻¹ e 0.01 mmol g⁻¹), è possibile affermare che non tutto **8** ha reagito con i gruppi amminici presenti sulla superficie degli HNT. Ciò è probabilmente dovuto a dei problemi di natura sterica del derivato OPE, ma potrebbe comunque risultare vantaggioso per migliorare l'assorbimento cellulare grazie alla presenza di alcuni gruppi amminici liberi sulla superficie esterna dei nanotubi.¹⁰⁹



Schema 6. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-9**

2.2.1. Caratterizzazione del sistema **HNT-9**

L'avvenuta funzionalizzazione di **HNT-9** è stata confermata attraverso spettroscopia FT-IR, analisi termogravimetriche e analisi turbidimetriche. Inoltre, le proprietà colloidali sono state analizzate tramite misure di *dynamic light scattering* e di potenziale ζ .

La Figura 41a mostra gli spettri FT-IR dei nanomateriali **HNT-NH₂** e **HNT-9**. L'assegnazione delle bande di **HNT-NH₂** può essere fatta sulla base dei dati di letteratura;¹¹⁰ lo spettro mostra un picco a 2900 cm^{-1} che corrisponde allo *stretching* dei gruppi metilenici, ma presenta anche dei picchi più piccoli a ca. 1559 e 1473 cm^{-1} che corrispondono alle vibrazioni di *stretching* del gruppo -NH_2 . Invece, lo spettro FT-IR di **HNT-9** mostra sia le bande attribuibili al nanomateriale inorganico, ma anche quelle che si originano dalla parte organica. In particolare, è possibile riscontrare una banda a ca. 3450 cm^{-1} corrispondente allo *stretching* dei gruppi ossidrilici e delle bande nell'intervallo $1390\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$, derivanti dalle vibrazioni di *stretching* di C=N e N=N dei gruppi triazolici.

La Figura 41b, invece, confronta le curve termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-NH₂** e **HNT-9**. Rispetto al termogramma di **HNT-NH₂**, dal quale si riscontrano le perdite di massa derivanti sia dall'espulsione delle molecole d'acqua interstrato degli HNT (a circa $550\text{ }^\circ\text{C}$), sia dalla degradazione e dalla volatilizzazione dell'organosilano (a circa $250\text{ }^\circ\text{C}$); il termogramma di **HNT-9** presenta un'ulteriore fase di degradazione. La quantità di **8** legato covalentemente sulla superficie di HNT è stata calcolata considerando le masse residue a $800\text{ }^\circ\text{C}$.

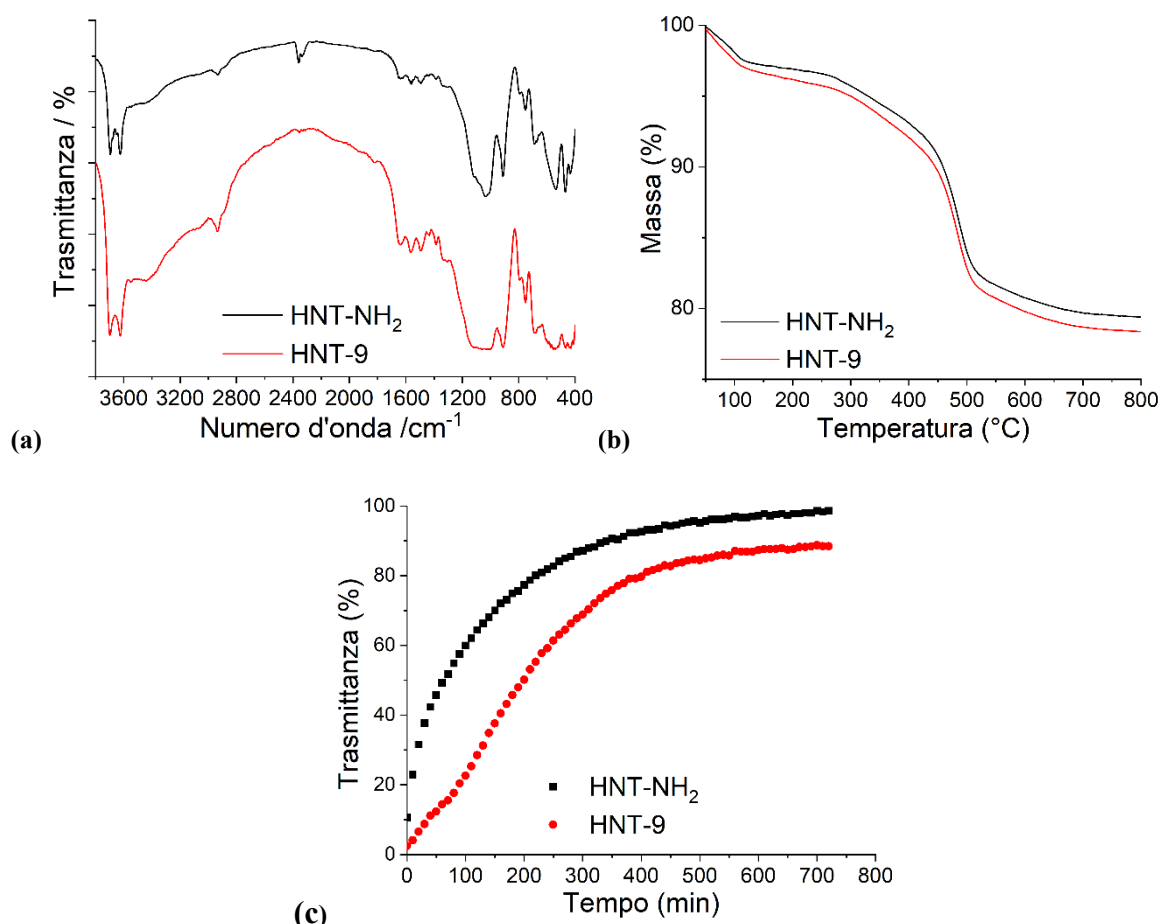


Figura 41. Confronto di (a) spettri FT-IR, (b) curve termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-NH₂** e **HNT-9**, (c) analisi turbidimetrica di dispersioni acquose di **HNT-NH₂** e **HNT-9** (1 mg mL^{-1})

Il successo della reazione è stato confermato anche dalle analisi turbidimetriche (Figura 41c) le quali hanno mostrato che l'introduzione di **8** sulla superficie esterna degli HNT ha influenzato la stabilità di una dispersione acquosa di **HNT-9** rispetto al nanomateriale **HNT-NH₂**.

Tramite analisi di *dynamic light scattering* sono state analizzate le proprietà colloidali del nanomateriale ottenuto (Tabella 5).

Tabella 5. Misure di DLS e potenziale ζ dei nanomateriali **HNT** e **HNT-9**

	Dimensione media (nm)	Potenziale ζ (mV)
HNT	295 ± 16	-18 ± 1
HNT-9	>1000	-7 ± 1

Il nanomateriale **HNT-9** ha mostrato una dimensione media superiore ai 1000 nm, con un elevato indice di polidispersità (PI) pari a circa 0.69. Poiché PI è una misura dell'eterogeneità di un campione in base alle dimensioni, è possibile concludere che si ha un'ampia distribuzione dimensionale del nanomateriale in diffusione. Anche tramite misure di

potenziale ζ è possibile affermare che la sintesi sia effettivamente avvenuta. Infatti, **HNT-9** presenta un valore di potenziale ζ più positivo rispetto a HNT.

È stata anche studiata la morfologia del nanomateriale **HNT-9** mediante HAADF-STEM e TEM accoppiata con sonda EDX (Figura 42).

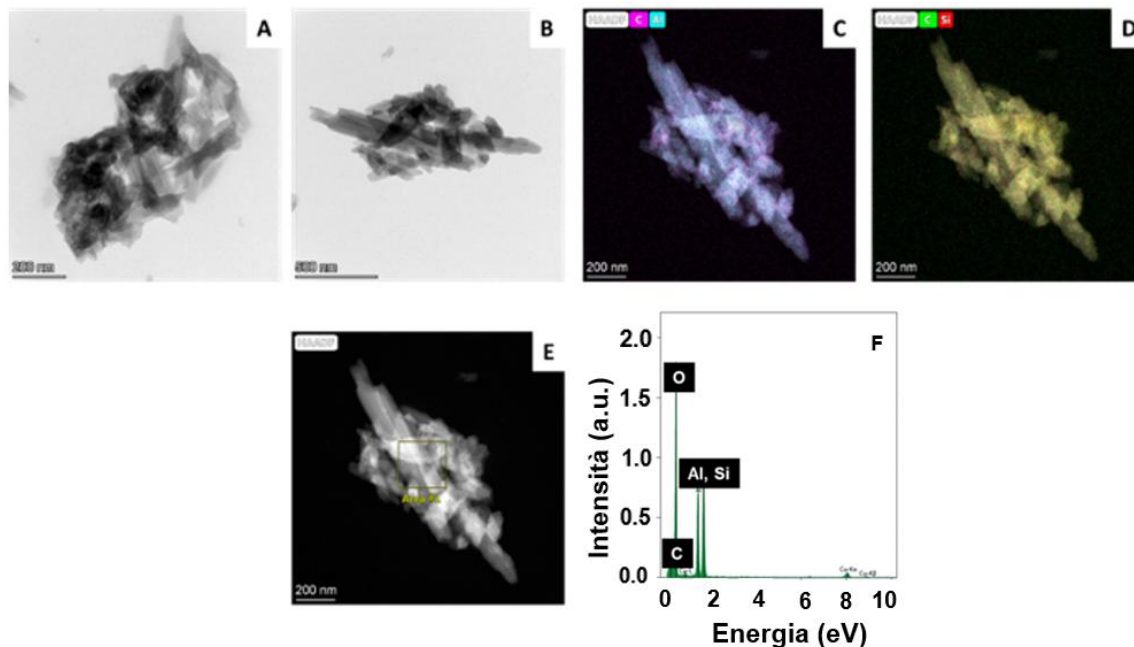


Figura 42. (A-B) TEM, (C-E) mappature elementali ottenute tramite EDX, (F) spettro EDX di **HNT-9**

Come è possibile osservare dalle immagini in Figura 42A-B, **HNT-9** mostra la caratteristica struttura tubolare cava dell'halloysite, ma risulta aggregata probabilmente a causa della presenza delle molecole organiche sulla superficie esterna che potrebbero stabilire interazioni favorevoli. Dalla mappatura elementale ottenuta mediante EDX, è possibile osservare che le molecole organiche sono uniformemente distribuite sulla superficie esterna di **HNT-9** (Figure 42C-E). Anche in questo nanomateriale, le misure EDX su un'area selezionata (Figura 42F) mostrano non solo gli elementi tipici dell'halloysite, ma anche la presenza di atomi di carbonio, avvalorando così il successo della sintesi.

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta modifica della superficie esterna dell'halloysite con **8** è stata fornita dal confronto delle proprietà fotofisiche del nanomateriale **HNT-9** con quelle della singola molecola organica. Sono state analizzate le proprietà spettroscopiche UV-vis in dispersione e quelle di fluorescenza sia in dispersione che allo stato solido. Gli spettri UV-vis di una dispersione metanolica di **HNT-9** (1 mg mL^{-1}) hanno mostrato intense bande di assorbimento a circa 370 nm (Figura 43a). Analogamente al composto **8**, questi assorbimenti nella regione UV sono dovuti alle transizioni consentite $\pi-\pi^*$ e sono attribuite a transizioni a trasferimento di carica interne. L'eccitazione della medesima dispersione di **HNT-9** a 370 nm ha portato all'emissione nella regione blu dello spettro, con una banda a circa 470 nm e

una spalla a 520 nm (Figura 43a). Risultati simili sono stati ottenuti registrando la fluorescenza allo stato solido del nanomateriale (Figura 43b).

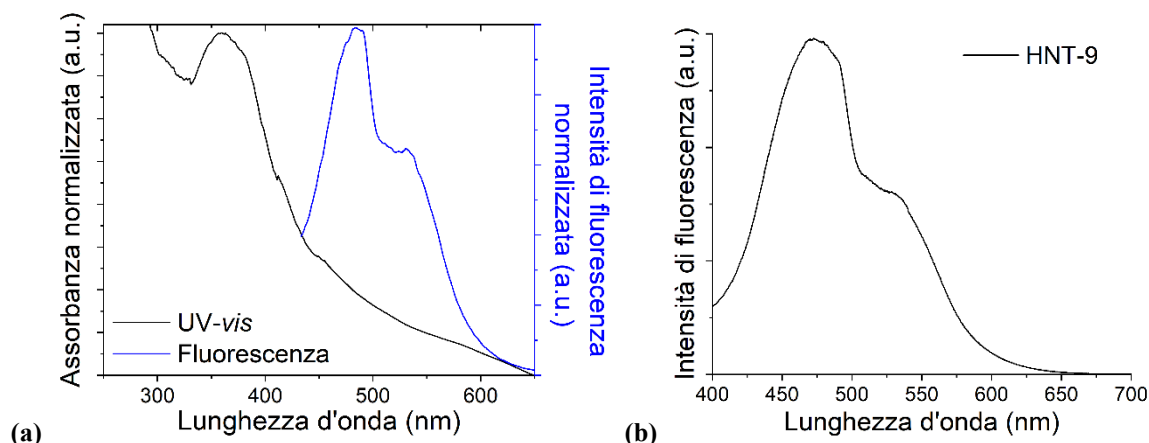


Figura 43. (a) Spettro di assorbimento (linea nera) e di emissione (linea blu) di una dispersione di **HNT-9**, (b) spettro di emissione allo stato solido di **HNT-9**

2.2.2. Studio dell'attività fotosensibilizzante di HNT-9

Al fine di stabilire la capacità del nanomateriale ottenuto di agire come agente antibatterico, è stata valutata la sua capacità fotosensibilizzante nella aPDT. Per fare ciò è stata usata una sonda specifica per l'ossigeno singoletto, con assorbimento a ca. 290 nm, lunghezza d'onda ottimale per un trattamento fotodinamico della cute, ovvero l'acido urico (UA). L'acido urico risulta stabile sotto irradiazione con LED a 365 nm in assenza del fotosensibilizzatore; al contrario, in presenza del nanomateriale sintetizzato, la banda di assorbimento tipica dell'UA diminuisce in funzione del tempo di irradiazione in seguito alla sua ossidazione ad opera dell' $^1\text{O}_2$ prodotto, indicando un'azione del nanomateriale (Figura 44).¹¹¹

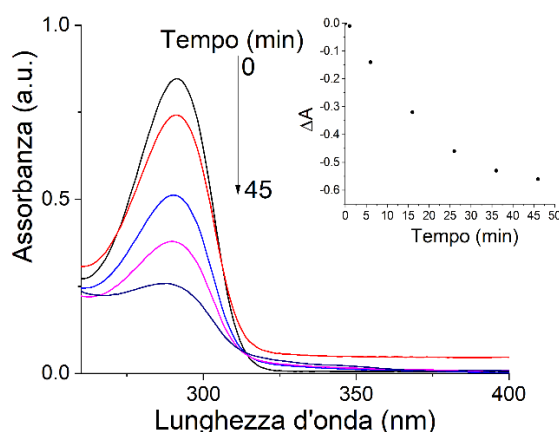


Figura 44. Spettro di assorbimento di una dispersione di UA e **HNT-9** (1 mg mL^{-1} , corrispondente a $[\mathbf{8}] = 14 \text{ }\mu\text{M}$), durante irradiazione a 365 nm per 45 minuti

Un comportamento simile era stato osservato in letteratura con il solo **8**. Al fine di evidenziare dei miglioramenti nell'azione fotodinamica in seguito all'interazione con gli

HNT, si è calcolata la resa quantica di produzione dei ROS (Φ_{ROS}) attraverso la seguente equazione:

$$\phi_9 = \left[\frac{\left(\frac{\frac{nmol_{UA_{HNT-9}}}{S}}{\frac{fotoni_{abs_{HNT-9}}}{S}} \eta^2 \right)}{\left(\frac{\frac{nmol_{UA_r}}{S}}{\frac{fotoni_{abs_r}}{S}} \eta^2 \right)} \right] \phi_r \quad (\text{Eq. 4})$$

La resa quantica di produzione di ROS è stata valutata monitorando il profilo di degradazione dell'acido urico nel tempo, irradiando una dispersione di **HNT-9** in presenza di acido urico utilizzando un laser a 365 nm (740 mW e flusso di fotoni di 1.86×10^{-6} einstein/s) e confrontandolo con il profilo di degradazione in presenza di uno standard (r) - il blu di metilene (riferimento - $\Phi_{ROS} = 0.5$) - irradiando con un laser a 650 nm (200 mW e flusso di fotoni di 7.95×10^{-7} einstein/s). Il numero di fotoni assorbiti per unità di tempo è stato calcolato considerando la porzione di fotoni assorbita dai campioni, in base al valore di trasmittanza (T) nelle condizioni sperimentali utilizzate. Nel caso di **HNT-9**, la trasmittanza è stata valutata sottraendo il valore della luce diffusa dal nanomateriale. In particolare:

- $\frac{fotoni_{abs_{HNT-9}}}{S} = \text{flusso di fotoni } (1 - T_{HNT-9})$
- $\frac{fotoni_{abs_r}}{S} = \text{flusso di fotoni } (1 - T_r)$
- η è l'indice di rifrazione del solvente

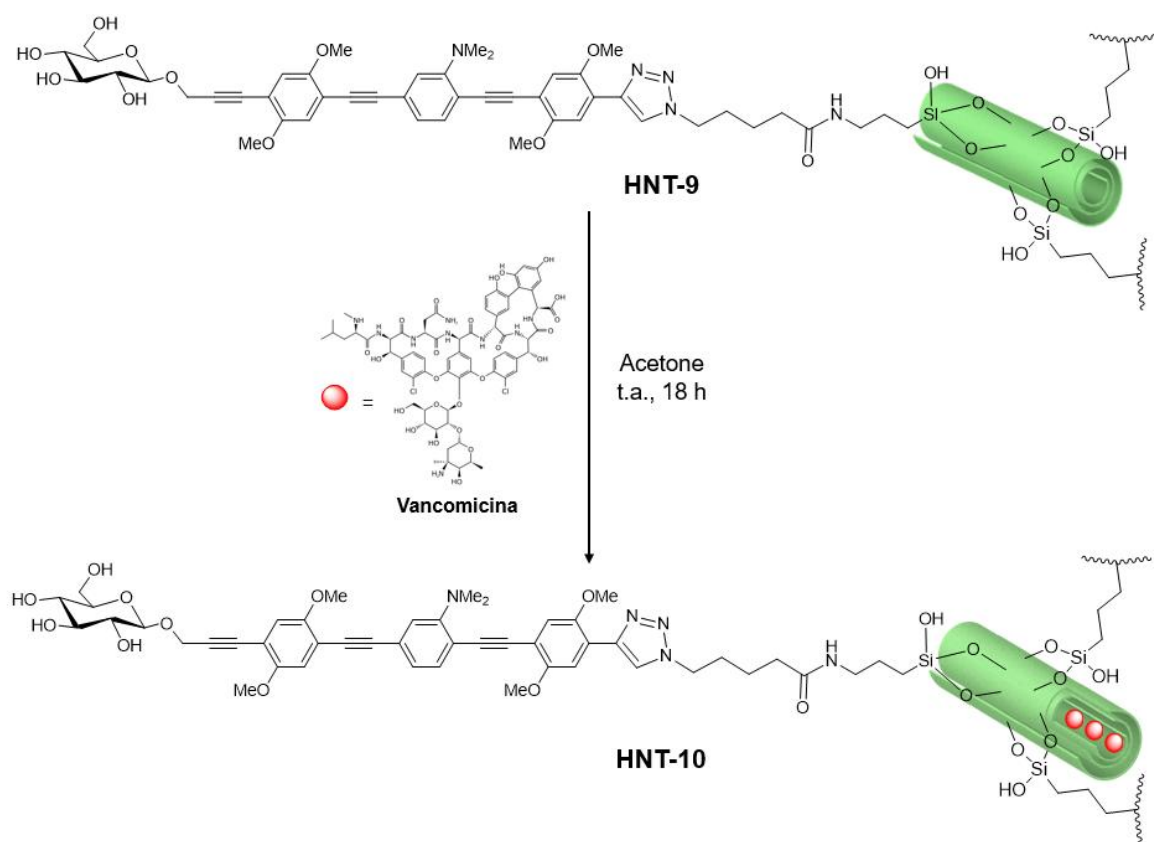
Da questa, si è trovato che la Φ_{ROS} del nanomateriale è di 0.23, mentre quella della sola molecola, da dati di letteratura, risulta essere 0.15. Questo dato evidenzia che la presenza dell'halloysite migliora le proprietà della molecola, probabilmente in seguito ad un'aumentata solubilità in ambiente acquoso della stessa, risultando promettente per future applicazioni.

2.2.3. Caricamento della vancomicina per azione antibatterica

Visti i risultati incoraggianti ottenuti e nell'ottica di una potenziale applicazione in campo antibatterico, ad esempio per il trattamento di ferite cutanee, si è pensato di potenziare ancor di più le proprietà del nanomateriale per caricare all'interno del lume allositico una molecola che abbia un'azione antibatterica.

Si è scelta a tale scopo la vancomicina. Essa è un farmaco antibiotico prodotto da *Streptomyces orientalis* che fa parte della classe dei glicopeptidi.¹¹² Quest'ultimi sono molecole ad alto peso molecolare, che agiscono inibendo la polimerizzazione della parete del peptidoglicano dei batteri Gram positivi. L'alto peso molecolare non consente a tali molecole l'attraversamento della membrana cellulare esterna dei Gram negativi, per cui è inefficace contro questi batteri. La vancomicina è un antibiotico di largo uso in clinica e usualmente viene somministrato per via endovena, dal momento che la molecola viene scarsamente assorbita per via orale.¹¹³ Purtroppo, essendo stata impiegata in modo massiccio per debellare infezioni da *Staphylococcus aureus*, nel corso degli anni si sono sviluppati numerosi ceppi di batteri particolarmente resistenti.¹¹⁴ Di conseguenza, per poter superare la resistenza agli antibiotici risulta vantaggioso l'uso di sistemi multifunzionali che impiegano sia antibiotici che terapie emergenti, come l'aPDT, per il trattamento delle infezioni batteriche. In particolare, la combinazione di aPDT e antibiotico potrebbe essere utile per gestire e curare infezioni batteriche superficiali accessibili alla luce.¹¹⁵

Il caricamento della vancomicina nel lume allositico è avvenuto sfruttando una procedura sintetica messa a punto dal gruppo di ricerca per sistemi simili, secondo lo Schema 7.¹¹⁶



Schema 7. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-10**

In particolare, la reazione di una dispersione del nanomateriale **HNT-9** a cui è stata aggiunta una soluzione acquosa di vancomicina è avvenuta a temperatura ambiente per 18 h. Dopo il *work-up*, il surnatante è stato analizzato mediante spettroscopia UV-*vis* e la percentuale di caricamento del farmaco negli HNT (LD%), così come l'efficienza di incapsulamento (EE%), sono state calcolate secondo le seguenti equazioni:

$$LD\% = \frac{Van_{HNT-9}}{m_{HNT-9} + Van_{HNT-9}} \times 100 \quad (Eq. 5)$$

$$EE\% = \frac{Van_{HNT-9}}{Van_{Tot}} \times 100 \quad (Eq. 6)$$

dove Van_{HNT-9} e Van_{Tot} sono, rispettivamente, la quantità di vancomicina caricata nel nanomateriale **HNT-9** e la quantità totale di vancomicina in ingresso, e m_{HNT-9} è la quantità di nanomateriale. Da questa analisi è stato stimato un caricamento di vancomicina nel nanomateriale **HNT-10** di circa il 16 %p/p, con un'efficienza di incapsulamento di circa il 94%. L'avvenuto caricamento è stato anche verificato mediante spettroscopia FT-IR (Figura 45). Come si può osservare dallo spettro FT-IR, oltre alle bande già discusse precedentemente, inerenti al nanomateriale **HNT-9**, sono chiaramente visibili nuove bande vibrazionali attribuibili alla presenza della vancomicina. L'assegnazione di quest'ultime può essere fatta sulla base dei dati di letteratura.¹¹⁷ In particolare si può osservare la banda relativa alla vibrazione di *stretching* dei gruppi carbonilici C=O della vancomicina a ca. 1650 cm^{-1} , le bande a ca. 1507 cm^{-1} relative allo *stretching* dei gruppi C=C, ed infine le bande a ca. 1230 cm^{-1} relativo allo *stretching* dei gruppi idrossilici degli anelli aromatici presenti nella vancomicina.

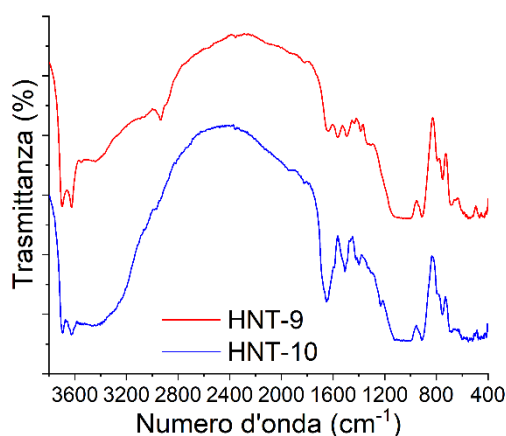


Figura 45. Spettri FT-IR di **HNT-9** e **HNT-10**

Infine, per valutarne un possibile utilizzo, come già accennato, per il trattamento di ferite cutanee, si è condotto uno studio preliminare attraverso l'analisi delle cinetiche di rilascio della vancomicina dal nanomateriale **HNT-10** tramite il metodo della membrana di dialisi.

Il rilascio è stato condotto in tampone fosfato a due diversi pH: 7.4 e 5.5. Quest'ultimo è stato considerato per imitare il pH della pelle per un potenziale trattamento topico. I dati ottenuti sono riportati in Figura 46. Come si può osservare, in entrambi i pH si ha un rilascio veloce nei primi minuti, successivamente la velocità con cui la vancomicina diffonde dal lume all'ambiente circostante, dipende dal pH del mezzo. A pH acidi infatti, dopo solo 300 min si osserva il completo rilascio della vancomicina dal nanomateriale. Al contrario, a pH neutri, l'antibiotico viene rilasciato in maniera più controllata, raggiungendo la totalità di farmaco rilasciato dopo 24 h. Questo diverso comportamento potrebbe essere attribuito al fatto che a pH 5.5, al di sotto del punto isoelettrico degli HNT (pH circa 6.5),¹¹⁸ i tubi si trovano nella loro forma zwitterionica. Si è dunque supposto, che il rilascio più veloce osservato in questo caso potrebbe essere dovuto alla presenza di interazioni elettrostatiche repulsive con la vancomicina, che ne accelerano il rilascio. Questo dato che apparentemente potrebbe risultare controproducente, in realtà è molto incoraggiante. Infezioni batteriche, infatti, specialmente quelle causate da *Staphylococcus aureus*, portano ad un pH più acido nel sito di infezione rispetto ai tessuti adiacenti. Un rilascio più veloce dunque in questo pH potrebbe essere vantaggioso per un efficace trattamento antibatterico.

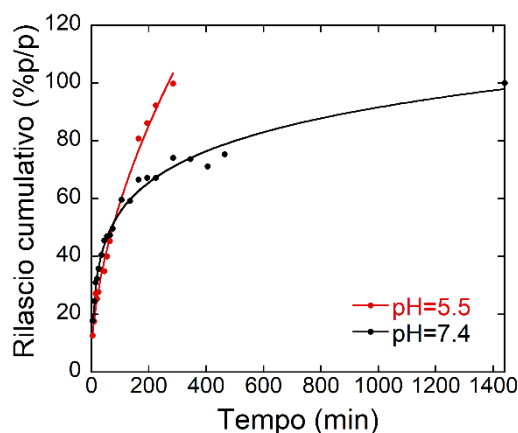


Figura 46. Cinetica di rilascio della vancomicina da **HNT-10** in tampone fosfato (50 mM) a pH 5.5 e 7.4, a 37 °C

Per valutare la modalità di rilascio della vancomicina dall'halloysite, i dati cinetici ottenuti sono stati analizzati con diversi modelli matematici, in particolare i dati sono stati analizzati con il modello del primo ordine e *Power Fit* (Eq. 7 e 8).¹¹⁹

$$\text{Primo ordine: } M_t = M_{\infty} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\text{Power Fit: } F_t = kt^n \quad (\text{Eq. 8})$$

dove M_t e F_t sono la quantità di vancomicina rilasciata al tempo t ; M_{∞} è la quantità totale di sostanza inizialmente caricata, k è la costante di rilascio, e n è l'esponente di rilascio, il quale dipende dal meccanismo di rilascio e dalla geometria del materiale.

Dalla regressione non lineare dei dati cinetici, si è riscontrato che ad entrambi i pH, i dati cinetici seguono un modello *Power fit*, indicando che il rilascio è governato da un meccanismo *Fickiano* ($k = 127 \pm 71 \text{ min}^{-1}$, $n = 0.08 \pm 0.03$, $R^2 = 0.98762$ e $k = 4.1 \pm 1.7 \text{ min}^{-1}$, $n = 0.56 \pm 0.006$, $R^2 = 0.99218$, rispettivamente per pH 7.4 e pH 5.5).¹²⁰

Dal momento che l'ingestione orale di antibiotici presenta un elevato rischio di effetti collaterali negativi, dovuti principalmente alla loro somministrazione sistemica attraverso il sistema sanguigno e non direttamente al tessuto bersaglio, si può pensare di ideare dei sistemi di somministrazione topici.¹²¹ Essi devono essere dei sistemi impiantabili in grado di rilasciare il farmaco direttamente al tessuto interessato, in modo da ridurre al minimo gli effetti sui tessuti sani. Ovviamente, tale sistema deve presentare delle caratteristiche fondamentali come: biocompatibilità, biodegradabilità, stabilità meccanica e la capacità di fornire un rilascio prolungato del farmaco. Attualmente, gli idrogel formati da argille hanno attirato notevole attenzione poiché possono somministrare l'antibiotico in esso presente esclusivamente nel sito in cui vengono applicati, e offrono diversi vantaggi come il rilascio prolungato e sostenuto e la facilità di somministrazione. Inoltre, sono biocompatibili e mostrano un'elevata capacità di rigonfiamento, indispensabile per la diffusione delle molecole attive nel sito bersaglio.¹²² Questi idrogel vengono utilizzati per tantissimi scopi, ad esempio per promuovere il processo di cura delle ferite, dal momento che l'infezione batterica è uno dei problemi più gravi che possono compromettere la guarigione.

Si può quindi pensare, in futuro, di utilizzare il nanomateriale sintetizzato **HNT-10** come *filler* per la produzione di idrogel compositi. In questo modo si otterrebbe un sistema topico, in cui la vancomicina verrebbe rilasciata esclusivamente nel punto interessato, così come l'azione fotosensibilizzante di **8** verrebbe attivata solo nelle zone irradiate, permettendo, in questo modo, di distruggere il tessuto malato senza danneggiare quello sano.

2.3. Sistema a base di halloysite e *molecular switch*

Recentemente molecole organiche costituite da anelli ossazinici con proprietà alocromiche hanno attratto attenzione per sviluppare una classe di molecole che hanno riscontri molto interessanti nel campo dell'*imaging* per fluorescenza. La determinazione del pH intracellulare potrebbe infatti essere utile per una diagnosi precoce dei tumori. Un derivato dalle applicazioni interessanti è quello riportato in Figura 47, in cui all'anello ossazinico è stato coniugato un anello cumarinico.

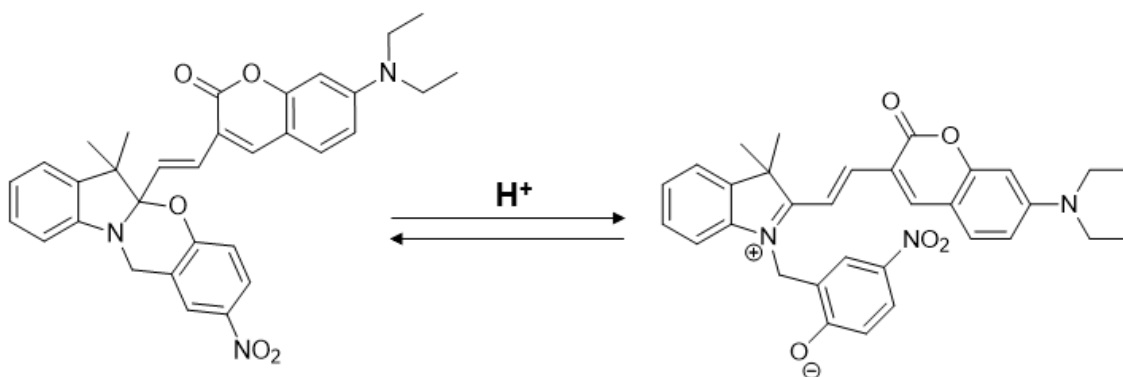


Figura 47. Forma aperta e forma chiusa della sonda alocromica

In seguito a variazioni di pH e quindi apertura dell'anello ossazinico, il cromoforo cumarinico può estendere la delocalizzazione elettronica sull'indolo auxocromico con conseguente *shift* nella forma aperta, sia dell'assorbimento che dell'emissione. Questo comportamento consente l'eccitazione selettiva delle due forme a lunghezze d'onda distinte e la raccolta delle loro emissioni in diverse finestre spettrali.

Come già accennato, il maggior problema legato all'uso di questa molecola è la sua idrofobicità che ne limita l'uso in campo biologico. Queste difficoltà possono essere superate utilizzando dei sistemi di trasporto appropriati che aumentino la solubilità in ambiente fisiologico. Recentemente, il gruppo di ricerca ha riportato la sintesi di un nanomateriale in cui la molecola in questione era caricata negli HNT attraverso un approccio supramolecolare (Figura 48).⁸⁶

La caratterizzazione chimico-fisica ha mostrato che la molecola non è soltanto inclusa nel lume allositico ma interagisce anche con la superficie esterna degli HNT. Poiché tale superficie è acida, ne risulta che parte della molecola si apre portando alla coesistenza delle due forme, cioè sia quella chiusa che quella aperta. Questa evidenza è stata riscontrata nello studio delle proprietà fotofisiche del sistema sintetizzato.⁸⁶

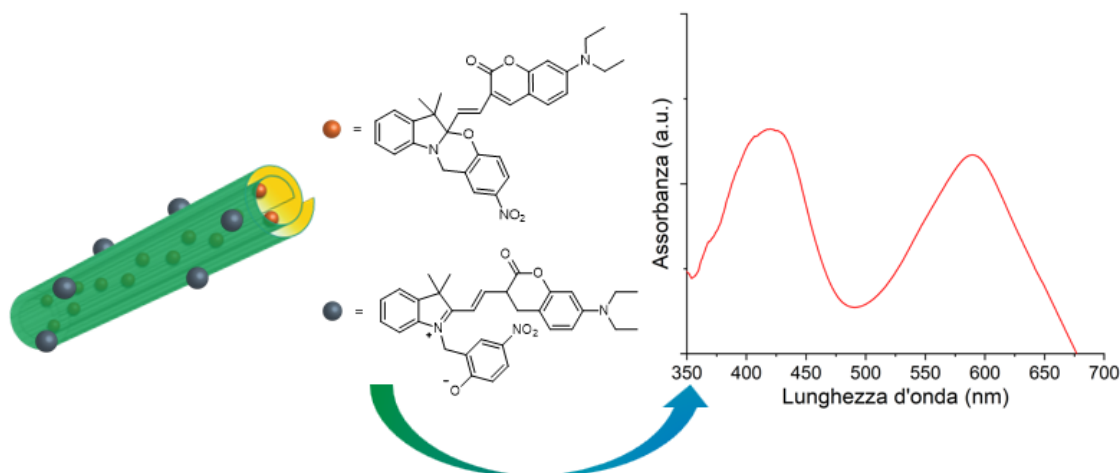


Figura 48. Sistema diagnostico a base di halloysite e della sonda fluorescente alocromica localizzata all'interno del lume⁸⁶

Per evitare l'apertura dell'anello si è quindi pensato di immobilizzare la molecola sulla superficie esterna degli HNT attraverso un legame covalente.

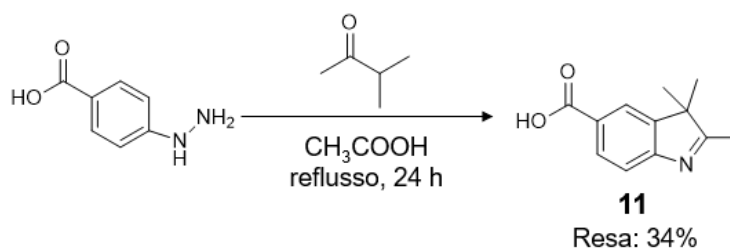
Per la sintesi di tale nanomateriale sono stati considerati diversi approcci sintetici, sia di tipo *top down*, in cui la molecola precedentemente sintetizzata viene legata alla superficie esterna degli HNT opportunamente modificati, oppure di tipo *bottom up*, in cui la molecola viene fatta crescere sugli HNT *step by step*.

2.3.1. Ancoraggio covalente della sonda alocromica mediante approccio *Top Down*

Prima di procedere al legame covalente della molecola sulla superficie esterna dell'HNT, questa è stata opportunamente sintetizzata, secondo una metodica riportata in letteratura.¹⁸ Questa sintesi prevedeva l'introduzione, nello scheletro carbonioso della molecola, di un triplo legame terminale che verrà sfruttato per l'ancoraggio sugli HNT.

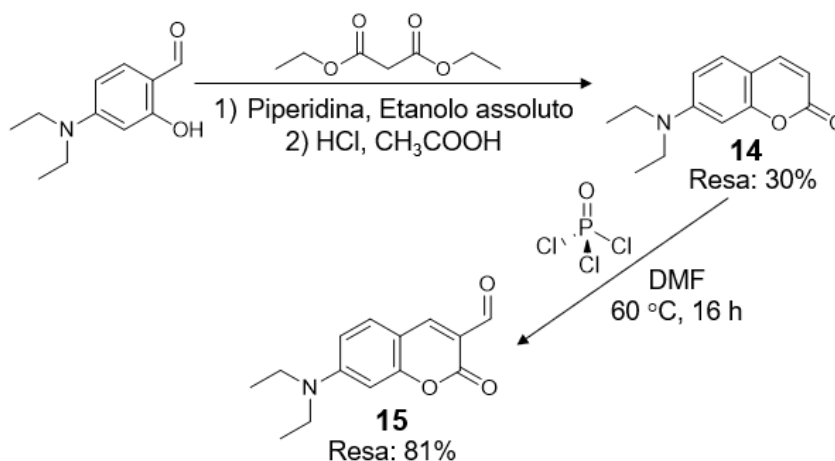
Inizialmente, sono state sintetizzate le molecole **11** e **15**, le quali non sono disponibili commercialmente, per poi procedere con la sintesi vera e propria dell'interruttore alocromico.

Il 2,3,3-trimetil-5-carbossi-3H-indolo (**11**) è stato sintetizzato a partire dall'acido 4-idrazinobenzoico e l'isopropilmetilchetone secondo una procedura sintetica nota in letteratura (Schema 8).¹²³



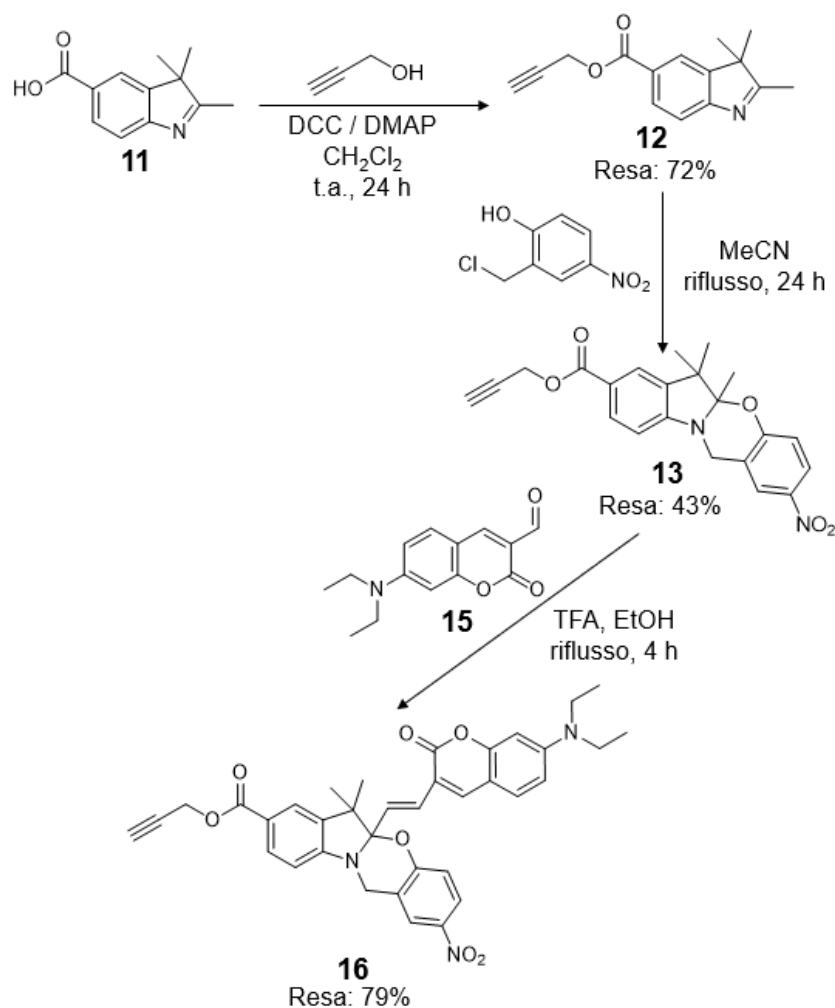
Schema 8. Rappresentazione schematica della sintesi di **11**

Parallelamente, la sintesi del cromoforo cumarinico ha previsto un procedimento a due passaggi, in cui inizialmente una soluzione in etanolo di 4-dietilamminosalicilaldeide e dietilmalonato, in presenza di una quantità catalitica di piperidina, viene lasciata ad agitare a riflusso per 6 h. Dopo il *work-up*, si sono ottenuti dei cristalli arancione corrispondenti al composto **14**, i quali sono stati fatti reagire con POCl_3 in DMF, a 60°C per un tempo di reazione di 16 h. Dopo il *work-up*, **15** è stato ottenuto con una resa del 60% (Schema 9).



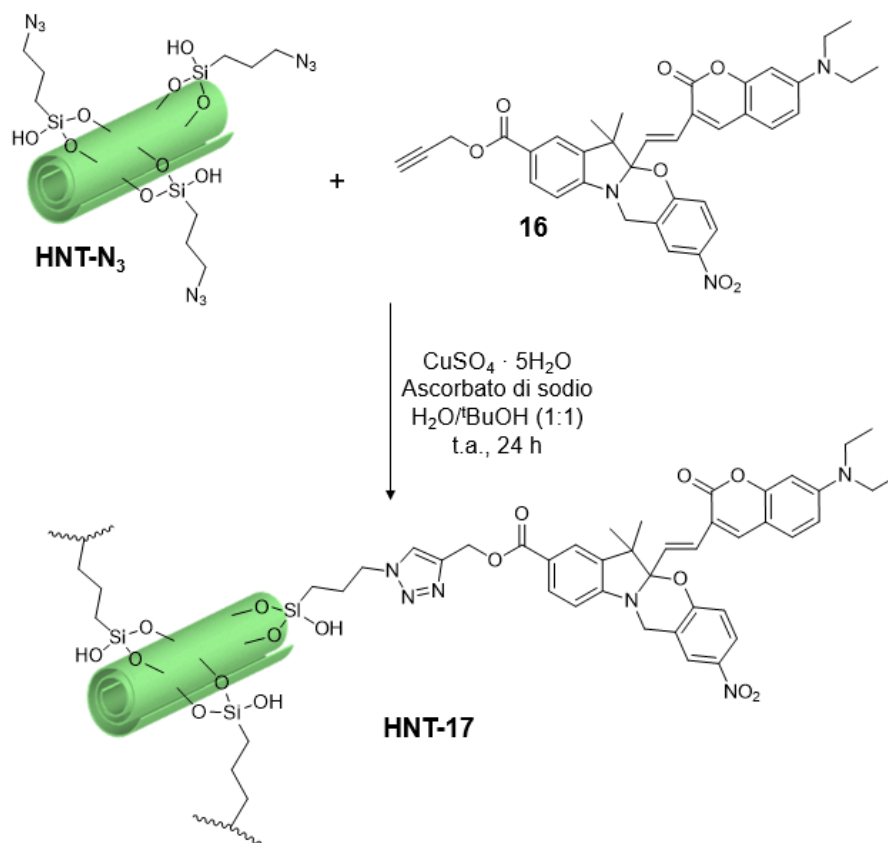
Schema 9. Rappresentazione schematica della sintesi di **15**

Successivamente, **11** è stato fatto reagire in DCM con l'alcol propargilico, in presenza di DCC e DMAP, per 16 h. Il prodotto ottenuto dopo purificazione tramite colonna cromatografica è stato posto con il 2-clorometil-4-nitrofenolo in acetonitrile, in condizioni di riflusso per 24 ore, per ottenere **12**. Infine, "l'interruttore" molecolare è stato sintetizzato a partire da una soluzione in EtOH di **13** e **15**, in presenza di una quantità catalitica di TFA, ponendo il tutto a riflusso del solvente per 15 h. In seguito a purificazione tramite colonna cromatografica, si è ottenuto **16** come una polvere verde con una resa del 79 % (Schema 10).



Schema 10. Rappresentazione schematica della sintesi di **16**

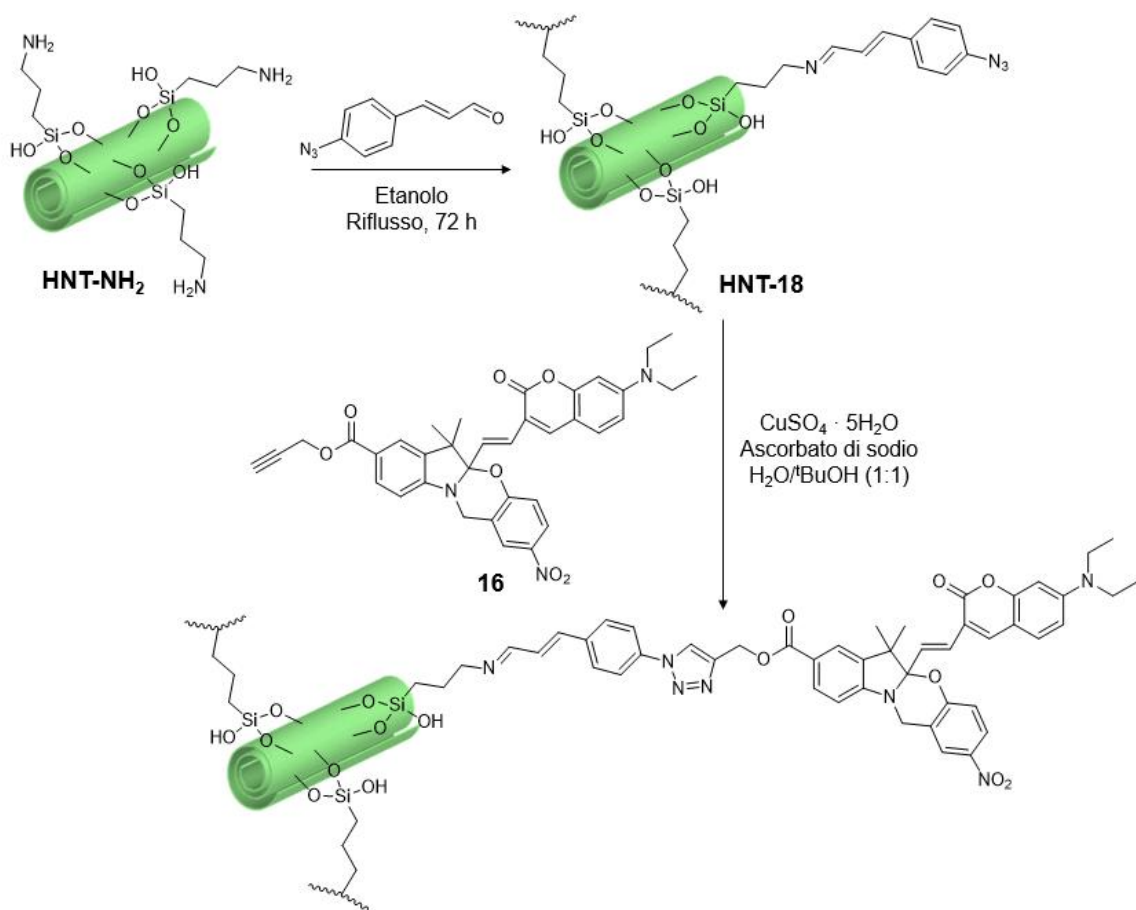
La molecola così sintetizzata è stata fatta reagire con un halloysite modificata con gruppi azido¹²⁴ terminali mediante una cicloaddizione 1,3 dipolare.¹⁰⁰ In particolare, **HNT-N₃** e **16** sono stati dispersi in una miscela H₂O/^tBuOH (1:1) a temperatura ambiente per 24 h, in presenza di quantità catalitiche di CuSO₄ e ascorbato di sodio (Schema 11). Successivamente, il nanomateriale **HNT-17** ottenuto è stato isolato come polvere verde dopo successivi lavaggi con H₂O e DCM per rimuovere sia i catalizzatori che alcuni reagenti residui non reagiti. Sulla base dei rapporti stechiometrici di **HNT-N₃** e **HNT-17**, ottenuti mediante analisi TGA, (rispettivamente pari a 0.27 mmol g⁻¹ e 0.16 mmol g⁻¹) è stato determinato che il rapporto molare tra la sonda alocromica e i gruppi azido legati alla superficie degli HNT era 1:2, ciò significa che non tutti i gruppi azido di **HNT-N₃** hanno reagito; probabilmente ciò è dovuto all'ingombro sterico della molecola organica.



Schema 11. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-17** tramite approccio top down

Dunque, al fine di aumentare il caricamento della sonda alocromica sulla superficie esterna degli HNT, si è pensato di funzionalizzare l'argilla con *linker* aventi differenti proprietà chimico-fisiche, in modo da poter superare possibili problemi dovuti all'ingombro sterico della molecola organica.

Si sono quindi seguite due diverse vie sintetiche. In un primo caso partendo da un'halloysite modificata con gruppi amminici, si è provato ad ancorare ad essa la 4-azidocinnamaldehyde mediante la formazione di un legame imminico, secondo una metodica riportata in letteratura.¹²⁵ Per l'ottenimento del nuovo nanomateriale, **HNT-NH₂** è stato fatto reagire con la 4-azidocinnamaldehyde in etanolo, a refluxo per 72 h (Schema 12). Dopo il *work-up*, il nanomateriale **HNT-18** ottenuto è stato analizzato tramite TGA, la quale ha permesso di stimare una percentuale di caricamento pari a 9.5 %p/p. **HNT-NH₂** e **HNT-18**, presentano entrambi una funzionalizzazione pari a 0.6 mmol g⁻¹.



Schema 12. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-18** e tentativi sintetici tra **HNT-18** e **16** attraverso due diversi approcci: 1) tramite via classica (t.a. 24 h); 2) tramite l'uso delle microonde (100 °C, 10 min)

Il nanomateriale **HNT-18** è stato caratterizzato tramite spettroscopia FT-IR e TGA. In Figura 49a sono riportati gli spettri FT-IR dei nanomateriali HNT, **HNT-NH₂** e **HNT-18**. Come si può osservare, lo spettro FT-IR del nanomateriale **HNT-NH₂** mostra i picchi relativi alla porzione organica aggiunta, già discussi precedentemente. Lo spettro FT-IR di **HNT-18**, invece, presenta il caratteristico picco di vibrazione del gruppo azido a circa 2100 cm⁻¹ e qualche altro picco relativo alla presenza della parte organica, ad esempio si possono osservare dei picchi nel range tra 1600 e 1350 cm⁻¹ che sono relativi allo *stretching* dei gruppi C=C, C=N e C-N.¹²⁵

In Figura 49b sono riportate le curve termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-NH₂** e di **HNT-18** che confermano ulteriormente il successo della reazione. Oltre alla caratteristica perdita in peso dell'halloysite relativa alla perdita di acqua interstiziale, il nanomateriale **HNT-18** mostra un'ulteriore degradazione a ca. 250 °C, relativa alla degradazione e alla volatilizzazione della porzione organica legata.

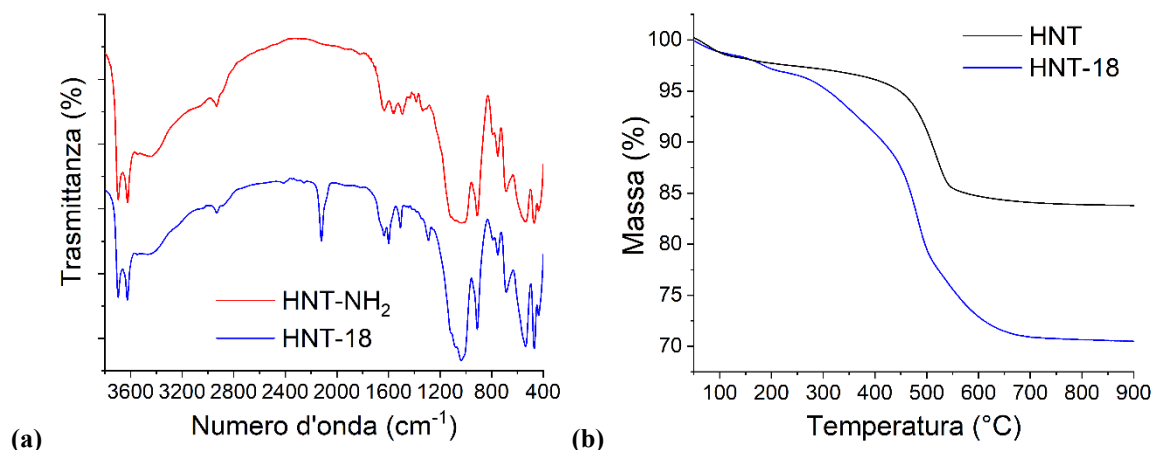
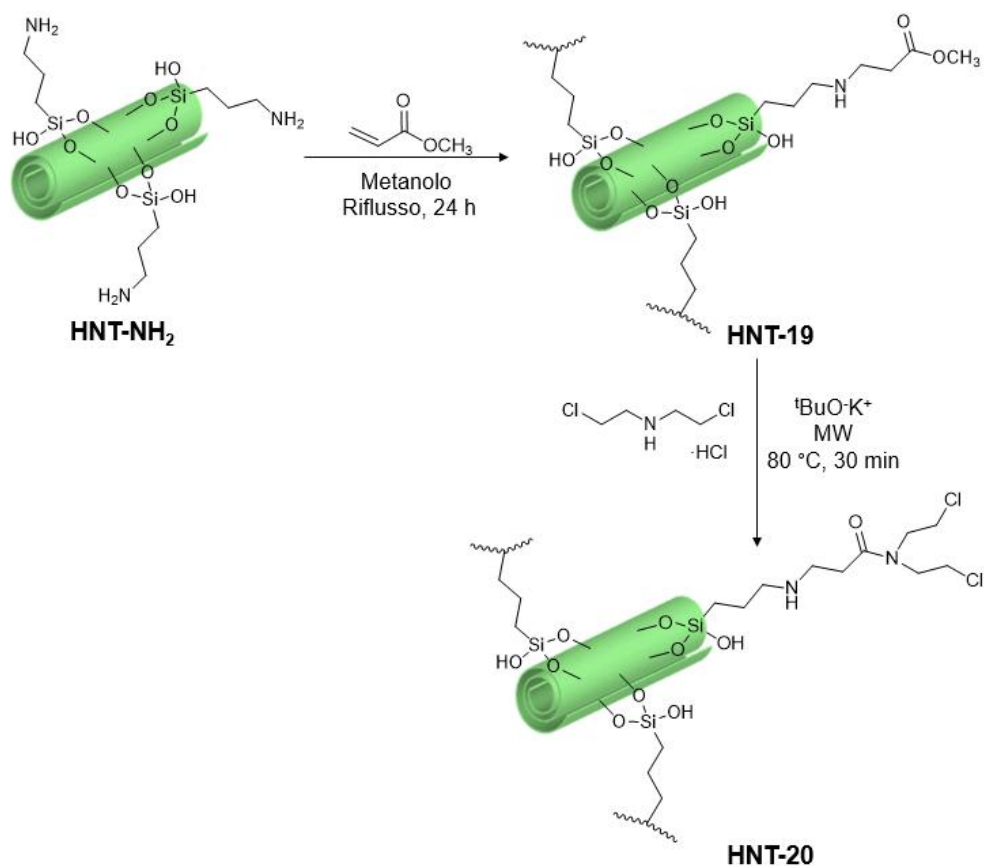


Figura 49. (a) Spettri FT-IR di **HNT-NH₂** e di **HNT-18**, (b) Curve termogravimetriche di **HNT** e di **HNT-18**

Successivamente, si è provato a far reagire il nanomateriale ottenuto con la sonda **16**, in condizioni di *click chemistry*, sia per via classica che tramite l'utilizzo delle microonde, ma in entrambi i casi la reazione non ha avuto l'esito desiderato.

La seconda strategia sintetica ha previsto l'introduzione sulla superficie esterna degli HNT di unità dendrimeriche che potrebbero aumentare il caricamento della molecola **16** sull'argilla. Per tale scopo si è adottata una strategia sintetica divergente che ha previsto la costruzione del dendrimero sugli HNT, usando come *scaffold* iniziale il nanomateriale **HNT-NH₂**, secondo la procedura sintetica riportata nello Schema 13.¹²⁶



Schema 13. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-20**

In un primo passaggio **HNT-NH₂** è stato fatto reagire con il metilacrilato in metanolo, a riflusso per 24 h, al fine di ottenere il nanomateriale **HNT-19** che mostra una percentuale di caricamento, stimata tramite TGA, pari al 5.0 %p/p. Successivamente, questo è stato fatto reagire con la bis(2-cloroetil)-ammina cloridrato sotto irradiazione microonde a 80 °C, per 30 min, in presenza di ^tBuOK per dare il nanomateriale **HNT-20**.

In Figura 50 sono riportati gli spettri FT-IR dei nanomateriali **HNT-NH₂**, **HNT-19** e **HNT-20**. Come è possibile osservare, dopo l'ancoraggio del metil acrilato, nello spettro FT-IR del nanomateriale **HNT-19** è osservabile la presenza del picco relativo alla vibrazione di *stretching* del gruppo estereo a ca. 1725 cm⁻¹. In seguito alla reazione di ammidazione, tale picco scompare indicando l'avvenuta reazione. Nello spettro FT-IR del nanomateriale **HNT-20** sono infatti presenti dei picchi a ca. 3425 cm⁻¹ attribuibile allo *stretching* del legame N-H del gruppo ammidico, a ca. 1650 cm⁻¹ e a 1450 cm⁻¹ dovuti alle vibrazioni di *stretching*, rispettivamente, del legame C=O dell'ammide e del legame C-N.

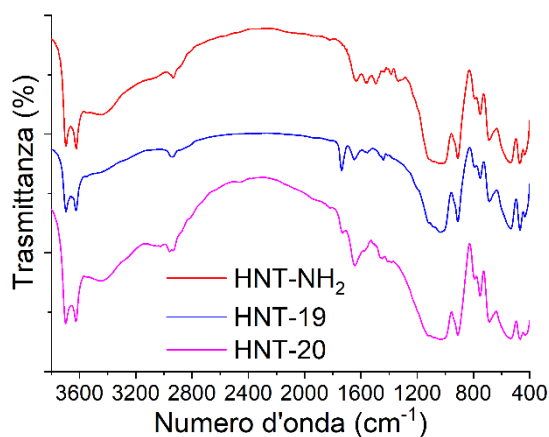


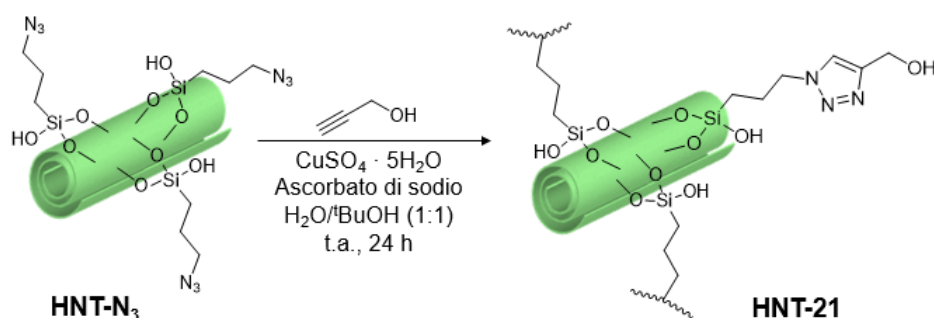
Figura 50. Spettri FT-IR di **HNT-NH₂**, **HNT-19** e **HNT-20**

Parallelamente sono state provate diverse vie sintetiche alternative, che prevedevano l'uso della bis-(2-azidoetil)-ammina per l'ottenimento di un nanomateriale con gruppi azido terminali, purtroppo nessuna condizione sperimentale provata ha portato al prodotto desiderato.

Alla luce dei risultati sperimentali ottenuti, risulta chiaro che per l'ancoraggio di **16** su HNT, la strategia sintetica migliore risulta quella basata sulla reazione di *click chemistry* tra **HNT-N₃** e **16**.

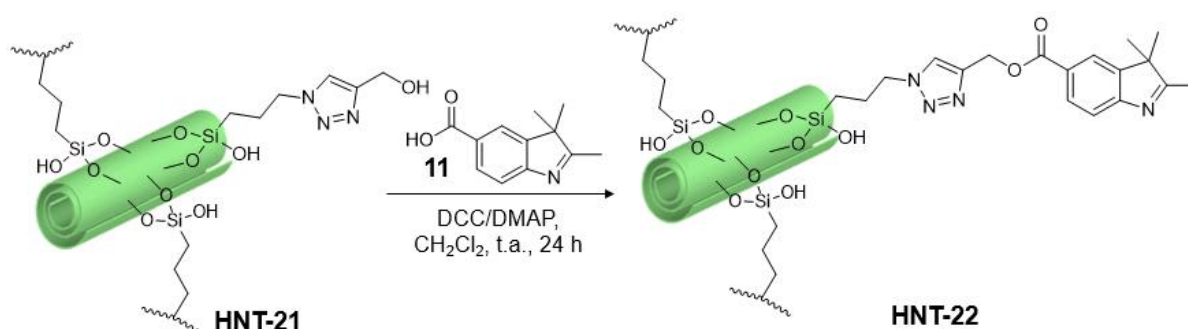
2.3.2. Ancoraggio covalente della sonda alocromica mediante approccio *Bottom up*

Nell'approccio sintetico alternativo di tipo *bottom up*, il nanomateriale presentante gruppi azido terminali è stato fatto reagire con l'alcol propargilico nelle medesime condizioni di *click chemistry* descritte precedentemente per l'approccio *top down*. In questo modo, si è ottenuto il nanomateriale **HNT-21** (Schema 14), dove tramite analisi termogravimetriche (vedi Appendice 2) si riscontra che è stata ottenuta la completa modificazione dei gruppi azido sugli HNT (Tabella 6).



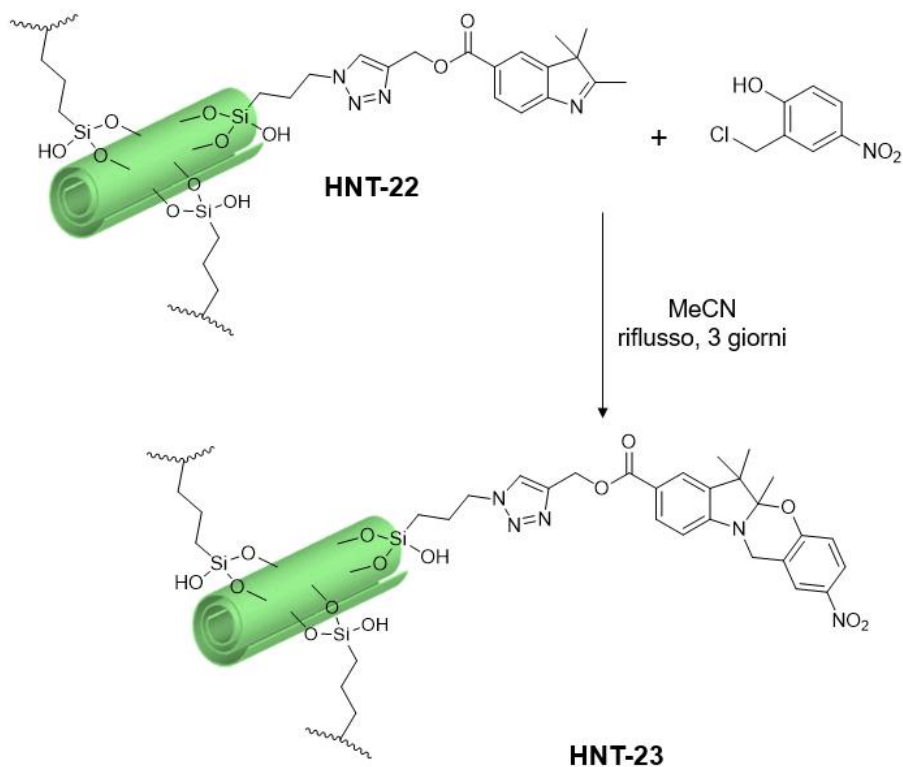
Schema 14. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-21**

Successivamente, è stata condotta una reazione di condensazione tra **HNT-21** e **11** precedentemente sintetizzato, dando origine al nanomateriale **HNT-22** (Schema 15).



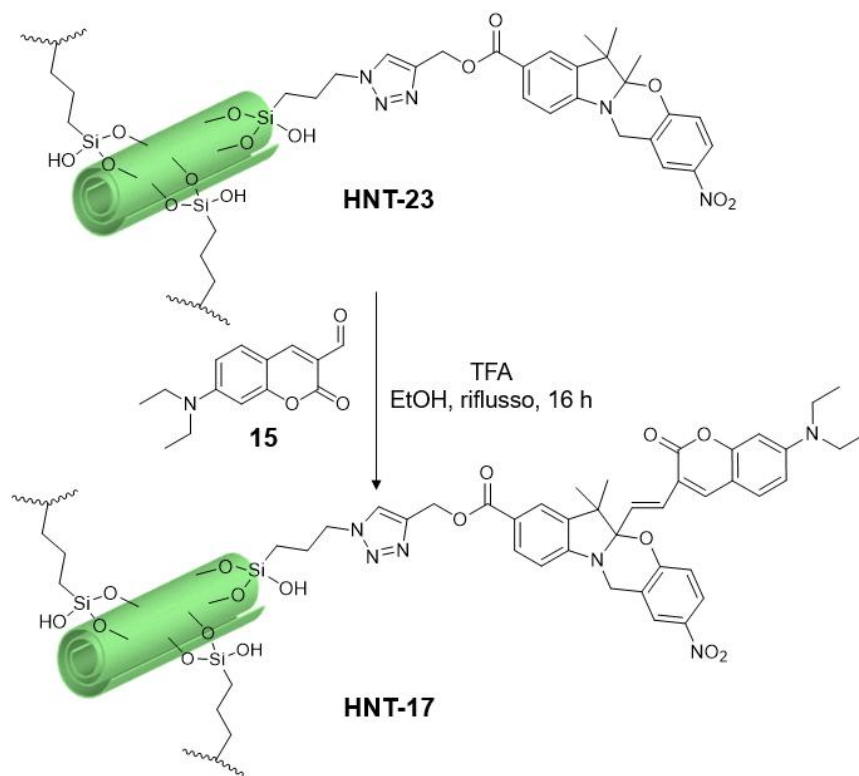
Schema 15. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-22**

In seguito, quest'ultimo nanomateriale ha reagito con il 2-clorometil-4-nitrofenolo mediante reazione di condensazione, ottenendo **HNT-23** (Schema 16).



Schema 16. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-23**

Infine, l'ultima reazione di questa seconda strategia sintetica è avvenuta con la cumarina precedentemente sintetizzata, per ottenere il nanomateriale **HNT-17** atteso (Schema 17).



Schema 17. Rappresentazione schematica della sintesi di **HNT-17** tramite approccio bottom up

Tutti i nanomateriali sintetizzati attraverso questo approccio sono stati sottoposti a analisi tramite spettroscopia FT-IR che ha evidenziato la comparsa, in ogni *step*, delle tipiche bande vibrazionali dei gruppi ancorati (vedi Appendice 2). È interessante notare, che lo spettro FT-IR ottenuto dopo il primo *step* mostra la scomparsa della tipica vibrazione di *stretching* del gruppo azido a conferma della funzionalizzazione stechiometrica con l'alcol propargilico. Mentre, lo spettro FT-IR del nanomateriale ottenuto nell'ultimo passaggio presenta caratteristiche vibrazionali con delle bande di *stretching* e *bending* simili ma meno intense rispetto a quelle ottenute con l'approccio *top down*, a conferma che il caricamento della sonda alocromica è notevolmente più basso. Come è possibile osservare dai dati riportati in tabella, la reazione di condensazione tra la cumarina e il nanomateriale **HNT-23** non porta a caricamenti soddisfacenti. Anche in questo caso l'approccio *bottom up* non risulta vantaggioso per l'ottenimento del prodotto desiderato.

Tabella 6. Caricamento e grado di funzionalizzazione dei vari nanomateriali ottenuti attraverso l'approccio *bottom up*

Nanomateriale	Caricamento (% p/p)	Grado di funzionalizzazione (mmol g ⁻¹)
HNT-N₃	2.3	0.27 ± 0.02
HNT-21	1.5	0.26 ± 0.01
HNT-22	4.7	0.25 ± 0.01
HNT-23	3.0	0.20 ± 0.01
HNT-17	< 1	< 0.04

2.3.3. Caratterizzazione del sistema HNT-17

Ulteriori caratterizzazioni sono state dunque effettuate sul nanomateriale **HNT-17** ottenuto tramite l'approccio *top down*.

L'avvenuta modifica degli HNT è stata valutata in un primo momento mediante TGA. In Figura 51 sono riportate le curve termogravimetriche del nanomateriale **HNT-17** e del suo precursore. Oltre alle tipiche perdite di massa dell'halloysite, derivanti dall'espulsione delle molecole d'acqua interstrato a ca. 550 °C, e a quelle dovute alla degradazione e volatilizzazione della materia organica presente in **HNT-N₃** a ca. 250 °C, nella curva TGA di **HNT-17** è stato osservato un percorso di degradazione a due fasi. Tale degradazione risulta evidente nelle curve derivate in cui si riscontra la presenza di due picchi, nel nanomateriale **HNT-17**, centrati rispettivamente a circa 200 e 300 °C. Dall'analisi del residuo fisso a 800 °C è stato possibile calcolare la percentuale di caricamento discussa precedentemente.

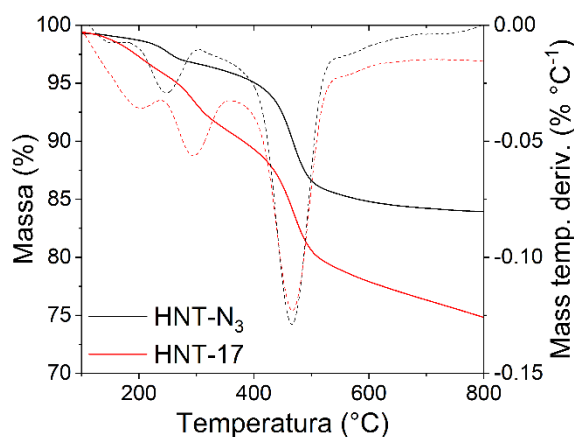


Figura 51. Curve termogravimetriche (linea continua) e loro derivate (linea tratteggiata) dei nanomateriali **HNT-N₃** e **HNT-17** ottenuto tramite l'approccio top down.

In Figura 52 sono riportati gli spettri FT-IR di **HNT-17** e dei suoi precursori, ovvero la molecola organica **16** e di **HNT-N₃** per confronto. Lo spettro FT-IR del nanomateriale **HNT-17** presenta sia tutte le bande attribuibili all'halloysite¹²⁷ sia le bande dovute alla presenza della porzione organica, le quali si riscontra essere molto simili a quelle visibili nello spettro FT-IR della sola sonda alocromica.⁸⁶ In particolare, a 2966, 2927 e 2848 cm⁻¹ si osservano delle bande corrispondenti allo *stretching* asimmetrico e simmetrico dei gruppi metile e metilene, a 1714 cm⁻¹ vi è una banda caratteristica che si può attribuire al gruppo C=O e tra 1620 e 900 cm⁻¹ vi sono delle bande derivanti dallo *stretching* e dal *bending* della porzione aromatica e dallo *stretching* dei legami C–O e C–N. Inoltre, la riduzione dell'intensità della caratteristica banda di vibrazione del gruppo azido a ca. 2100 cm⁻¹ conferma il successo della reazione di *click chemistry*.

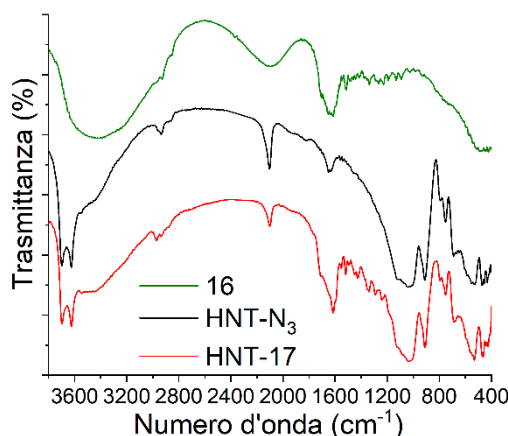


Figura 52. Confronto degli spettri FT-IR di **16**, **HNT-N₃** e **HNT-17** ottenuto tramite approccio top down

Sono state inoltre studiate le proprietà colloidali mediante misure di DLS e di potenziale ζ . Il nanomateriale **HNT-17** mostra una dimensione media di 485 ± 30 nm, più grande rispetto a quella della sola halloysite (295 nm). Ciò fa capire come il nanomateriale ottenuto presenti una peggiore diffusione in ambiente acquoso a causa dell'introduzione della molecola

idrofobica sulla superficie esterna di HNT. Al contrario, le misure di *dynamic light scattering* effettuate in MeCN hanno rivelato una dimensione media di **HNT-17** (260 ± 7 nm) simile a quella degli HNT (240 ± 80 nm) nello stesso solvente, confermando ulteriormente la formazione di aggregati in ambiente acquoso. Invece, dalle misure di potenziale ζ si riscontra che **HNT-17** ha un valore di potenziale di -9.20 mV, più positivo rispetto all'halloysite (-20 mV).

Anche lo studio della morfologia del nanomateriale **HNT-17** ha confermato il successo della reazione. Le immagini presente in Figura 53 sono state ottenute mediante HAADF-STEM e TEM, accoppiato con sonda EDX. L'immagine TEM (Figura 53) mostra come la tipica struttura tubolare degli HNT sia stata preservata anche dopo la funzionalizzazione covalente con la sonda alocromica **16**. Inoltre, dalla mappatura elementare estrapolata tramite sonda EDX è possibile notare come le molecole organiche siano uniformemente distribuite sulla superficie esterna dell'halloysite (Figura 53B). Dall'analisi EDX (Figura 53C) è stato possibile ricavare gli atomi presenti: oltre agli atomi di Al, Si e O relativi all'argilla, sono presenti atomi di C e N relativi alla porzione organica aggiunta.

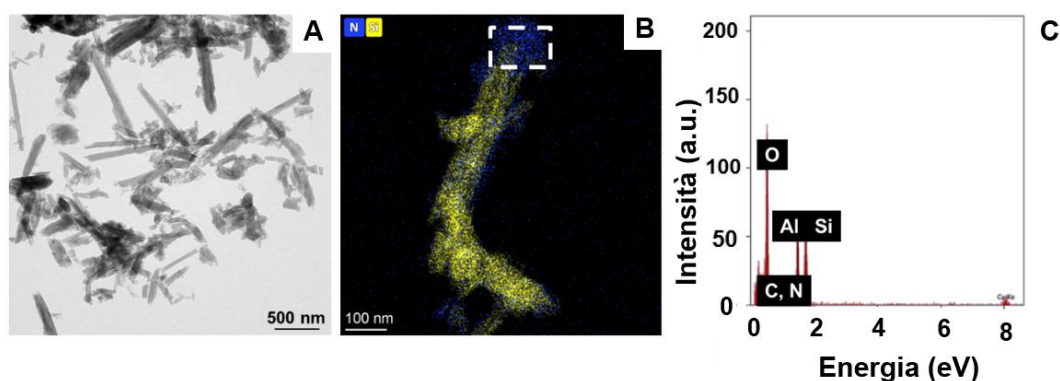


Figura 53. (A) TEM, (B) mappature elementali ottenute tramite EDX, (C) spettro EDX di **HNT-17**

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta funzionalizzazione dell'argilla è stata fornita dallo studio delle proprietà fotofisiche di dispersioni di **HNT-17**, sia in assorbimento che in emissione (Figura 54b). In particolare, gli spettri del nanomateriale sono stati acquisiti disperdendo la polvere in diversi solventi. Tra questi, il primo solvente scelto è stato l'acetonitrile, nel cui spettro si riscontra un intenso assorbimento a ca. 410 nm associato alla parte cumarinica della molecola organica. Cambiando il pH del mezzo, registrando quindi lo spettro UV-vis della dispersione di **HNT-17** in una miscela MeCN/HCl (3 N) (1:1), si osserva uno spostamento batocromico della banda di assorbimento da 410 a circa 614 nm, come conseguenza della protonazione dell'anello ossazinico, formando così la forma aperta della molecola **16**. Queste due forme coesistono in equilibrio se lo spettro UV-vis di **HNT-**

17 viene registrato in una miscela MeCN/H₂O (1:1). Questi spettri sono simili a quelli che si ottengono per la semplice molecola organica **16** (Figura 54a) nelle medesime condizioni, per indicare che essa non ha subito alcun cambiamento nelle sue caratteristiche di assorbimento dopo il legame covalente sulla superficie esterna dell'argilla. Allo stesso modo, queste tre dispersioni sono state eccitate a 410 nm, riscontrando un'emissione a ca. 470 nm in MeCN e MeCN/H₂O (1:1), relativa alla fluorescenza della forma chiusa della molecola, mentre in MeCN/HCl (1:1) non si riscontra alcuna emissione. Al contrario, eccitando quest'ultima a 614 nm si ottiene un'emissione molto intensa a 680 nm, associata alla fluorescenza della forma protonata.

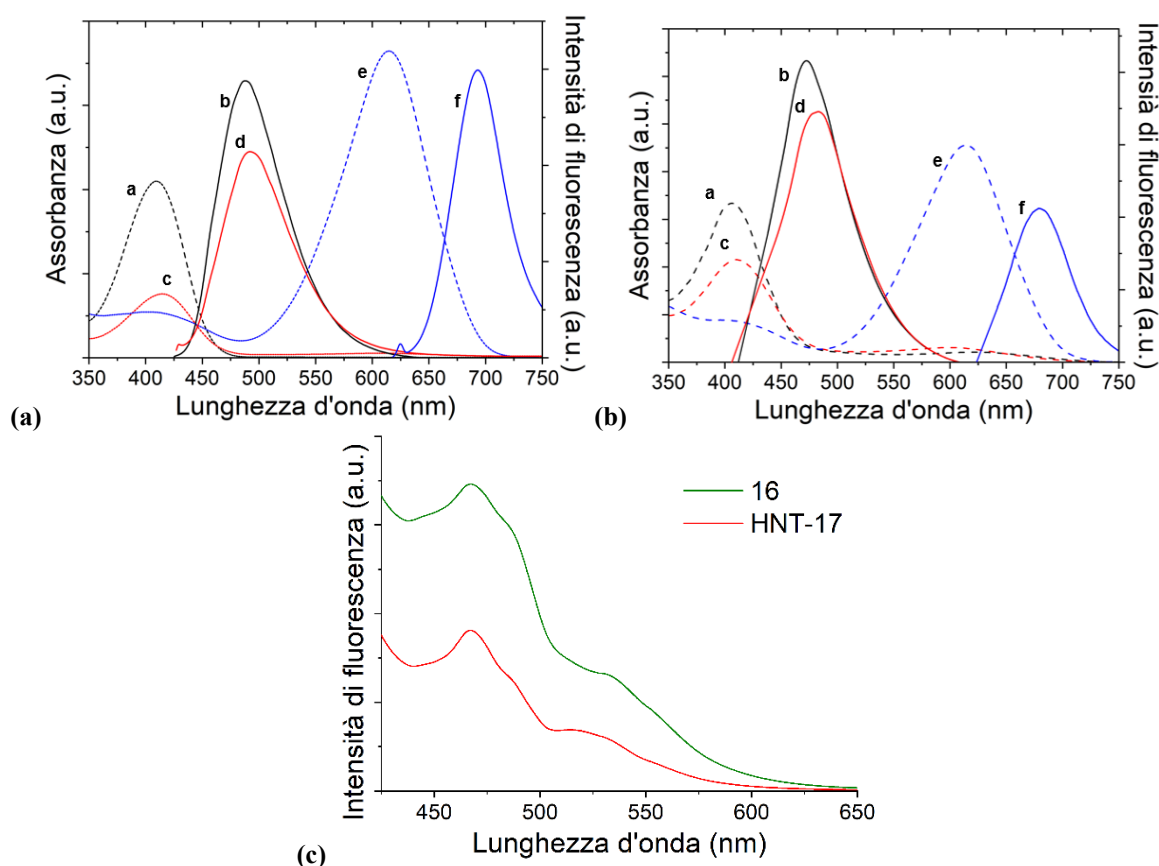


Figura 54. Spettri di assorbimento (linee tratteggiate) e di emissione (linee continue) in diversi solventi di (a) **16** (3×10^{-5} M, 298.15 K) e (b) **HNT-17** (0.25 mg mL⁻¹, 298.15 K) in MeCN (a-b), H₂O/MeCN (1:1) (c-d), HCl/MeCN (1:1) (e-f); (c) spettri di fluorescenza allo stato solido di **16** e **HNT-17**

Dal confronto tra i massimi di emissione del nanomateriale **HNT-17** nei vari solventi e quelli della corrispondente molecola organica, emerge uno spostamento ipsocromico di circa 10 nm, segno che l'ambiente circostante la molecola è cambiato. Tuttavia, analizzando gli spettri di fluorescenza allo stato solido della sonda **16** e del nanomateriale **HNT-17**, eccitati entrambi a 410 nm, si osserva che i due sono sovrapponibili (Figura 54c). Si è quindi riscontrato come le proprietà di assorbimento e di emissione della sonda fluorescente legata covalentemente sulla superficie esterna dell'halloysite cambino in base alla diversa acidità

del solvente utilizzato. In particolare, si stabilisce un equilibrio tra le due forme, aperta e chiusa, della molecola **16**. Le proporzioni relative a queste due forme dipendono dal valore di pH. Ciò renderebbe possibile distinguere le emissioni delle due specie utilizzando canali separati di uno stesso microscopio.

Sono state quindi studiate le proprietà alocromiche del nanomateriale **HNT-17** a diversi pH (Figura 55a). Il nanomateriale, così come la sola molecola organica **16**, è altamente idrofobico e non si disperde facilmente in ambiente acquoso. Tuttavia, si è riscontrato che **16** si solubilizza facilmente in presenza di quantità adeguate del tensioattivo Pluronic 123 (P123), mantenendo inalterate le proprietà fotofisiche fino a concentrazioni dell'ordine del micromolare. Infatti, questo particolare polimero anfifilico è noto per formare micelle in grado di incapsulare molecole idrofobiche al loro interno e di solubilizzarle in ambienti acquosi.¹⁵ Di conseguenza, si è deciso di usare lo stesso tensioattivo P123 anche per il nanomateriale ottenuto, al fine di valutare al meglio le proprietà spettroscopiche di assorbimento ed emissione di dispersioni di **HNT-17** in tamponi a diversi pH.

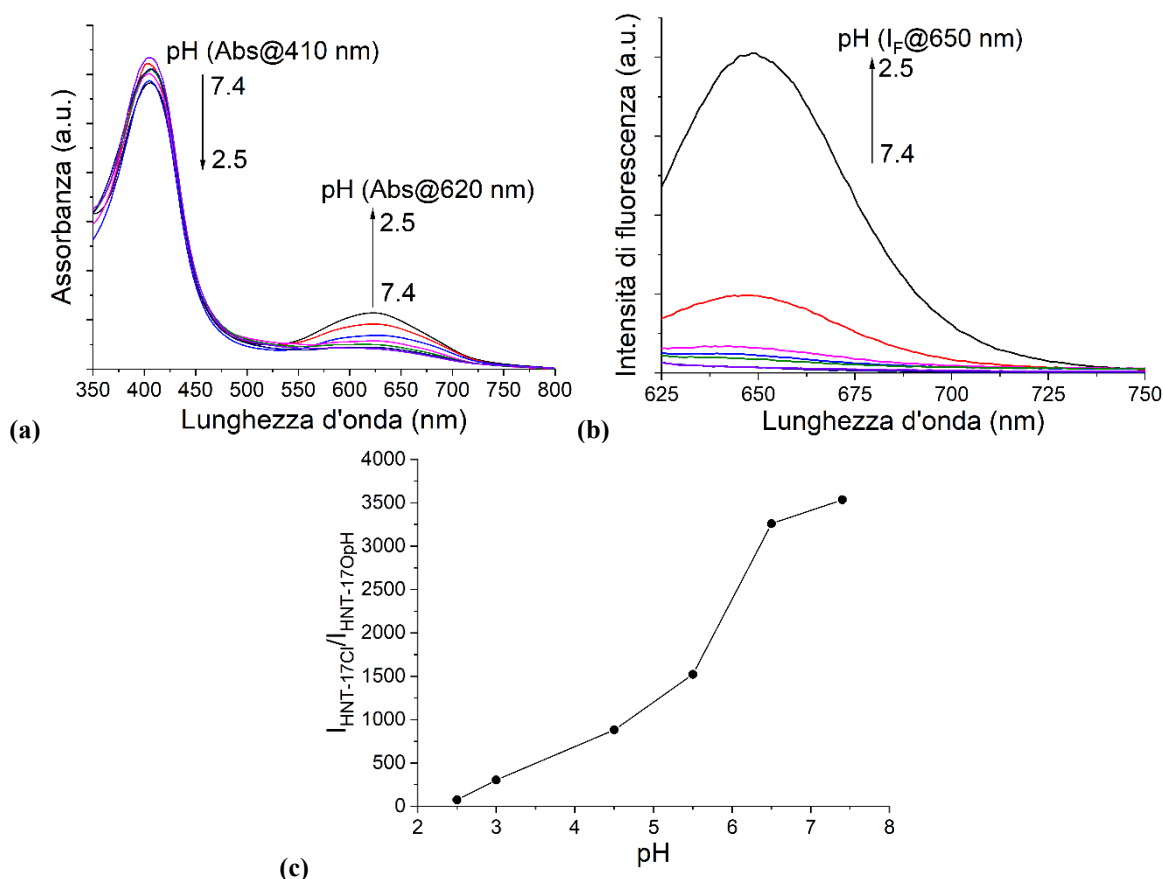


Figura 55. Spettri di (a) assorbimento e (b) emissione di una dispersione di **HNT-17** (0.25 mg mL^{-1} , 298.15 K) a differenti pH in presenza di Pluronic 123; (c) andamento del rapporto tra le intensità di emissione delle forme chiuse e aperte del nanomateriale **HNT-17** (0.25 mg mL^{-1}) in funzione del pH

Anche in questo caso, gli spettri di assorbimento di **HNT-17** mostrano lo stesso comportamento della sola molecola organica. Di conseguenza, al diminuire del pH (da 7.4 a

2.0) si riscontra che la banda di assorbimento della forma chiusa a 410 nm diminuisce, mentre quella a 620 nm, associata alla forma aperta, aumenta. Questo tipo di andamento si riscontra anche negli spettri di emissione (Figura 55b). In particolare, diminuendo il pH della dispersione, si verifica un aumento dell'emissione a 650 nm. Inoltre, mettendo in grafico il rapporto tra le intensità di emissione della forma chiusa ($I_{\text{HNT-17Cl}}$) e quelle della forma aperta ($I_{\text{HNT-17OpH}}$) in funzione del pH, si osserva un aumento monotono (Figura 55c); come già era noto per la sola sonda alocromica.¹⁵

Allo stesso modo, sono state studiate le proprietà termocromiche di **HNT-17**. I composti termocromici modificano reversibilmente la loro capacità di assorbire la luce visibile in risposta alla temperatura.¹²⁸ Generalmente, ciò è dovuto alla possibile interconversione di due specie con bande di assorbimento diverse. Come per le proprietà alocromiche, un cambiamento di temperatura offrirebbe l'opportunità di eseguire misure raziometriche.

Analogamente a quanto si riscontra per la sola molecola organica, anche per una dispersione di **HNT-17** in una miscela MeCN/H₂O (1:1), si nota che aumentando la temperatura da 289.15 K a 343.15 K si osserva una diminuzione dell'assorbanza della forma aperta a ca. 610 nm e un concomitante leggero aumento del massimo di assorbanza a 410 nm (Figura 56).

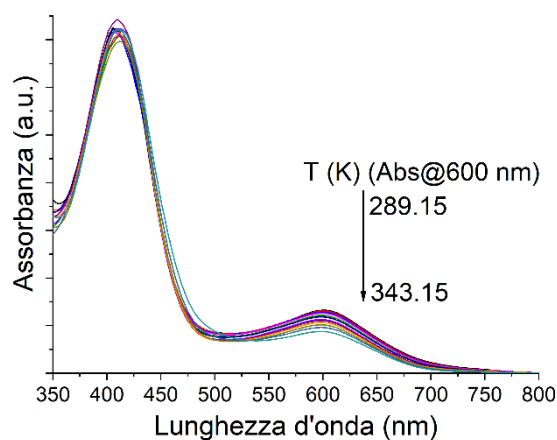


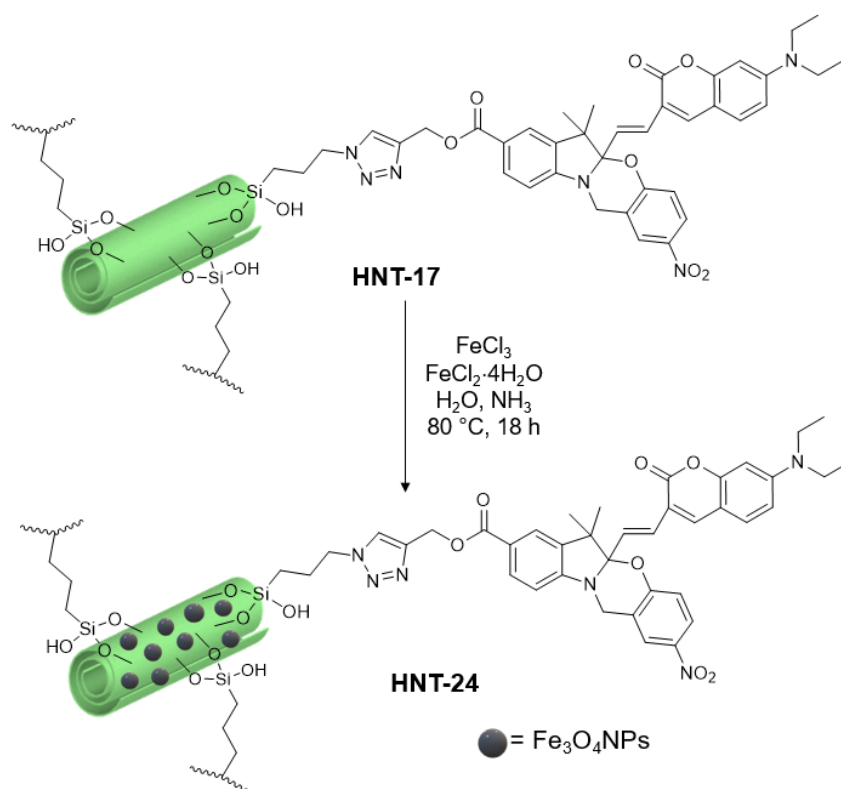
Figura 56. Spettro di assorbimento di una dispersione di **HNT-17** (0.25 mg mL^{-1}) a differenti temperature in una miscela MeCN/H₂O (1:1)

2.3.4. Sintesi e caratterizzazione del nanomateriale HNT-17 caricato con nanoparticelle di Fe₃O₄

Considerata la tipologia di modifica sugli HNT, si è pensato di funzionalizzare ulteriormente la superficie esterna degli HNT in modo da sviluppare un sistema teranostico. Le caratterizzazioni fotofisiche effettuate hanno mostrato che il nanomateriale potrebbe essere utile per fini diagnostici per la distinzione delle cellule tumorali da quelle sane grazie al diverso pH. Quindi, si è pensato di introdurre un agente terapeutico, quali le nanoparticelle ferromagnetiche (Fe₃O₄NPs) che possano essere impiegate come catalizzatori per la terapia

chemodinamica. Queste nanoparticelle sono state introdotte sulla superficie esterna dell'halloysite funzionalizzata con la sonda alocromica mediante metodo della coprecipitazione, ottenendo in questo modo il nanomateriale **HNT-24** (Schema 18).¹²⁹

Il metodo della coprecipitazione è l'approccio più semplice ed efficace per la sintesi di Fe_3O_4 ;¹³⁰ esso prevede la precipitazione simultanea di sali di Fe(II) e Fe(III) in un ambiente acquoso alcalino, producendo nanoparticelle magnetiche ad alta purezza. Il processo viene condotto in atmosfera inerte a 80 °C, in presenza di **HNT-17**, per una notte. La reazione chimica per la formazione delle $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ è rappresentata come segue:



Schema 18. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-24**

Dopo il *work-up*, al fine di determinare il caricamento di $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ su **HNT-17**, il nanomateriale è stato sottoposto a mineralizzazione con acqua regia e la soluzione risultante è stata trattata con tiocianato di potassio al fine di determinare la percentuale di caricamento di $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ su **HNT-24** che è risultata essere pari al 5 %p/p.¹³¹ Nel dettaglio, il metodo prevede la titolazione di una soluzione acquosa di KSCN con FeCl_3 con conseguente formazione del complesso $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ con assorbimento caratteristico a $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$. Tramite retta di taratura è quindi possibile risalire alla concentrazione di ferro in matrici incognite (Figura 57).

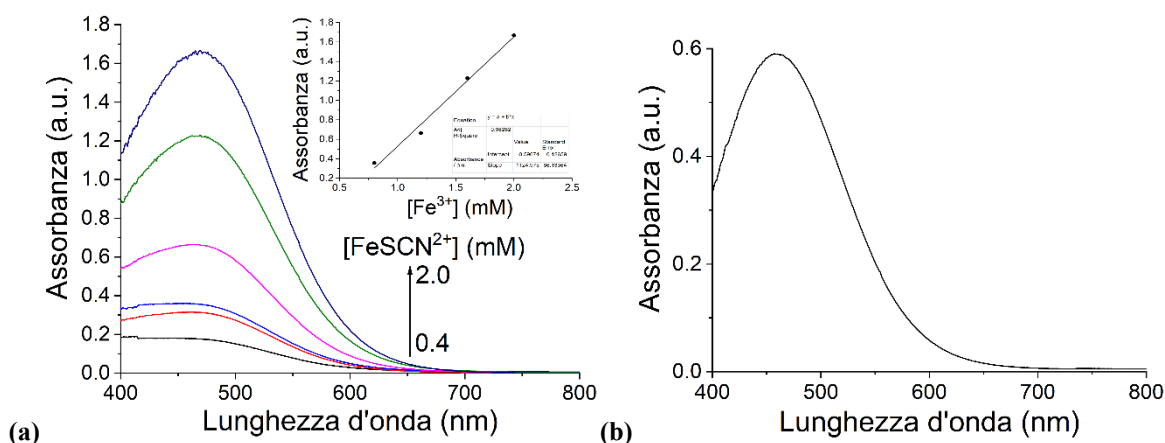


Figura 57. (a) Spettri di assorbimento della curva di calibrazione con il metodo del tiocianato. L'inserito mostra la curva di calibrazione. (b) Spettro di assorbimento della soluzione incognita trattata con tiocianato, dal nanomateriale **HNT-24** trattato con acqua regia.

Al fine di validare lo stato di ossidazione del ferro nel nanomateriale sintetizzato, questo è stato sottoposto ad analisi XPS. Lo spettro relativo all'atomo di ferro, è riportato in Figura 58, nel quale si sono osservati due picchi caratteristici corrispondenti alle specie $\text{Fe } 2p_{3/2}$ e del $\text{Fe } 2p_{1/2}$ situati rispettivamente a ca. 711.7 eV e 725.2 eV, insieme a picchi satellite a 719.1 eV e 733.0 eV. Il picco $\text{Fe } 2p_{3/2}$ è stato deconvoluto in due componenti a 711.4 eV e 713.7 eV. Calcolando il rapporto delle aree relative ai picchi relativi al Fe^{2+} e al Fe^{3+} pari a 0.28:0.71, si ottiene una stretta corrispondenza con il rapporto stechiometrico $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ del Fe_3O_4 .¹³² Similmente, anche il picco $\text{Fe } 2p_{1/2}$ è stato deconvoluto in due picchi a 724.9 eV e 727.0 eV.^{133, 134}

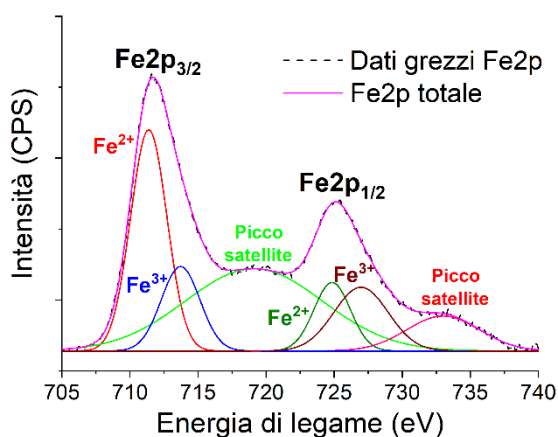


Figura 58. Spettro di deconvoluzione del Fe 2p da analisi XPS di **HNT-24**

Al fine di stimare sia la morfologia che le dimensioni delle nanoparticelle ancorate sulla superficie esterna del nanomateriale **HNT-24**, esso è stato sottoposto a indagini TEM (Figura 59). Come si può osservare dalla Figura 59A, le nanoparticelle di ferro, risultano uniformemente distribuite sulla superficie del nanomateriale **HNT-24**. Ciò è ulteriormente evidenziato dalla mappatura elementare estrapolata con la sonda EDX (Figura 59B), la quale

conferma la presenza di atomi di Fe oltre a quelli che erano già stati associati al nanomateriale **HNT-24** (Al, Si, O e C) (Figura 59D).

Immagini HR-TEM (*High Resolution – Transmission Electron Microscopy*) (Figura 59C) hanno permesso di evidenziare la presenza di nanoparticelle cristalline di Fe_3O_4 , caratterizzate da una distanza reticolare d di 0.48 nm, attribuibile al piano cristallografico (111) di Fe_3O_4 . Da analisi statistica delle particelle di Fe_3O_4 nel nanomateriale, è stato possibile stimare la presenza di particelle con diametro medio di ca. 12.3 ± 2.5 nm.

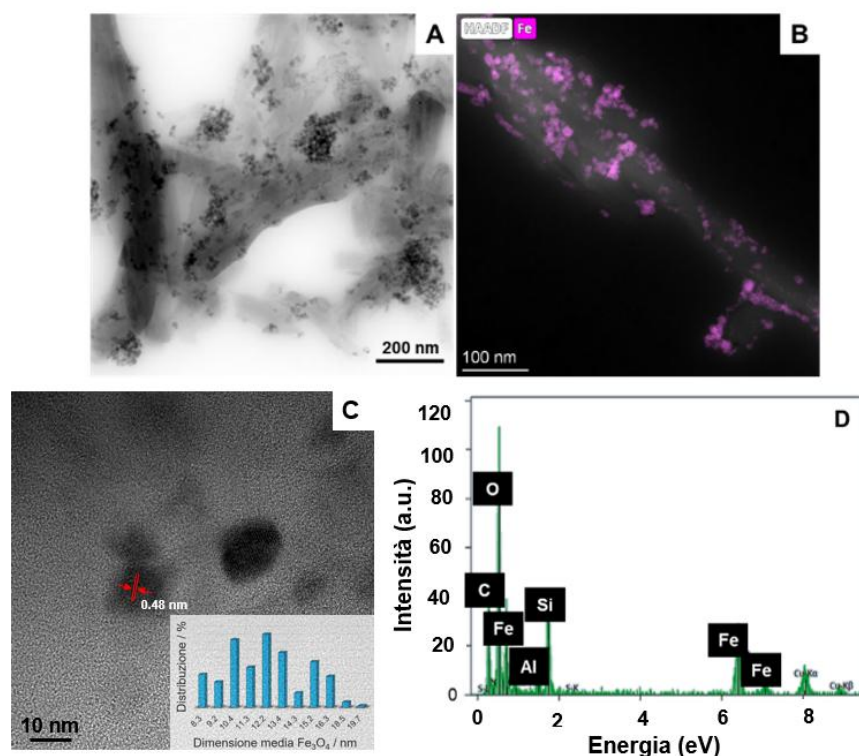


Figura 59. Immagini (A) TEM, (B) HAADF/STEM con mappatura elementare del ferro e (C) HR-TEM del nanomateriale **HNT-24**. L'inserto mostra la distribuzione delle dimensioni del diametro (numero di conteggi = 215), (D) Analisi EDX

Per valutare se il nanomateriale ottenuto possieda proprietà chemodinamiche, sono stati condotti esperimenti volti a monitorare la sua attività perossidasi, cioè la capacità di catalizzare la decomposizione di perossidi, come l'acqua ossigenata, attraverso reazioni di ossidazione che generano ROS per indurre la morte delle cellule tumorali. Per studiare l'attività perossidasi di **HNT-24** sono stati impiegati due diversi reattivi: la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e il blu di metilene.

Il TMB è un indicatore della generazione di $\cdot\text{OH}$: questa molecola può essere ossidata, in presenza di H_2O_2 , ottenendo la sua forma ossidata oxTMB che mostra un massimo di assorbimento tipico a circa 655 nm, con conseguente variazione cromatica della soluzione da incolore ad azzurro (Figura 60).



Figura 60. Illustrazione schematica del processo di ossidazione del TMB da parte di $\cdot\text{OH}$ generato dalla reazione Fenton

Una soluzione di TMB in soluzione tampone a pH 5.5, risulta stabile in presenza di H_2O_2 in assenza del nanomateriale. Al contrario, la caratteristica banda di assorbimento del TMB a ca. 290 nm scompare, con concomitante comparsa della banda a ca. 650 nm, relativa alla sua forma ossidata, in presenza del nanomateriale **HNT-24** (Figura 61), indicando che esso è capace effettivamente di produrre ROS e quindi di svolgere un'azione chemodinamica. Esperimenti condotti sia in funzione della concentrazione di nanomateriale aggiunto ($0.5 - 4 \text{ mg mL}^{-1}$) (Figura 61) che di H_2O_2 ($0 - 25 \text{ mM}$) (Figura 62a) hanno mostrato che la formazione del TMB ossidato aumenta all'aumentare di quest'ultime.

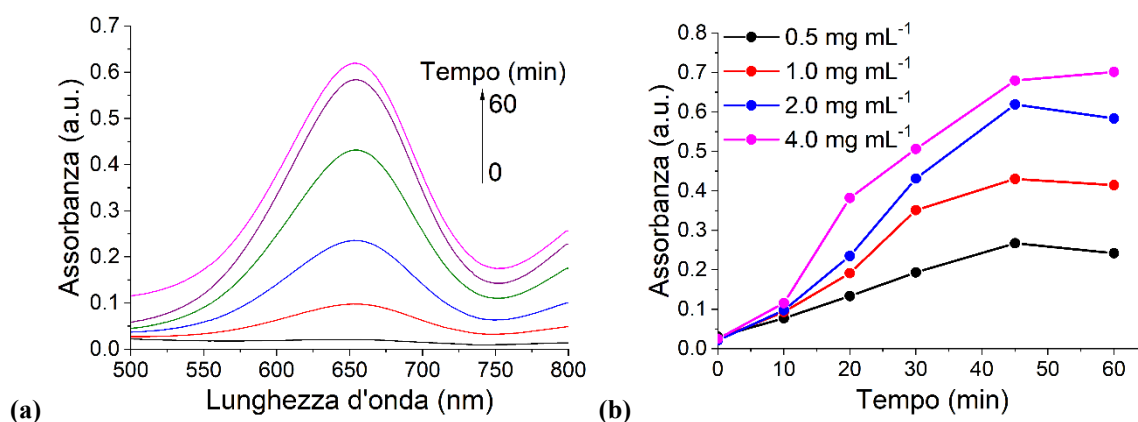


Figura 61. (a) Ossidazione tempo-dipendente del TMB indotta dalla generazione di $\cdot\text{OH}$ del nanomateriale **HNT-24** (2.0 mg mL^{-1}) con 25 mM di H_2O_2 ; (b) attività chemodinamica del nanomateriale **HNT-24** a diverse concentrazioni

In particolare, dallo studio della cinetica di formazione dei ROS in funzione della concentrazione di H_2O_2 aggiunta è stato possibile ricavare i parametri di Michaelis-Menten (Figura 62b).^{135, 136} Nel dettaglio, dalla regressione lineare Lineweaver-Burk (Figura 62c) è stato possibile calcolare la velocità di reazione (v_{max}) e la costante di Michaelis-Menten (K_m). Esse sono rispettivamente pari a $(7.9 \pm 0.4) \times 10^{-9} \text{ M s}^{-1}$ e $8.5 \pm 0.9 \text{ mM}$ e, dai dati di letteratura si è riscontrato che sono comparabili a quelle di altri nanomateriali di origine diversa ma presentanti sempre $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (Tabella 7).

Tabella 7. Confronto dei parametri cinetici (K_m e v_{max}) di un enzima naturale e di diversi nanozimi

	K_m (mM)	v_{max} (10^{-8} Ms^{-1})	Riferimento
Fe₃O₄	154	3.44	137
HRP	3.7	8.71	137
Ag@Fe₃O₄	75.2	2.28	138
Casein-Fe₃O₄	4.75	15.9	139
Fe-CDs	97.64	0.424	140
HNT-24	8.5	0.8	141

Gli esperimenti considerati fino ad ora sono stati condotti in tampone acetato a pH pari a 5.5. Per confermare che queste condizioni sperimentali siano ottimali, l'assorbanza del sistema è stata studiata a diversi pH (da 3.5 a 7.0). Come si riscontra in Figura 62d, il pH influenza l'attività perossidasi di **HNT-24**, con pH ottimale a 4.5.

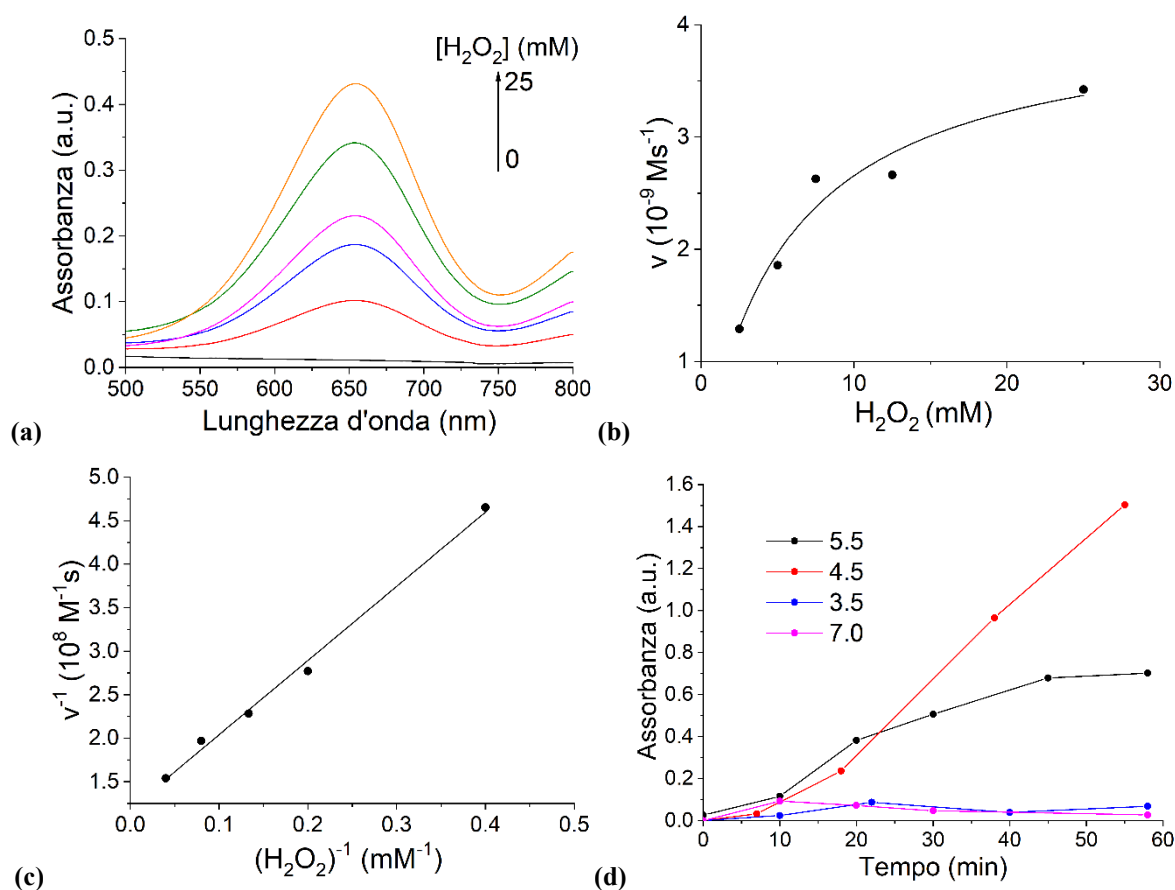


Figura 62. (a) Ossidazione del TMB in funzione della diversa concentrazione di H_2O_2 (da 2.5 a 25 mM) indotta dalla generazione di ROS dal nanomateriale **HNT-24** (2.0 mg mL^{-1}), (b) cinetica di Michaelis-Menten, (c) adattamento del grafico Lineweaver-Burk (d) ossidazione del TMB in funzione del pH indotta dalla generazione di ROS dal nanomateriale **HNT-24** (4.0 mg mL^{-1}) con 25 mM H_2O_2

Un'ulteriore prova dell'attività chemodinamica del nanomateriale **HNT-24**, è stata eseguita, attraverso misura indiretta, utilizzando il blu di metilene come sonda. Infatti, esso viene

degradato dalla presenza di ROS in soluzione con conseguente scomparsa del suo caratteristico massimo di assorbimento a ca. 660 nm (Figura 63).

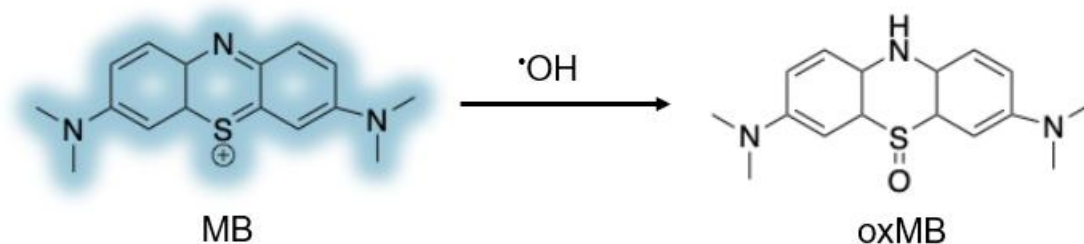


Figura 63. Illustrazione schematica del processo di ossidazione del MB da parte di $\cdot\text{OH}$ generato dalla reazione Fenton

In Figura 64a è mostrato l'andamento dello spettro di assorbimento di MB in funzione del tempo, in presenza di H_2O_2 (10 mM) e del nanomateriale **HNT-24** (0.1 mg mL^{-1}). Come si può notare, è stata osservata una diminuzione della banda di assorbimento tipica del MB, indicando che la sua degradazione avviene grazie alla generazione di $\cdot\text{OH}$. Va notato che nelle stesse condizioni sperimentali, una piccola quantità di MB viene adsorbita sul nanomateriale a causa di interazioni elettrostatiche favorevoli tra il blu di metilene avente carica positiva e la superficie esterna di **HNT-24** con carica negativa, per cui l'assorbanza del MB diminuisce anche in assenza di H_2O_2 (Figura 64b). Per tenere conto della quantità di MB assorbita sul nanomateriale, l'inserito della Figura 64a mostra la normalizzazione dell'andamento dell'assorbanza a 655 nm. Nonostante l'adsorbimento, da questo dato si osserva che il MB viene degradato dal nanomateriale sintetizzato confermando ulteriormente le sue potenzialità come agente chemodinamico.

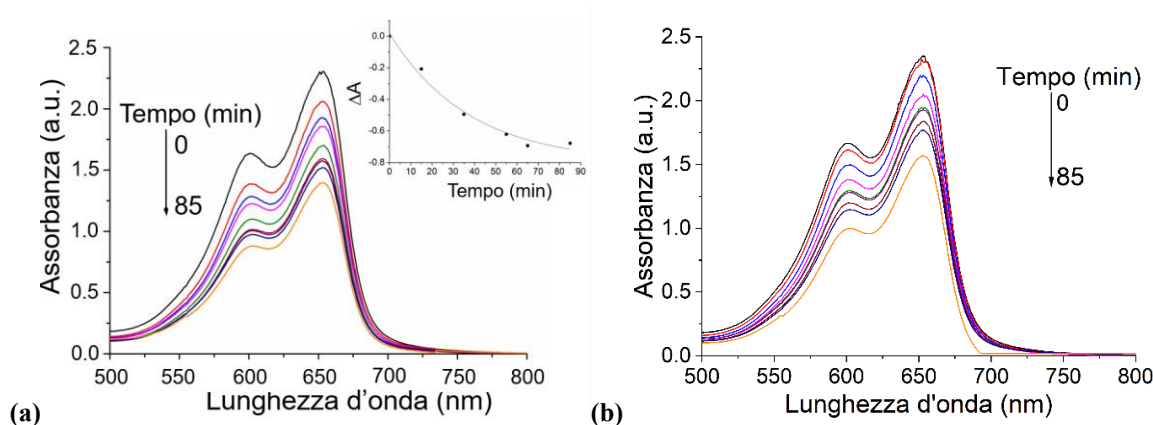


Figura 64. Andamento della banda di assorbimento del MB in funzione del tempo in presenza del nanomateriale **HNT-24** (0.1 mg mL^{-1}) (a) in presenza di H_2O_2 (10 mM) o (b) in assenza di H_2O_2 . L'inserito mostra l'andamento dell'assorbanza normalizzata in funzione del tempo

2.3.5. Sintesi e caratterizzazione di un sistema a base di hectorite e sonda alocromica

Viste le interessanti proprietà che il sistema ha mostrato, e le potenzialità in campo teranostico, si è pensato di applicare la stessa strategia sintetica per la modifica di un'altra argilla. La scelta è ricaduta sull'hectorite, un'argilla minerale appartenente al gruppo delle smectiti, quindi con stechiometria 2:1, che ha la capacità di formare gel tissotropici in ambiente acquoso. Viste questa peculiarità, la modifica di tale argilla con una sonda alocromica, potrebbe portare alla formazione di un nanomateriale che può dare origine a idrogel che possono essere usati per il *sensing* del pH attraverso una semplice variazione cromatica per applicazioni ad esempio nel campo del *food packaging*.

L'hectorite (Ht) è un magnesio silicato con formula chimica $\text{Na}_{0.3}\text{Mg}_{2.7}\text{Li}_{0.3}\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$. È un fillosilicato triottedrico, presentante una struttura a strati 2:1 (due strati tetraedrici di silice che racchiudono uno strato ottaedrico di magnesio/litio). Negli interstizi tra gli strati si trovano ioni Na^+ e molecole d'acqua, che rendono il minerale capace di rigonfiarsi in acqua.¹⁴² Essa ha la caratteristica forma a dischetto dove i gruppi silossanici sono esposti sulla faccia, mentre i gruppi silanolici si trovano sui bordi (Figura 65). Grazie alla sua composizione chimica e struttura, la funzionalizzazione covalente dell'argilla avviene lungo i suoi bordi.

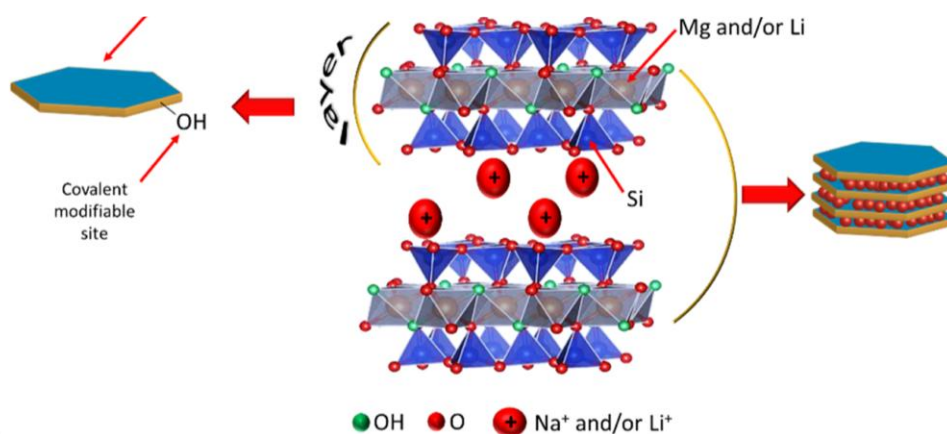
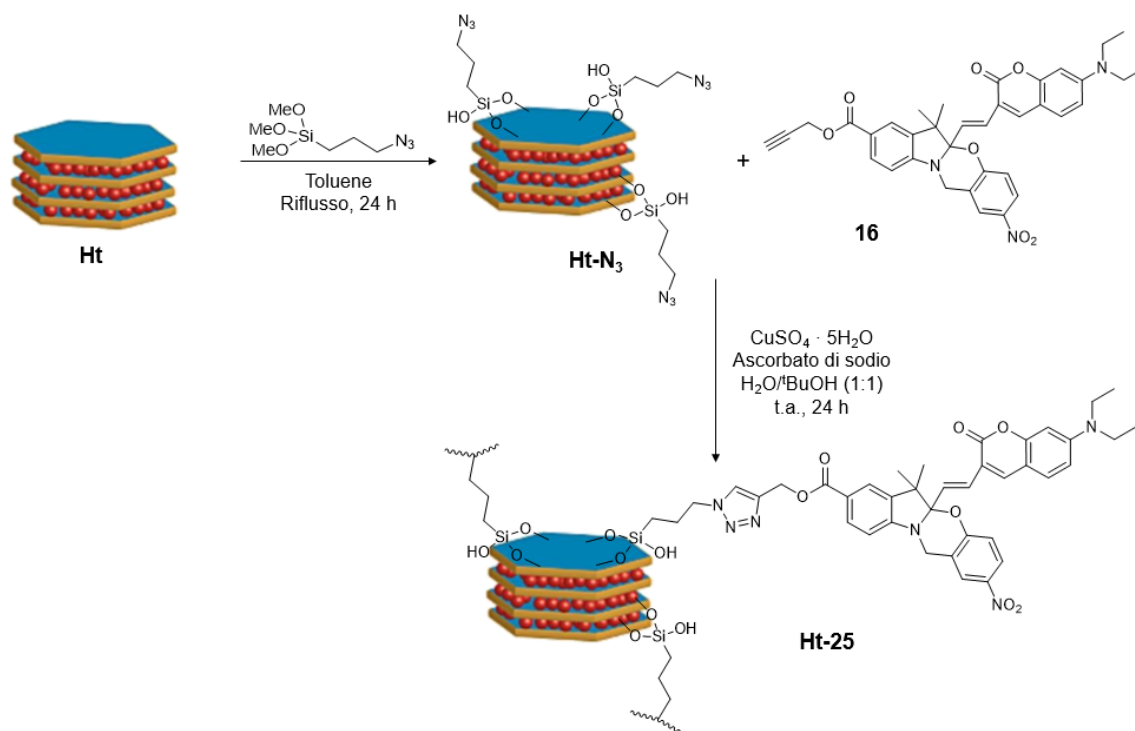


Figura 65. Diagramma schematico della struttura di Ht

Dopo aver funzionalizzato l'argilla con il 3-azidopropiltrimetossi silano, tramite la stessa strategia sintetica adottata per la funzionalizzazione dell'halloysite, il nanomateriale ottenuto è stato utilizzato per la reazione di *click chemistry* con la sonda **16** (Schema 19), con le stesse condizioni di reazione utilizzate per l'approccio *top down* tra **HNT-N₃** e **16**. Successivamente, il nanomateriale **Ht-25** ottenuto è stato isolato come polvere verde dopo successivi lavaggi con H_2O e DCM per rimuovere sia i catalizzatori (CuSO_4 e ascorbato di sodio) che alcuni reagenti residui non reagiti.



Schema 19. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **Ht-25**

Tramite analisi TGA sono stati stimati dei carichi pari a 3.2 e 12 %p/p per **Ht-N₃** e **Ht-25**; di conseguenza, sulla base dei rapporti stechiometrici dei due nanomateriali (rispettivamente pari a 0.38 mmol g^{-1} e 0.19 mmol g^{-1}) è stato determinato che il rapporto molare tra la sonda alocromica e i gruppi azido legati alla superficie dell'hectorite era 1:2. Così come per **HNT-17**, è possibile concludere che non si ha avuto un legame completo del composto sulla superficie di **Ht-N₃**; probabilmente, anche in questo caso, ciò è dovuto all'ingombro sterico della molecola organica. Al fine di confermare l'avvenuta modifica sulla superficie esterna dell'hectorite, sono stati effettuati degli studi mediante spettroscopia FT-IR e analisi termogravimetriche.

In Figura 66a e 66b si ha lo spettro FT-IR del nanomateriale **Ht-25** e quelli dei precursori, **Ht**, **Ht-N₃** e **16**, per confronto. Come è possibile osservare, nello spettro FT-IR del nanomateriale **Ht-N₃** sono presenti tutte le caratteristiche bande sia di **Ht** che dei gruppi organici, così come riportato in letteratura. In particolare, si possono osservare le bande tipiche dell'argilla come quelle presenti a ca. $3750\text{--}3150 \text{ cm}^{-1}$, dovute alle vibrazioni di *stretching* dei legami Mg-OH , Si-OH e dell'acqua adsorbita. Si riscontrano anche una banda a ca. 1635 cm^{-1} caratteristica della vibrazione di *bending* del gruppo -OH della molecola di acqua adsorbita coordinata ai cationi scambiabili del minerale argilloso; ed una banda a ca. 1020 cm^{-1} associata alle vibrazioni di *stretching* di Si-O-Si .¹⁴² Inoltre, è presente la tipica banda di vibrazione del gruppo azido a ca. 2100 cm^{-1} che conferma l'avvenuta

funzionalizzazione con l'organosilano; ed è proprio la riduzione dell'intensità di questa banda caratteristica che dimostra il successo della reazione di *click chemistry*. Così come riscontrato per **HNT-17**, lo spettro FT-IR del nanomateriale **Ht-25** presenta delle bande molto simili a quelle visibili nello spettro FT-IR della sola sonda alocromica.⁸⁶

L'analisi TGA, invece, è stata la tecnica usata per il calcolo delle percentuali di caricamento delle componenti organiche ancorate sulla superficie dell'hectorite. In Figura 66c sono riportate le curve termogravimetriche dei nanomateriali Ht, **Ht-N₃** e **Ht-25**, ed è possibile osservare come Ht e **Ht-N₃** mostrino una perdita di peso nell'intervallo tra 300 e 700 °C, corrispondente alla perdita di acqua fisisorbita e di acqua di idratazione presente nella struttura lamellare del nanomateriale.¹⁴³ Invece, il nanomateriale **Ht-25** presenta alcune perdite di massa aggiuntive attribuibili alla degradazione e volatilizzazione della porzione organica; anche in questo caso, tramite l'analisi del residuo fisso a 800 °C è stato possibile calcolare il grado di funzionalizzazione dell'argilla menzionato prima.

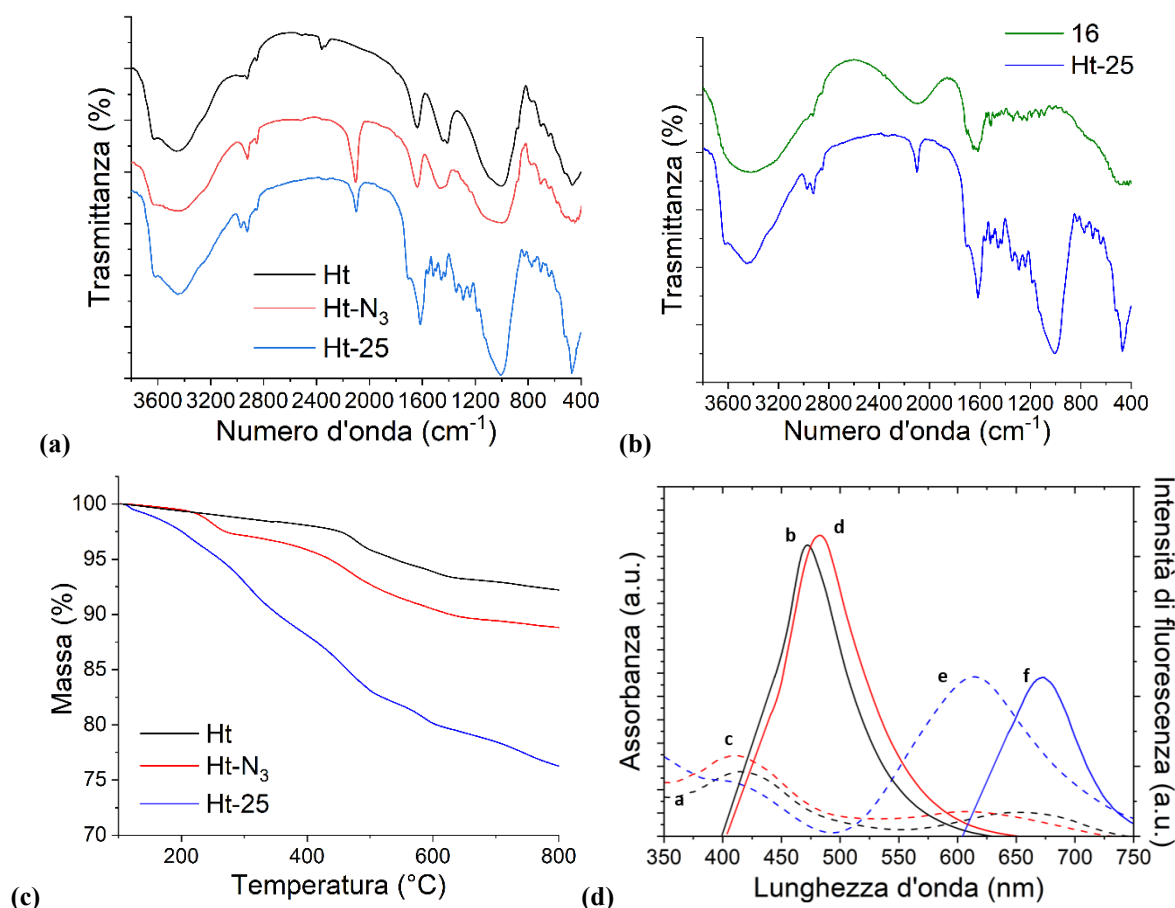


Figura 66. Confronto spettri FT-IR di (a) Ht, **Ht-N₃**, **Ht-25** e (b) **16** e **Ht-25**; (c) confronto termogrammi di Ht, **Ht-N₃**, **Ht-25**; (d) Spettri di assorbimento (linee tratteggiate) e di emissione (linee continue) in diversi solventi di **Ht-25** (0.25 mg mL⁻¹, 298.15 K) in MeCN (a-b), H₂O/MeCN (1:1) (c-d), HCl/MeCN (1:1);

Infine, un'ulteriore conferma dell'avvenuta modifica della superficie esterna di Ht con la sonda alocromica è stata fornita dallo studio delle proprietà spettroscopiche UV-*vis* e di fluorescenza del nanomateriale **Ht-25** (Figura 66d). Come per **HNT-17**, gli spettri di assorbimento e di fluorescenza sono stati acquisiti disperdendo il nanomateriale negli stessi tre solventi. Si riscontra lo stesso comportamento ottenuto per la sola molecola organica e per il nanomateriale a base di halloysite.

In particolare, anche in questo caso, si ha che cambiando il pH del mezzo, passando quindi da MeCN a MeCN/HCl (3 N) (1:1), si osserva uno spostamento batocromico della banda di assorbimento da ca. 415 nm a ca. 613 nm a causa della protonazione dell'anello ossazinico di **16**. Invece, disperdendo la polvere nella miscela MeCN/H₂O (1:1), le due forme coesistono in equilibrio. Anche negli spettri di emissione, si riscontra un andamento simile a quello discusso precedentemente per **HNT-17**. Di conseguenza, eccitando le tre dispersioni a 415 nm, si riscontra un'emissione a ca. 472 e 483 nm in MeCN e MeCN/H₂O (1:1), relativa alla forma chiusa della molecola. Al contrario, eccitando la dispersione in MeCN/HCl (1:1) a questa lunghezza d'onda non si riscontra alcuna emissione; invece eccitando a 613 nm si osserva un'emissione più intensa con un massimo a 675 nm, corrispondente alla fluorescenza della forma protonata della molecola.

Tutti questi risultati sottolineano il notevole potenziale dei nanomateriali a base di halloysite e di hectorite, evidenziando come questi possano essere dei sistemi altamente promettenti per applicazioni in ambito teranostico. La combinazione di proprietà chimico-fisiche vantaggiose e la possibilità di funzionalizzazione rende questi nanomateriali strumenti versatili sia per la diagnosi sia per il trattamento di diverse patologie. Inoltre, la biodegradabilità degli HNT apre interessanti prospettive per la somministrazione sicura e mirata dei sistemi sviluppati. È ragionevole ipotizzare che tali nanomateriali possano essere impiegati tramite diverse vie di somministrazione, come quella orale, topica o locale, adattandosi alle specifiche esigenze terapeutiche. Questo approccio potrebbe risultare particolarmente utile nel trattamento di tumori solidi, dove la possibilità di veicolare gli agenti terapeutici direttamente nel sito patologico potrebbe migliorare l'efficacia del trattamento, riducendo al contempo gli effetti collaterali sistemici.

2.4. Sistema a base di halloysite e naftalendiimmide

Negli ultimi anni, una classe di molecole organiche che ha attirato un notevole interesse per applicazioni biomediche, specialmente nel campo dell'*imaging* per fluorescenza,¹⁴⁴ è rappresentata dalle naftalendiimmidi (Figura 67). Tali molecole infatti, possono emettere in un ampio *range* di lunghezze d'onda in seguito a modifiche nella posizione 2, 3, 6 e 7. In particolare, tramite opportune modifiche delle posizioni 2 e 6 è possibile modulare le caratteristiche di emissione degli NDI,¹⁴⁵ portando alla sintesi di molecole capaci di emettere nella finestra terapeutica e quindi utili per applicazioni in teranostica.¹⁴⁶

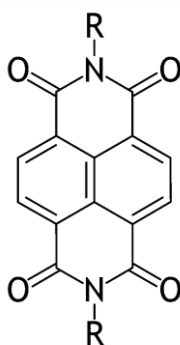


Figura 67. Struttura generale di una naftalendiimmide

Tali molecole, infatti, oltre alle proprietà di fluorescenza, possono agire come intercalanti del DNA o agenti chemoterapeutici.^{147, 148} Sfortunatamente, come tutti i fluorofori organici, gli NDI sono scarsamente solubili in condizioni fisiologiche,¹⁴⁹ il che ne limita le loro applicazioni biologiche. Negli anni sono state sviluppate diverse strategie sintetiche al fine di aumentare la loro disponibilità in acqua, le quali hanno preferenzialmente previsto modifiche strutturali del *core* naftilico. Ad esempio, Manet, Freccero e collaboratori hanno riportato la modifica sia del *core* aromatico che delle porzioni immidiche con gruppi amminici e sali di ammonio quaternario (Figura 68).¹⁴⁶

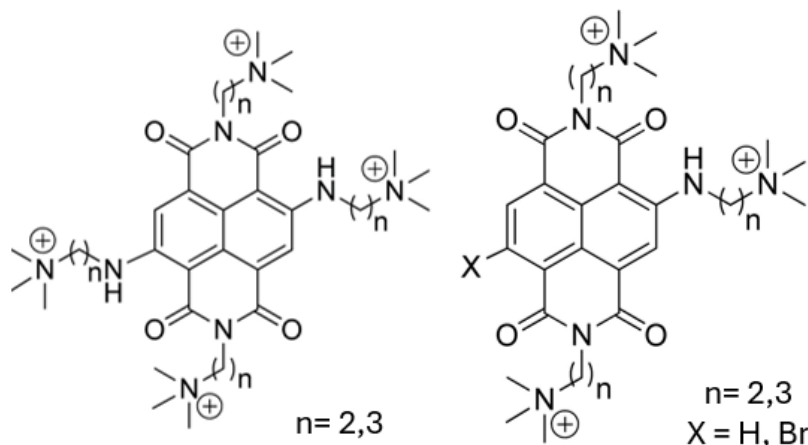


Figura 68. Strutture di diversi NDI studiati come fotosensibilizzatori per la terapia fotodinamica¹⁴⁶

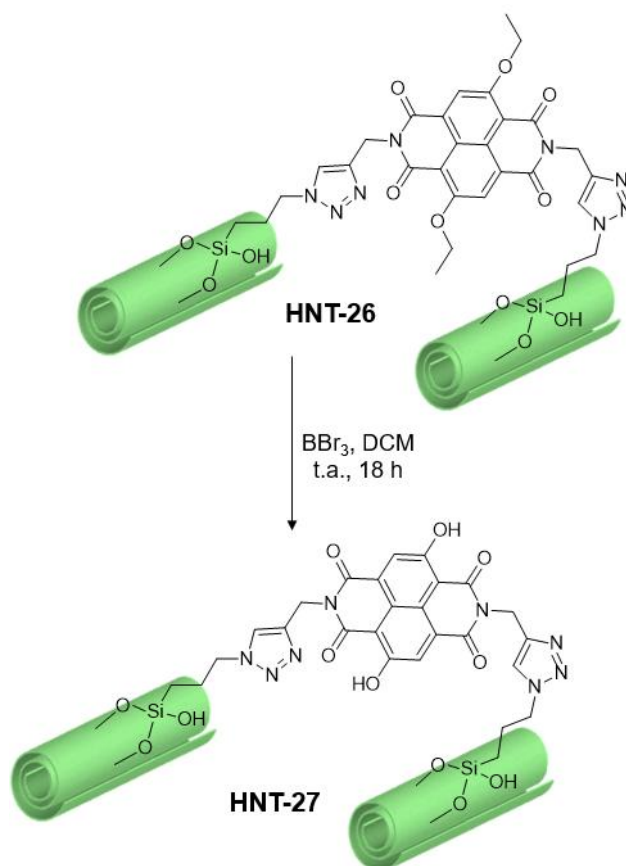
L'introduzione delle porzioni polari ha portato all'ottenimento di molecole con aumentata solubilità in ambiente acquoso, le quali hanno mostrato capacità di produrre $^1\text{O}_2$.

Recentemente, nel gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio dottorato, è stata messa a punto la sintesi per ottenere un nanomateriale basato sul legame covalente tra un derivato NDI e gli HNT. È stato quindi ottenuto un nanomateriale in cui l'NDI si trova legato alla superficie esterna dei nanotubi attraverso un anello triazolico (**HNT-26**). La sua caratterizzazione spettroscopica ha mostrato che le proprietà fotofisiche della molecola rimangono inalterate dopo il legame con l'halloysite. In particolare, esso mostra un assorbimento a ca. 475 nm, con emissione a ca. 494 nm.¹⁵⁰

Nell'ottica di utilizzare tale nanomateriale come agente fotodinamico, si è pensato di modificare il *core* dell'NDI in modo da avere un nanomateriale che presentasse un assorbimento nel verde. E' noto in letteratura che la presenza di gruppi elettron donatori, come gruppi -OH nel core dell'NDI creano un sistema *push-pull* con la porzione immodica che sposta sia l'assorbimento che l'emissione nel visibile.¹⁵¹

Si è dunque pensato di modificare il nanomateriale **HNT-26**, introducendo dei gruppi -OH nel *core*, al fine di sviluppare un sistema che potesse essere usato come potenziale fotosensibilizzatore nella terapia fotodinamica.^{145, 151}

A tal fine, il nanomateriale **HNT-26** è stato trattato con BBr_3 in DCM a temperatura ambiente, per un tempo di reazione di 18 h ottenendo il nanomateriale **HNT-27**, in cui al posto dei gruppi etossilici vi sono dei gruppi idrossilici (Schema 20).

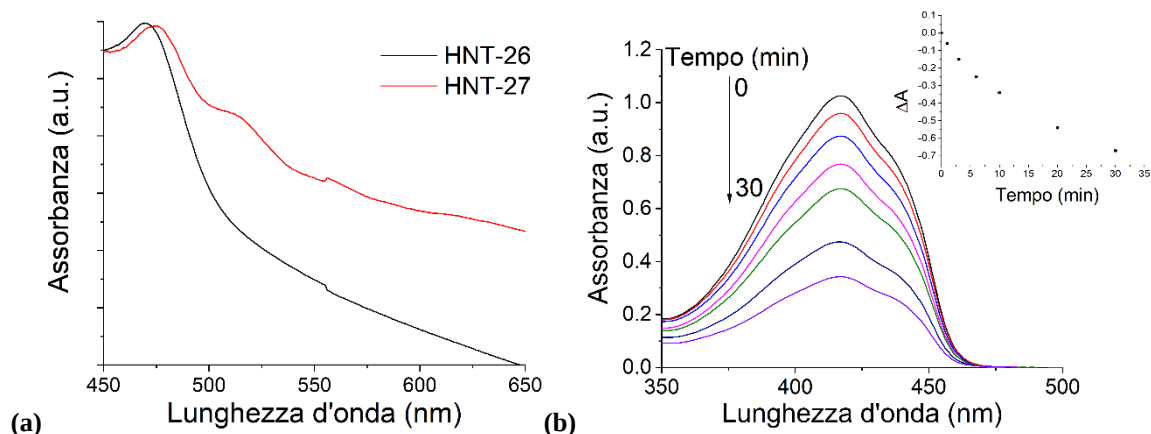


Schema 20. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-27**

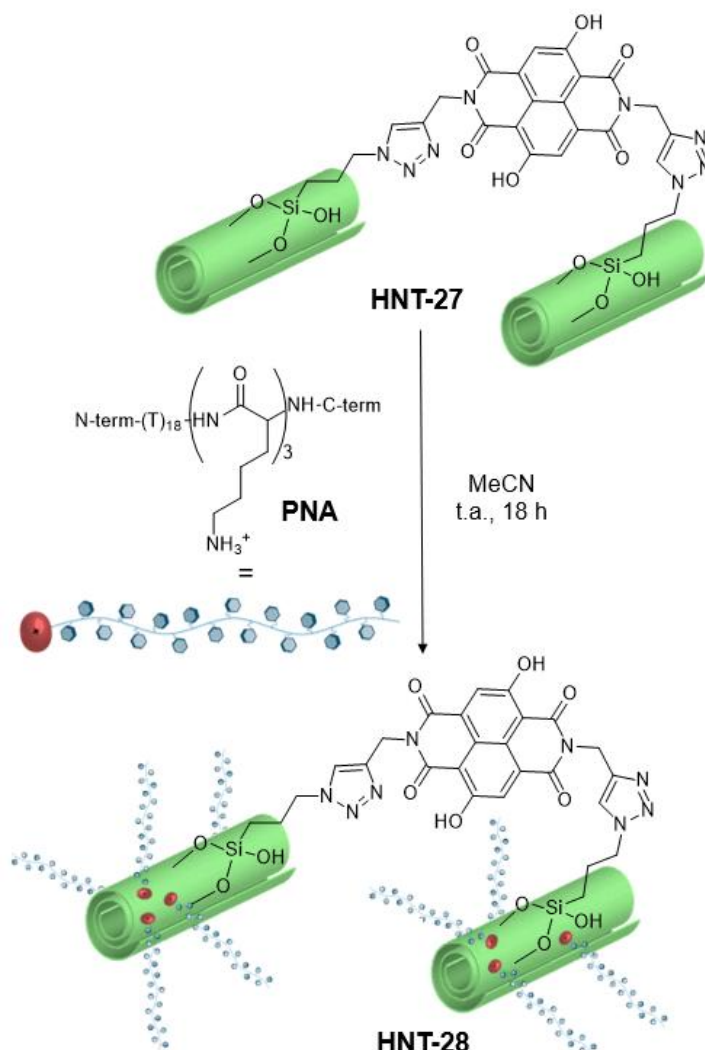
2.4.1. Caratterizzazione e studio delle proprietà fotodinamiche di HNT-27

Il nanomateriale ottenuto è stato caratterizzato tramite spettroscopia UV-*vis* per confermare l'avvenuto *cleavage* dei gruppi $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$. Come si può notare dalla Figura 69a, oltre alla tipica banda di assorbimento a ca. 474 nm, è comparsa una nuova banda di assorbimento centrata a ca. 515 nm, indice della modifica del core dell'NDI e quindi di conseguenza una variazione nelle sue proprietà spettrali. Tale modifica è risultata fondamentale per un futuro uso del nanomateriale sintetizzato come fotosensibilizzante nella PDT.

Quindi, per verificare se effettivamente il nanomateriale **HNT-27** possiede delle proprietà fotosensibilizzanti, si è condotto uno studio chimico basato sull'irradiazione di una dispersione in DMSO del nanomateriale con un LED a 515 nm in presenza di 1,3-difenilisobenzofurano usato come sonda per il rivelamento dell'ossigeno singoletto. In assenza di irradiazione il DPBF, in presenza del nanomateriale **HNT-27** (0.5 mg mL^{-1} in DMSO) risulta stabile. Al contrario, come è possibile osservare in Figura 69b, irradiando la dispersione con LED a 515 nm (150 mW), l'intensità del massimo di assorbimento del DPBF in presenza del nanomateriale **HNT-27** diminuisce in funzione del tempo, indicando che il nanomateriale produce $^1\text{O}_2$ e che dunque mostra delle proprietà fotodinamiche.



I PNA sono analoghi sintetici del DNA, nel cui scheletro i gruppi fosfato e le unità zuccherine sono sostituiti da unità di N-(2-amminoetil)-glicina recanti le diverse basi azotate, legate tra loro tramite legami peptidici. Poiché lo scheletro del PNA non contiene gruppi fosfato carichi, il legame tra filamenti PNA/DNA è più forte di quello DNA/DNA, grazie alla minore repulsione elettrostatica. La sintesi di PNA con opportune sequenze nucleotidiche permette l'ottenimento di composti che potrebbero essere impiegati come molecole *targeting* e per la regolazione dell'espressione genica.^{152, 153} In tal senso, l'interazione con gli HNT, potrebbe portare alla sintesi di un nanomateriale che in futuro potrebbe trovare applicazione nella medicina di precisione. In particolare, sul nanomateriale **HNT-27** è stato caricato, secondo una procedura nota,¹⁵⁴ un filamento di PNA costituito da 18 basi omopirimidiniche in cui nell'estremità carbossi-terminale sono stati aggiunti tre residui di lisina per migliorare la solubilità in acqua e l'affinità con la superficie esterna degli HNT carica negativamente. Nel dettaglio, ad una dispersione in acetonitrile di **HNT-27** (2.5 mL) è stata aggiunta una soluzione acquosa di PNA (2.0 mg mL⁻¹, 0.5 mL) (Schema 21).



Schema 21. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-28**

In questo modo, sulla base delle interazioni elettrostatiche che si possono instaurare tra gli HNT e il PNA, si è ottenuto un nanomateriale in cui le molecole di PNA sono caricate sulla superficie esterna dei nanotubi di halloysite.¹⁵⁴ Dopo il *work-up*, il surnatante è stato analizzato mediante spettroscopia UV-vis e la percentuale di caricamento del PNA (LD%), così come l'efficienza di caricamento (LE%), sono state calcolate secondo le seguenti equazioni:

$$LD\% = \frac{PNA_{HNT-27}}{m_{HNT-27} + PNA_{HNT-27}} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

$$LE\% = \frac{PNA_{HNT-27}}{PNA_{Tot}} \times 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

dove PNA_{HNT-27} e PNA_{Tot} sono rispettivamente la quantità di PNA caricata sul nanomateriale **HNT-27** e la quantità totale di PNA in ingresso, e m_{HNT-27} è la quantità di nanomateriale. Da questa analisi è stato stimato un caricamento di PNA nel nanomateriale di ca. il 2 %p/p, con un'efficienza di incapsulamento di ca. il 100%.

Mentre dalla spettroscopia FT-IR non è possibile riscontrare alcun cambiamento significativo attribuibile alla presenza di molecole di PNA, probabilmente a causa della sovrapposizione con le bande di *stretching* delle molecole di NDI (Figura 71); dall'analisi termogravimetrica è possibile confermare il successo della reazione.

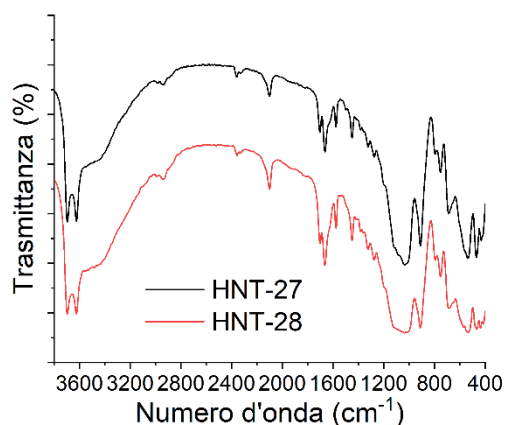


Figura 71. Spettri FT-IR dei nanomateriali **HNT-27** e **HNT-28**

In Figura 72a sono presenti le curve TGA di **HNT-28** e del suo precursore per confronto. Dall'analisi del residuo fisso a 800 °C è stato possibile determinare la percentuale di caricamento, che è risultata di ca. il 2.0 %p/p, in accordo con le misure spettroscopiche sopra discusse, mentre dalle curve derivate, si può osservare che mentre il nanomateriale **HNT-27**, mostra, oltre ai tipici picchi attribuibili agli HNT, un picco principale centrato a ca. 350 °C, che si può attribuire alla degradazione delle molecole di NDI, la curva differenziale del nanomateriale **HNT-28**, presenta un processo degradativo *multi-step* con un'ulteriore perdita

di massa, oltre alle sopra discusse, intorno a ca. 250 °C, relativa al PNA caricato supramolecularmente.

Il nanomateriale **HNT-28** è stato ulteriormente caratterizzato mediante spettroscopia UV-vis. Come è possibile osservare dallo spettro UV-vis riportato in Figura 72b, oltre alle tipiche bande di assorbimento dell'NDI, è possibile riscontrare un ulteriore massimo di assorbimento a ca 260 nm, relativo alla presenza del PNA.

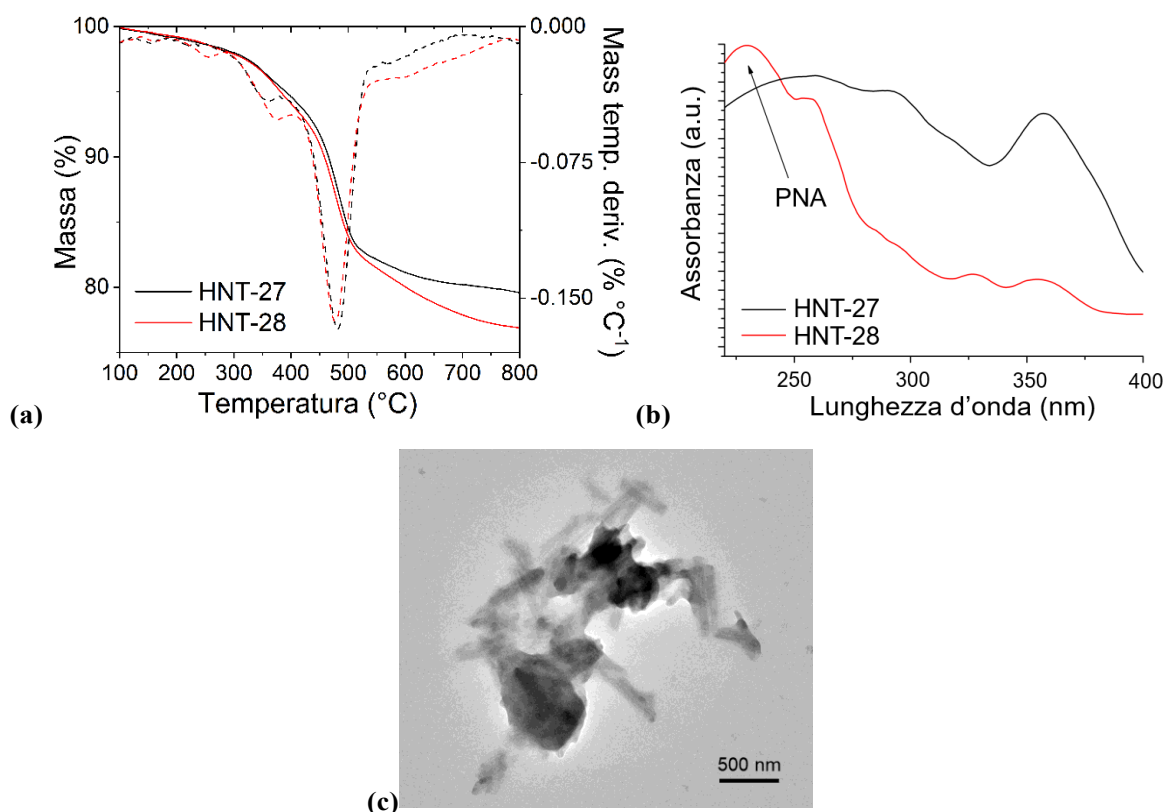


Figura 72. (a) Curve termogravimetriche (linea continua) e loro derivate prime (linea tratteggiata) di **HNT-27** e **HNT-28**; (b) Spettri UV-vis di **HNT-27** e **HNT-28**; (c) immagine HAADF/STEM di **HNT-28**

L'introduzione di molecole di PNA sul nanomateriale **HNT-27** è stata confermata anche dall'immagine HAADF/STEM del nanomateriale **HNT-28** in Figura 72c, la quale ha mostrato una struttura compatta ricoperta da materiale organico.

Anche le misure di potenziale ζ hanno confermato il successo della reazione; in particolare si riscontra un leggero aumento del potenziale ζ di **HNT-28** (-8.78 mV) rispetto al materiale di partenza **HNT-26** (-9.60 mV). Ciò conferma anche che la stabilità colloidale del nanomateriale è rimasta invariata.

Sempre nell'ottica di usare il nanomateriale per applicazioni biomediche, si è infine condotto uno studio preliminare delle cinetiche di rilascio del PNA dal nanomateriale **HNT-28**, al fine di validare il suo uso come sistema *carrier*. La cinetica di rilascio del PNA dal nanomateriale **HNT-28** è stata ancora una volta studiata attraverso il metodo della membrana da dialisi a

pH 7.0 per meglio mimare le condizioni fisiologiche. Come è possibile osservare nella curva della cinetica di rilascio presente in Figura 73, il rilascio del PNA da **HNT-28** è molto rapido, infatti si è raggiunto il 100% di rilascio dopo soli 150 min. Tale risultato è in accordo con dati di letteratura per sistemi simili. Il rilascio di PNA caricato supramolecolarmente su sistemi a base di HNT è infatti modulato dalla carica del PNA e dal sito di interazione di esso sugli HNT. PNA carichi positivamente, così come quello studiato, che interagiscono dunque sulla superficie esterna degli HNT, sono rilasciati velocemente dai sistemi *carrier*, in accordo con il desorbimento del PNA dai tubi.¹¹⁶

Per valutare la modalità di rilascio del PNA da **HNT-28**, i dati cinetici ottenuti sono stati analizzati con due diversi modelli matematici (primo ordine e *Power Fit*):

$$\text{Primo ordine: } M_t = M_{\infty} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\text{Power Fit: } F_t = kt^n \quad (\text{Eq. 8})$$

dove M_t e F_t sono la quantità di PNA rilasciata al tempo t ; M_{∞} è la quantità totale di sostanza inizialmente caricata, k è la costante di rilascio, e n è l'esponente di rilascio, il quale dipende dal meccanismo di rilascio e dalla geometria del materiale.

Dalla regressione non lineare dei dati cinetici, è stato trovato che il modello che meglio descrive i dati sperimentali è quello del primo ordine ($M_{\infty} = 98.4 \pm 1.9 \% \text{p/p}$, $k = 0.076 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9776$), indicando una diffusione dalla superficie esterna degli HNT.

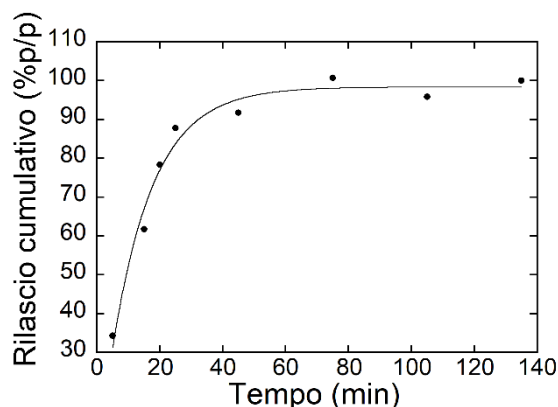


Figura 73. Rilascio del PNA dal nanomateriale **HNT-28** in acqua deionizzata a pH 7.0, a 37 °C

2.4.3. Sistemi a base di halloysite e NDI asimmetrici

Viste le interessanti proprietà chimico-fisiche del nanomateriale sintetizzato, si è pensato di legare sulla superficie esterna degli HNT degli NDI ulteriormente modificati nel *core* con altri gruppi elettron donatori, in modo da avere dei nanomateriali capaci di assorbire nella cosiddetta finestra spettroscopica “terapeutica”, che si colloca tra i 600 e gli 800 nm.¹⁴⁶ Ciò potrebbe permettere ai nuovi nanomateriali di rispondere meglio ai requisiti necessari per la terapia fotodinamica. Inoltre, con lo scopo di provare ad ottenere dei nanomateriali con dimensioni più piccole e meno aggregati di quello sopra discusso, si sono opportunamente sintetizzati tre derivati dell’NDI asimmetrici **29a-c**, in modo da avere un solo punto di ancoraggio sulla superficie degli HNT. Le molecole prese in considerazione sono riportate in Figura 74 che presentano rispettivamente un assorbimento a 465 nm, 540 nm e 605 nm.

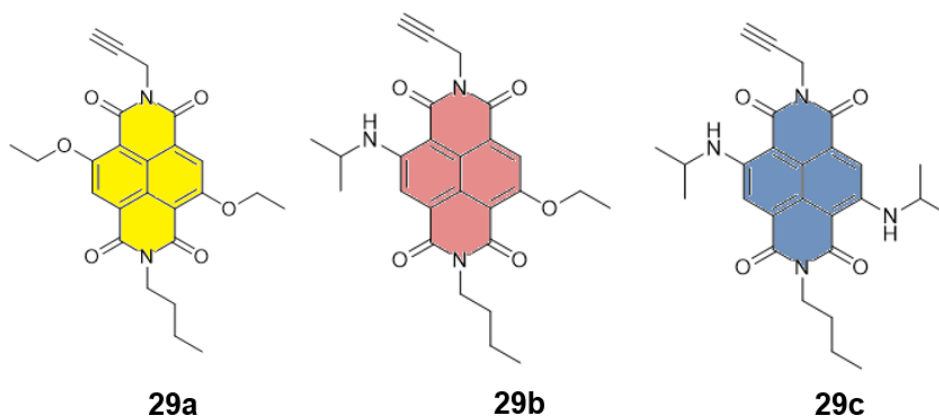
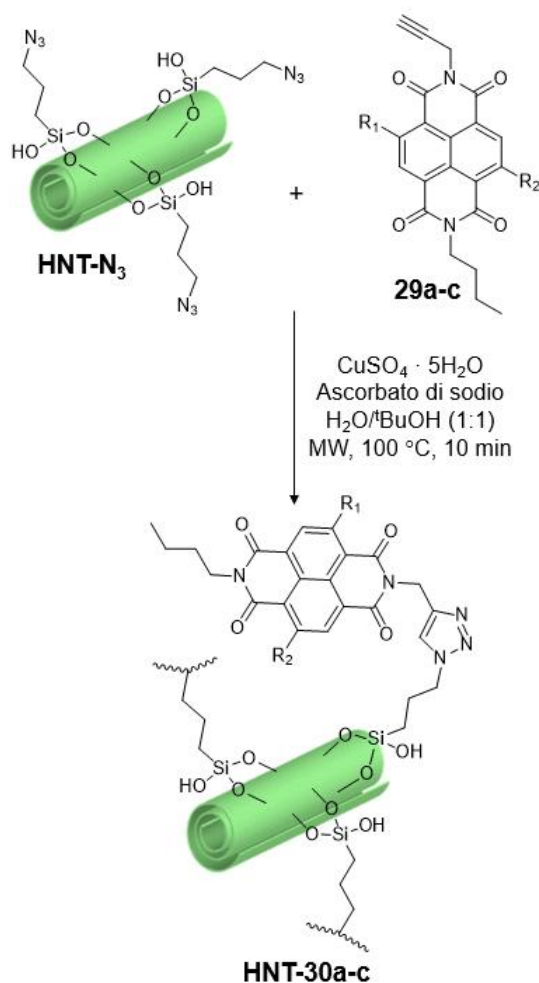


Figura 74. Strutture dei derivati asimmetrici NDI **29a-c**

Essi sono stati legati alla superficie esterna dell’halloysite, precedentemente funzionalizzata con il 3-azidopropiltrimetossisilano, tramite reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare. La reazione di *click-chemistry* tra **HNT-N₃** e i vari derivati NDI è avvenuta in una miscela H₂O/BuOH (1:1), tramite irradiazione alle microonde, a 100 °C per un tempo di reazione di 10 min, in presenza di quantità catalitiche di CuSO₄ e ascorbato di sodio (Schema 22).

Purtroppo, dalle analisi termogravimetriche è stato mostrato come queste reazioni non hanno portato ad un caricamento efficiente delle molecole sulla superficie esterna degli HNT. Anche dall’analisi FT-IR non si mostra alcun cambiamento significativo che confermi l’avvenuta reazione. Dalle analisi DLS e potenziale ζ , invece, si può riscontrare che il diametro idrodinamico apparente dei nuovi nanomateriali risulta più grande rispetto a quello dei soli HNT (Tabella 8); mentre il valore di potenziale ζ risulta, in tutti i casi, più positivo rispetto a quello dell’halloysite.



Schema 22. Rappresentazione schematica della sintesi dei nanomateriali **HNT-30a-c**

Tabella 8. Misure di DLS e potenziale ζ dei nanomateriali HNT e **HNT-30a-c**

	Dimensione media (nm)	Potenziale ζ (mV)
HNT	295 ± 16.0	-18.1
HNT-30a	407.6 ± 15.6	-7.58
HNT-30b	395.9 ± 55.4	-12.8
HNT-30c	337.6 ± 27.6	-4.97

Misure di fluorescenza in dispersione e allo stato solido hanno mostrato che le proprietà di fotoluminescenza dei derivati NDI legati alla superficie degli HNT sono le stesse delle sole molecole. A titolo esemplificativo in Tabella 9, sono mostrati le diverse lunghezze d'onda di eccitazione e le corrispondenti lunghezze d'onda di emissione riscontrate in dispersione e allo stato solido, che ulteriormente confermano la funzionalizzazione, seppur irrisoria degli HNT.

Tabella 9. Lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione in dispersione e allo stato solido dei nanomateriali *HNT-30a-c*

	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
HNT-30a	464	485
		485
HNT-30b	538	571
		577
HNT-30c	605	---
		634

Come si può osservare, grazie a questi tre nanomateriali sarebbe possibile ricoprire una gran parte dello spettro elettromagnetico visibile. Sono in corso esperimenti volti a valutare le migliori condizioni sperimentali per massimizzare il grado di funzionalizzazione degli HNT con tali derivati, in modo da essere sfruttati, in futuro, sia nel campo del *bioimaging* sia nella terapia fotodinamica.

2.5. Sistemi a base di halloysite e BODIPY

Negli ultimi anni, le molecole a base BODIPY hanno riscosso notevole successo per la realizzazione di agenti teranostici per la terapia del cancro. Il nucleo dei derivati BODIPY è costituito da un dipirrometene deprotonato che si coordina con un atomo di boro disostituito elettrone-povero, che solitamente fa parte del gruppo BF_2 .¹⁵⁵ Formalmente, la carica negativa è localizzata sull'atomo di boro, mentre la carica positiva è delocalizzata sul sistema dipirrometene; tuttavia, poiché la molecola di BODIPY è debolmente polare, essa viene solitamente rappresentata senza cariche formali. La struttura senza sostituenti è simile a quella dell'*s*-indacene, ed è per questo motivo che il sistema di numerazione degli atomi che costituiscono questi derivati è analogo. In particolare, le posizioni degli atomi di carbonio α corrispondono agli atomi 3 e 5, la posizione β corrisponde agli atomi 2 e 6 e la posizione γ corrisponde agli atomi 1 e 7. Invece, la posizione 8 del nucleo di BODIPY è denominata posizione meso (Figura 75).¹⁵⁶

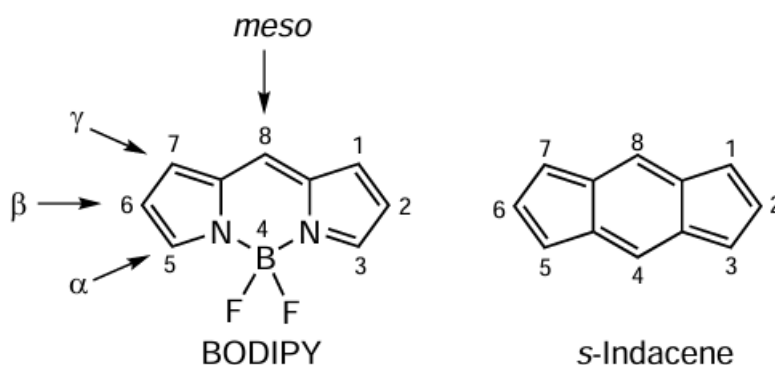


Figura 75. Numerazione degli atomi nei BODIPY e in *s*-indacene¹⁵⁶

Gli approcci sintetici utilizzati per la sintesi del *core* dei BODIPY si basano sulla chimica ben nota delle porfirine.¹⁵⁷ Uno di questi si basa su un approccio a tre *step* raffigurato in Figura 76, in cui inizialmente avviene la condensazione catalizzata da acidi tra un'aldeide e il pirrolo per ottenere un dipirrometano. In queste reazioni normalmente il pirrolo viene usato anche come solvente per evitare la polimerizzazione, ma non sempre è così. I dipirrometani sono composti estremamente instabili e le rese di reazione spesso sono molto basse: dal momento che sono sensibili alla luce, all'aria e agli acidi, è meglio utilizzarli subito dopo la preparazione. Lo *step* successivo consiste nell'ossidazione del dipirrometano in dipirrometene tramite 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone (DDQ) o tetracloro-1,4-benzochinone (p-cloranil), quest'ultimo in condizioni di reazione più blande. Al fine di ottenere successo in questa reazione, si tende ad usare inizialmente aldeidi aromatiche, perché negli altri casi si è riscontrato che l'ossidazione non avviene.¹⁵⁸ Infine per ottenere il

derivato BODIPY finale, si fa reagire il dipirrometene con il trifluoruro di boro eterato in presenza di una base, come la trietilammina.

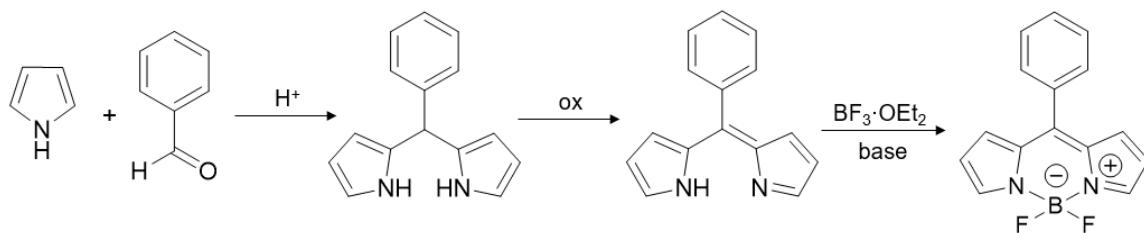


Figura 76. Sintesi del core di un derivato BODIPY

Questa tipologia di molecole presenta caratteristiche vantaggiose, come la buona fotostabilità e la bassa tossicità, per lo sviluppo di sistemi utilizzabili sia per fini diagnostici che terapeutici.¹⁵⁹ I BODIPY presentano intensi assorbimenti ed emissioni nella zona del NIR e un'elevata resa di fluorescenza, ciò li rende particolarmente adatti nel campo del *bioimaging*. Inoltre, questi derivati si distinguono da molti altri cromofori per una caratteristica particolare: la possibilità di regolare in maniera molto precisa le proprietà fotofisiche attraverso diversi processi di post-modifica.¹⁶⁰ Un esempio è dato dalla sostituzione del fluoro legato al boro con un altro nucleofilo, ciò può tradursi in un notevole miglioramento delle rese di fluorescenza, maggiore stabilità chimica e solubilità in acqua più elevata.¹⁶¹ Invece, quando nella struttura del BODIPY vengono inseriti gruppi donatori mesomerici, si osserva spesso un trasferimento di carica all'interno della molecola stessa. Questo processo porta, nei solventi polari, a un *quenching* della fluorescenza. Sebbene possa sembrare un effetto indesiderato, in realtà è proprio questa particolarità a rendere i BODIPY strumenti molto utili nella realizzazione di sensori capaci di rilevare biomolecole, cationi metallici, variazioni di pH e perfino condizioni di ipossia, con importanti applicazioni anche in campo diagnostico.¹⁶² La possibilità di modificare lo *scaffold* di queste molecole ha permesso di migliorarne la versatilità, consentendo di personalizzarne le proprietà per specifici compiti biologici, tra cui l'*imaging* subcellulare e il *sensing* mirato per specifiche molecole.

I BODIPY, inoltre, presentano anche caratteristiche utili per il loro uso in diversi tipi di terapia, come PDT e PTT.¹⁶³ In particolare, negli ultimi anni è emersa una nuova classe di PS basata sul nucleo BODIPY. Essi presentano molte delle caratteristiche fondamentali per un fotosensibilizzatore, come elevati coefficienti di estinzione molare, lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione facilmente modulabili, buona internalizzazione, bassa tossicità al buio ma elevata in presenza di luce e facilità di sintesi.³⁰ Anche in questo caso, i BODIPY possono essere modificati strutturalmente, per migliorare l'*intersystem crossing*. Al fine di

ottenere PS con migliori caratteristiche fotodinamiche, una strategia promettente è quella di includere atomi pesanti come alogeni (Br o I) nello *scaffold*. Recentemente sono state sviluppate diverse reazioni di alogenazione dei BODIPY per modificarne la struttura per il loro utilizzo nella PDT.^{29, 30} Le modifiche chimiche nel nucleo di questa tipologia di molecole possono comportare non solo cambiamenti nella tossicità (maggiore o minore generazione di ROS), ma anche nella capacità di essere internalizzati nelle cellule.

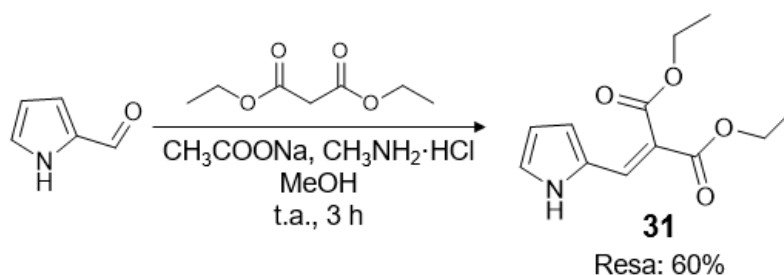
Al tal fine, durante il periodo all'estero svolto presso il Dipartimento di Farmacologia, Tossicologia e Chimica Terapeutica dell'Università di Barcellona, sono stati sintetizzati due BODIPY con diverso *scaffold* per due diverse applicazioni: il primo trova impiego nel *sensing* reversibile del glutathione, mentre il secondo nella terapia fotodinamica.

Questa classe di molecole, però, è generalmente nota per l'elevata idrofobicità. Pertanto, si rende necessario il loro uso in combinazione con dei nanomateriali che ne permettano di aumentarne la solubilità in ambiente acquoso senza comprometterne le caratteristiche fotofisiche intrinseche. Per superare queste criticità, nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi sistemi *carrier*, come i *microchip* di ossido di silicio o le nanoparticelle di ossido di silicio (SONP).¹² Entrambi sono stati funzionalizzati con sonde fluorescenti BODIPY per il riconoscimento del GSH intracellulare, ottenendo delle piattaforme per la quantificazione intracellulare precisa e in tempo reale dei livelli di glutathione e consentendo un monitoraggio avanzato di questa biomolecola in sistemi biologici complessi.¹³

La veicolazione con gli HNT potrebbe rappresentare una valida strategia per l'ottenimento di nanomateriali con potenziale applicazione in campo biologico sia per il *sensing* del glutathione che per il trattamento dei tumori tramite la PDT.

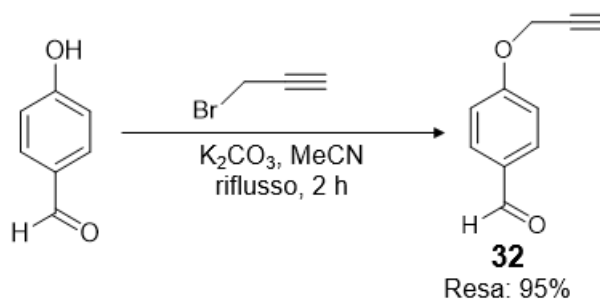
2.5.1. Sintesi di una sonda a base BODIPY per il *sensing* del glutathione

La sintesi della sonda fluorescente a base BODIPY per il *sensing* del glutathione si basa sull'approccio precedentemente descritto, ma inizialmente è stato necessario sintetizzare le molecole **31** e **32**, le quali non sono disponibili commercialmente. Il composto **31** è stato ottenuto a partire da una soluzione di pirrolo-2-carbossialdeide in metanolo, e alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti dietilmalonato, acetato di sodio e la metilammina idrocloruro. La reazione è stata lasciata ad agitare per 3 h a temperatura ambiente (Schema 23). In seguito a purificazione tramite colonna cromatografica si è ottenuto un olio arancione con una resa del 60%.



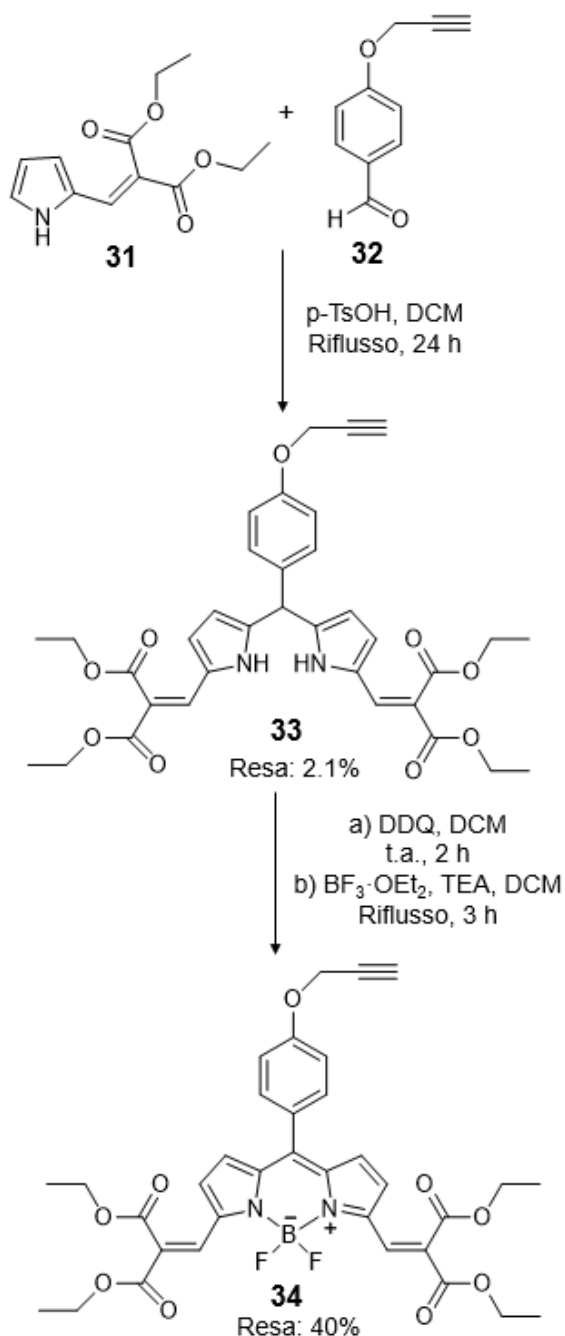
Schema 23. Rappresentazione schematica della sintesi di **31**

Parallelamente, la sintesi di **32** ha previsto la dissoluzione della 4-idrossibenzaldeide in acetonitrile anidro. Dopo aver aggiunto il propargilbromuro e il carbonato di potassio, la reazione viene lasciata ad agitare in condizioni di riflusso del solvente per 2 h (Schema 24). Dopo il *work-up*, è stato ottenuto **32** come un solido giallo con una resa del 95%.



Schema 24 Rappresentazione schematica della sintesi di **32**

A questo punto si procede con lo *step* sintetico limitante, ovvero l'ottenimento del dipirrometano, dal momento che la sua resa è di solo il 2.1%. In questo caso **31** non può essere utilizzato come solvente, quindi è stato disciolto in DCM anidro con **32**, in presenza di acido p-toluensulfonico. La soluzione viene lasciata ad agitare per una notte a riflusso del solvente. Il solido **33** ottenuto in seguito a purificazione cromatografica viene ossidato tramite reazione con DDQ in DCM a temperatura ambiente per 2 h. Dopo aver rimosso il solvente a pressione ridotta, il residuo ottenuto viene disciolto in DCM anidro. A questa soluzione vengono quindi aggiunti la trietilammina (TEA) e il trifluoruro di boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) e si pone la reazione a riflusso del solvente per 2 h. Dopo il *work-up* e la purificazione tramite colonna cromatografica, si ottiene **34** come un solido verde con una resa del 40% (Schema 25).



Schema 25. Rappresentazione schematica della sintesi di **34**

2.5.2. Sintesi e caratterizzazione di un nanomateriale a base di halloysite e **34**

La molecola **34** ottenuta è stata legata alla superficie esterna dell'halloysite, precedentemente modificata con il 3-azidopropiltrimetossisilano, tramite reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare azide-alchinica. Secondo la procedura sintetica riportata in Schema 26, per la reazione di *click-chemistry* tra **34** e HNT- N_3 sono stati considerati diversi approcci sintetici così come descritto in Tabella 10. Si è pensato quindi di condurre la reazione tramite irraggiamento alle microonde (linee 2 e 3); inizialmente in miscela solvente

H₂O/DMF (1:1) e, nell'ottica di rendere la reazione più *green*, in miscela H₂O/^tBuOH (1:1). Entrambe le reazioni sono state condotte a 100 °C per un tempo di reazione di 10 min, in presenza di quantità catalitiche di CuSO₄ e ascorbato di sodio.

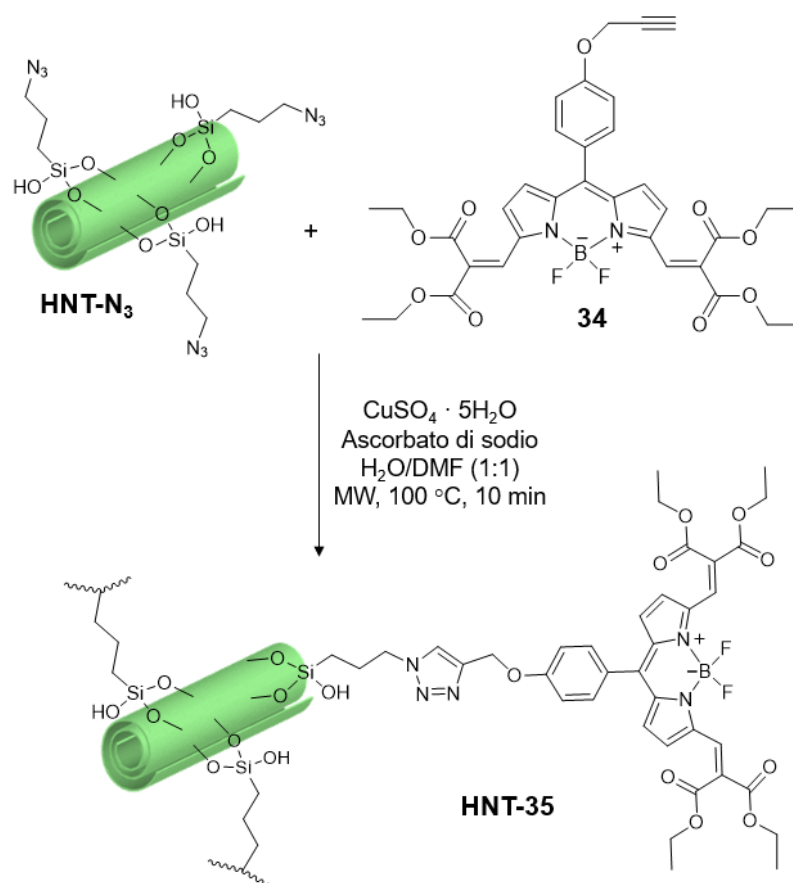
Come si può osservare dai dati riportati in tabella, le migliori condizioni sperimentali, che hanno portato ad un grado di caricamento del 3.4 %p/p sono state ottenute in presenza della miscela solvente H₂O/DMF (1:1) (linea 2).

Inizialmente è stato considerato anche un approccio tradizionale che ha previsto la reazione tra **HNT-N₃** e **34** in H₂O/DMF (1:9), a temperatura ambiente per un tempo di reazione di 18 h. Dopo *work-up*, il solido ottenuto è stato sottoposto ad analisi TGA, che ha evidenziato un caricamento non soddisfacente (linea 1).

Tabella 10. Ottimizzazione delle condizioni sperimentali per la sintesi di **HNT-35**

	Riscaldamento	Temperatura (°C)	Solvente	Caricamento (%p/p)	Grado di funzionalizzazione (mmol g ⁻¹)
1	Tradizionale	t.a.	H ₂ O/DMF (1:9)	< 1.0	< 0.01
2	Microonde	100	H ₂ O/DMF (1:1)	3.4	0.05
3	Microonde	100	H ₂ O/ ^t BuOH (1:1)	2.0	0.03

Quindi, come riportato nello Schema 26, è stato ottenuto il nanomateriale **HNT-35** come polvere viola in seguito a lavaggi con H₂O, DCM e MeCN per rimuovere sia i catalizzatori che i residui dei reagenti non reagiti. Dopo il *work-up*, tramite analisi termogravimetrica è stato stimato che la percentuale di caricamento di **34** su **HNT-N₃** è di circa 3.4 %p/p. Sulla base dei rapporti stechiometrici di **HNT-N₃** e **HNT-35**, ottenuti mediante analisi TGA, (rispettivamente pari a 0.31 mmol g⁻¹ e 0.05 mmol g⁻¹) si evince che non tutti i gruppi azido di **HNT-N₃** hanno reagito; probabilmente ciò è dovuto all'ingombro sterico della molecola organica.



Schema 26. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-35**

L'avvenuta funzionalizzazione di **34** su **HNT-N₃** è stata confermata attraverso spettroscopia FT-IR e analisi termogravimetriche. Inoltre, le proprietà colloidali sono state analizzate tramite misure di *dynamic light scattering* e di potenziale ζ .

La Figura 77a mostra gli spettri FT-IR dei nanomateriali **HNT-N₃** e **HNT-35**. Come già detto precedentemente, l'assegnazione delle bande di **HNT-N₃** può essere fatta sulla base dei dati di letteratura;¹²⁷ invece, lo spettro FT-IR di **HNT-35** mostra sia le bande attribuibili al nanomateriale inorganico, ma anche quelle che si originano dalla parte organica. In particolare, a 2936 e 2887 cm^{-1} si riscontrano i picchi corrispondenti allo *stretching* asimmetrico e simmetrico dei gruppi metile e metilene; il picco presente a 1727 cm^{-1} è attribuibibile alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi carbossilici, mentre i picchi presenti a 1532 e 1464 cm^{-1} derivano dalle vibrazioni dell'anello aromatico. Inoltre, la piccola riduzione dell'intensità della banda di vibrazione tipica del gruppo azido a circa 2100 cm^{-1} conferma il successo della reazione di *click chemistry*.

In Figura 77b è riportata la curva termogravimetrica del nanomateriale **HNT-35** e per confronto quella del suo precursore **HNT-N₃**. Da tale confronto si può osservare che, rispetto al termogramma di **HNT-N₃**, dal quale si riscontrano le perdite di massa derivanti sia

dall'espulsione delle molecole d'acqua interstrato degli HNT (a circa 550 °C), sia dalla degradazione e dalla volatilizzazione dell'organosilano (a circa 250 °C); il termogramma di **HNT-35** presenta un'ulteriore fase di degradazione con un massimo centrato a ca. 240 °C; come si può anche osservare anche dalla derivata in Figura 77b, corrispondente al BODIPY **34** ancorato sulla superficie esterna degli HNT. La quantità di **34** legato covalentemente sulla superficie di HNT discussa precedentemente, è stata calcolata, ancora una volta, dall'analisi del residuo fisso a 800 °C.

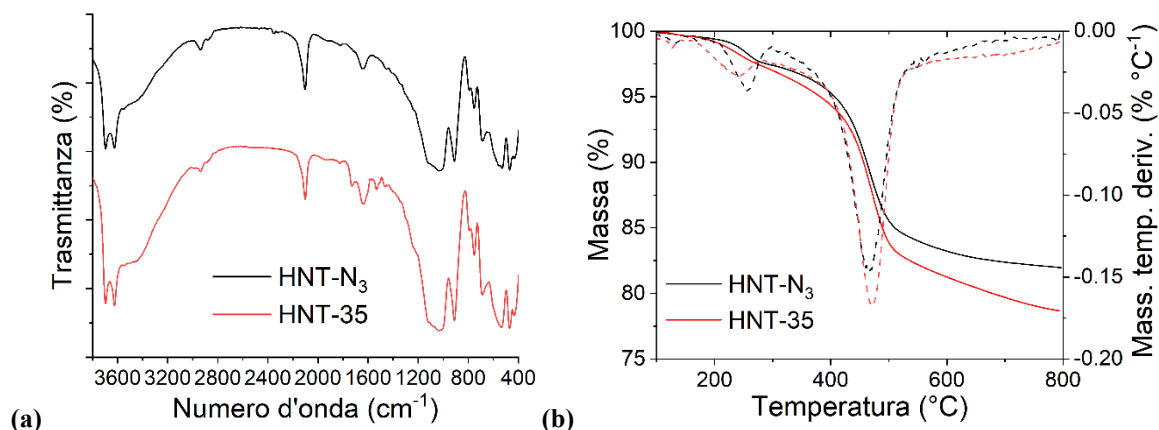


Figura 77. Confronto di (a)spettri FT-IR, (b) curve termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-N₃** e **HNT-35**

Tramite analisi di *dynamic light scattering* sono state analizzate le proprietà colloidali del nanomateriale ottenuto. Il nanomateriale **HNT-35** ha mostrato una dimensione media di 737 ± 51 nm, più grande rispetto a quella della sola halloysite (295 nm) e del nanomateriale **HNT-N₃**. Ciò fa capire come il nanomateriale ottenuto presenti una peggiore diffusione in ambiente acquoso a causa dell'introduzione della molecola idrofobica sulla superficie esterna di HNT. Anche tramite misure di potenziale ζ è possibile affermare che la sintesi sia effettivamente avvenuta. Infatti, il nanomateriale **HNT-35** presenta un valore di potenziale ζ pari a -5.78 mV, quindi più positivo rispetto a HNT (-20 mV).

Inoltre, dall'equazione di Stokes-Einstein è stato possibile calcolare il coefficiente di diffusione D del nanomateriale **HNT-35**, il quale è risultato essere di $0.66 \mu\text{m}^2/\text{s}$, più piccolo di quello di HNT ($1.67 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Ciò indica una peggiore diffusione in ambiente acquoso, coerente con l'introduzione di una porzione organica idrofobica.

Al fine di verificare che le proprietà fotofisiche della molecola **34** fossero preservate in seguito al legame con la superficie esterna degli HNT, sono state condotte delle indagini mediante spettroscopia UV-vis e di fluorescenza. In Figura 78a sono mostrati gli spettri UV-vis e di fluorescenza di una soluzione in MeCN di **34** (10 μM). È possibile osservare un massimo di assorbimento a 590 nm e, irradiando la stessa soluzione a tale lunghezza d'onda, si registra un picco di emissione a 608 nm, con uno *stokes shift* di 18 nm. L'introduzione di

gruppi elettron-attrattori nelle posizioni 3,5 del BODIPY estendono la delocalizzazione del sistema π , causando uno spostamento della banda di assorbimento verso il rosso (da 500 a 600 nm) rispetto ai derivati tetrametil-BODIPY.¹⁶⁴

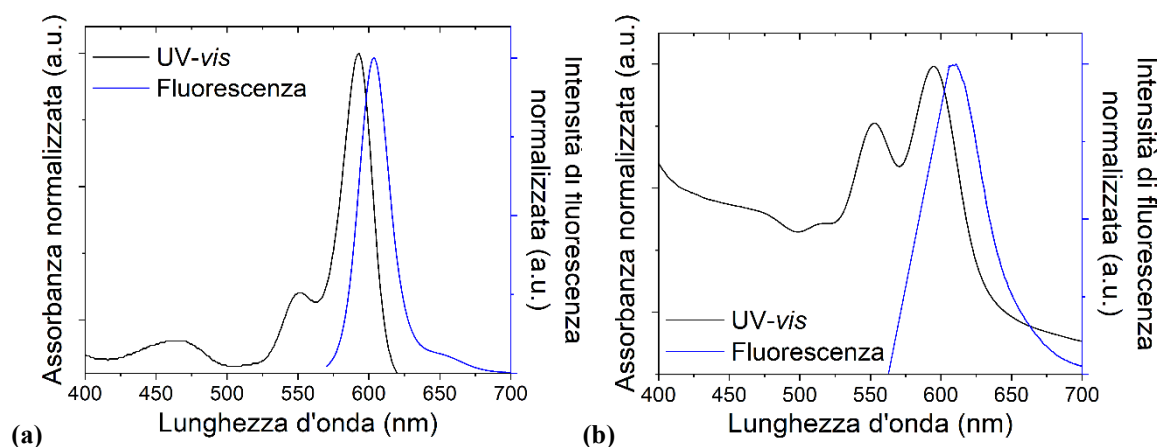


Figura 78. Spettro di assorbimento (linea nera) e di emissione (linea blu) di (a) una soluzione di **34** in MeCN (10 μ M) e (b) una dispersione del nanomateriale **HNT-35** in MeCN (1 mg mL⁻¹)

Similmente, la Figura 78b riporta gli spettri UV-vis e di fluorescenza di una dispersione in MeCN del nanomateriale ottenuto. Lo spettro di assorbimento del nanomateriale **HNT-35** (1 mg mL⁻¹) ha mostrato intense bande di assorbimento nella stessa regione spettrale della sola molecola **34**, con un massimo di assorbimento a 595 nm e una spalla a 550 nm. Ciò indica che il legame con gli HNT non ha influenzato le proprietà fotofisiche. L'eccitazione della medesima dispersione a 595 nm ha portato all'emissione nella regione rossa dello spettro, con una banda a circa 608 nm, con uno *stokes shift* di 15 nm

2.5.3. Studio di *sensing* del glutatione

È noto in letteratura che l'introduzione in posizione 3,5 del core BODIPY di gruppi come dietilmalonato ancorati tramite legami vinilici possono dare addizione di Michael, reversibile, tra questi ultimi e GSH, rendendo di fatto la molecola una interessante e potenziale sonda in sistemi biologici per il glutatione.^{13, 164} Tale reazione, infatti, interrompendo l'estensione del sistema coniugato della molecola, determina un evidente spostamento verso il blu sia della banda di assorbimento sia di quella di fluorescenza, che può essere sfruttata, appunto, nel *sensing* del GSH. Dal punto di vista spettroscopico si riscontra che quando una soluzione di **34** (10 μ M) e glutatione (1 mM) in una miscela tampone fosfato/MeCN (4:1) viene incubata a 37 °C, nello spettro UV-vis si osserva la comparsa di un nuovo picco di assorbimento attorno a 525 nm (Figura 79a) con una spalla a 555 nm. Allo stesso modo, nello spettro di fluorescenza (Figura 79b), registrato eccitando la

soluzione a una lunghezza d'onda di 590 nm, si osserva una diminuzione della banda di emissione a 608 nm e si ha la formazione di una nuova banda di emissione a ca. 570 nm, osservabile irradiando la soluzione a 556 nm.¹³

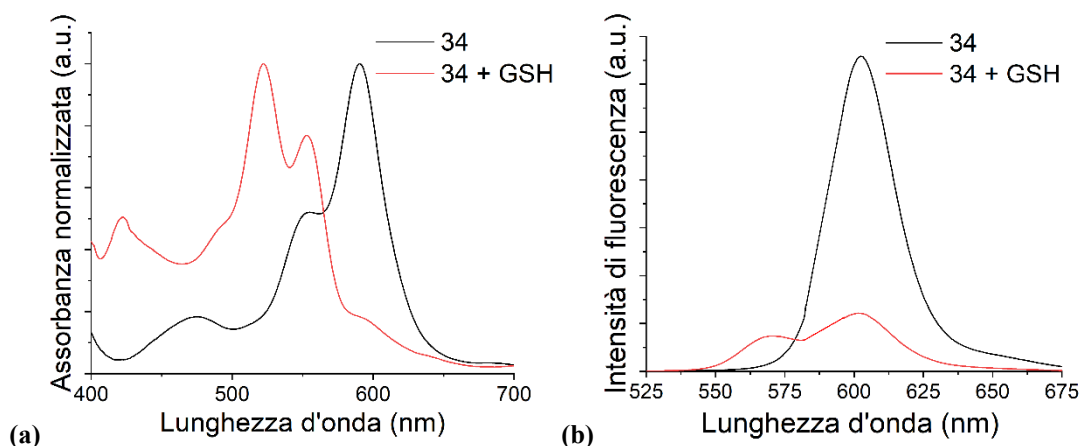


Figura 79. Spettri di (a) assorbimento e (b) fluorescenza della sonda **34** (10 μM) in assenza e in presenza di glutatione (1 mM), tampone fosfato/MeCN (4:1), pH=7.2, 37 °C

Per verificare che le proprietà di *sensing* fossero mantenute, un esperimento analogo è stato effettuato su una dispersione in tampone fosfato/MeCN (4:1) del nanomateriale **HNT-35** (0.6 mg mL⁻¹, [34] = 30 μM) in presenza di concentrazioni crescenti di glutatione (da 0.1 mM a 0.1 M). Come mostrato in Figura 80, l'aumento della concentrazione di glutatione comporta un incremento dell'intensità di fluorescenza della banda di emissione a 570 nm del nanomateriale **HNT-35**, evidenziando l'interazione con il GSH.

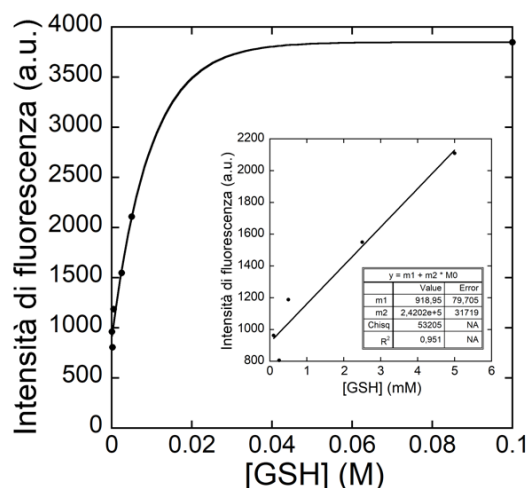


Figura 80. Relazione tra l'intensità di fluorescenza del nanomateriale **HNT-35** (0.6 g mL⁻¹) al variare della concentrazione di glutatione (da 0.1 mM a 0.1 M) in tampone fosfato/MeCN (4:1). L'inserto mostra la regressione lineare che è stata utilizzata per il calcolo di LOD

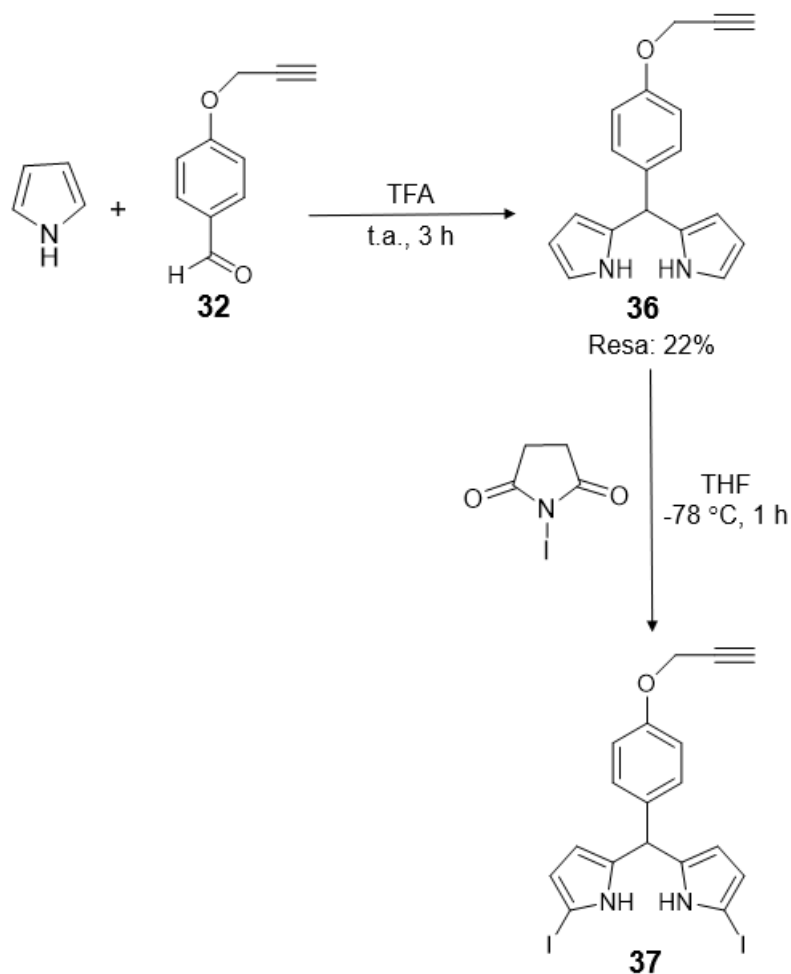
Per validare la possibilità di usare tale nanomateriale effettivamente come sensore per il GSH, i dati sperimentali sono stati matematicamente analizzati tramite una regressione lineare, dalla quale è stato possibile determinare il limite di rilevabilità (LOD) mediante la seguente equazione:

$$LOD = 3 \left(\frac{\sigma}{k} \right) \quad (\text{Eq. 11})$$

Dove σ e k sono rispettivamente l'errore standard dell'intercetta e la pendenza della retta di regressione (inserto in Figura 80). Il valore di LOD è risultato essere pari a di 0.9 mM, in linea con quanto riportato in letteratura,¹⁶⁵ con il vantaggio di utilizzare un nanomateriale a basso costo, naturale e biocompatibile, come l'halloysite.

2.5.4. Sintesi di una sonda a base BODIPY per la terapia fotodinamica

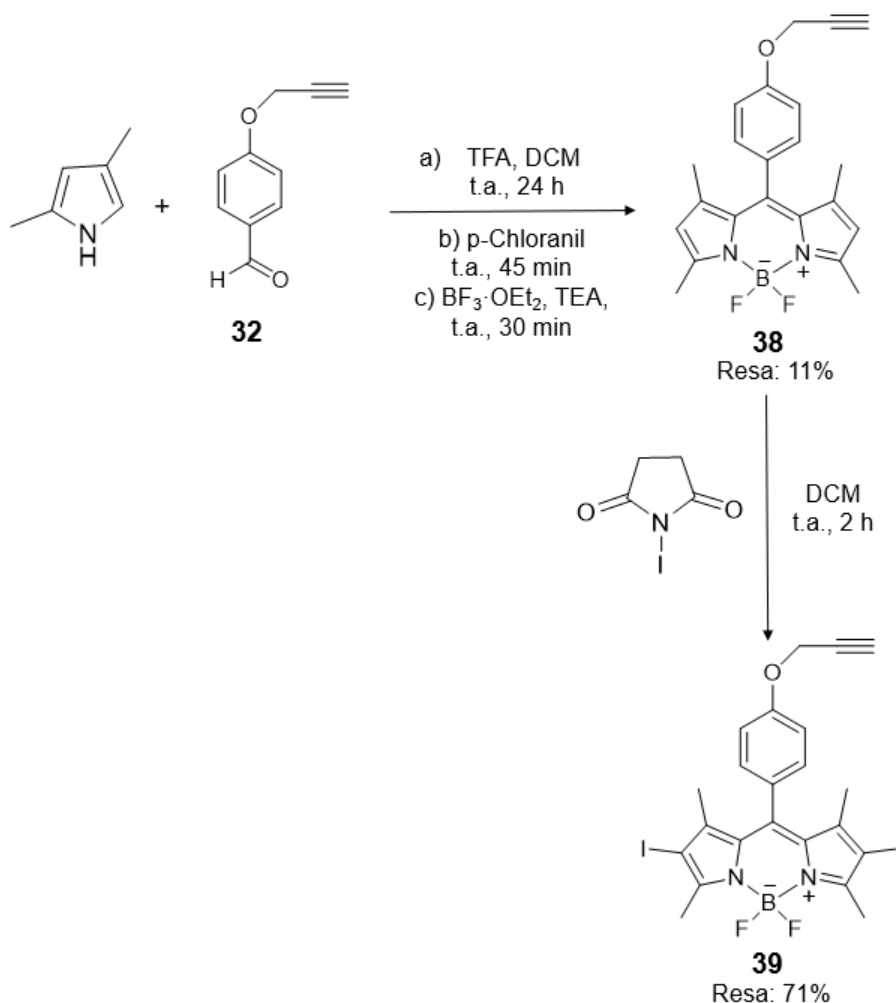
In maniera analoga a quanto riportato precedentemente, il derivato del BODIPY utilizzabile come possibile fotosensibilizzatore per la terapia fotodinamica è stato sintetizzato mediante un approccio sintetico riportato nello Schema 27.



Schema 27. Rappresentazione schematica di una prova sintetica del fotosensibilizzatore a base BODIPY

Nel primo *step* il dipirrometano **36** è stato ottenuto mediante reazione tra **32** e il pirrolo, in presenza di acido trifluoroacetico a temperatura ambiente per un tempo di reazione di 3 h. Tale composto (**37**) è stato sottoposto a iodurazione in presenza di N-iodosuccinimide in THF anidra a -78 °C, al fine di controllare l'alogenazione e portare al prodotto con lo iodio nelle posizioni α' degli anelli pirrolici. Purtroppo tale sintesi ha portato a una miscela di composti polialogenati di difficile separazione e molto fotolabili.

Visto l'insuccesso di questa strategia sintetica, si è dunque pensato di utilizzare un pirrolo iniziale che presentasse le posizioni α' e β già sostituite per favorire, dopo la sintesi del nucleo BODIPY, la iodurazione in posizione β' . Tale scelta è stata dettata dal fatto, oltre che per ottenere il prodotto monosostituito, che come riportato in letteratura, l'introduzione di alogeni in posizione 2,6 del nucleo BODIPY portano alla sintesi di fotosensibilizzatori con una migliore resa quantica di ossigeno singoletto.¹⁶⁶ Tale approccio, riportato nello Schema 28, si è rivelato più semplice del precedente perché ha permesso di ottenere il *core* della molecola in un unico passaggio, anche se con una resa non molto elevata.



Schema 28. Rappresentazione schematica della sintesi di **39**

In particolare, la reazione è avvenuta tra il 2,4-dimetilpirrolo e **32** in DCM anidro, in presenza di acido trifluoroacetico, per una notte a temperatura ambiente. Successivamente, alla stessa miscela di reazione è stato aggiunto il tetracloro-1,4-benzochinone per l'ossidazione e dopo 45 min sono stati aggiunti sequenzialmente la trietilammina e il trifluoruro di boro eterato. Dopo il *work-up* e la purificazione tramite colonna cromatografica, si è ottenuto **38** come un solido viola.

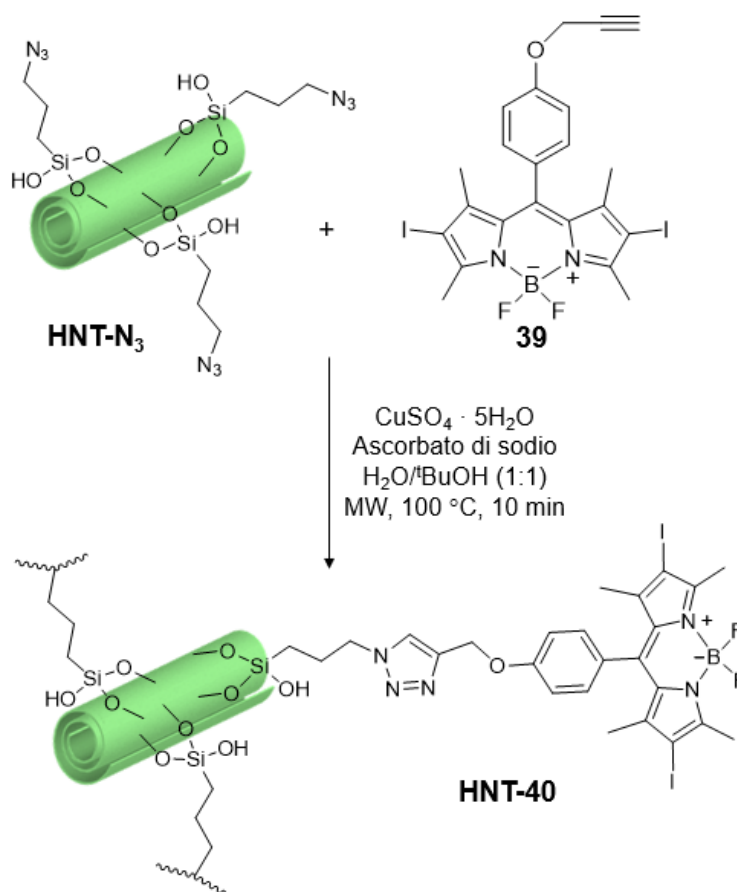
In seguito, si è proceduto con l'introduzione degli atomi di iodio in posizione 2,6 tramite alogenazione di **38** con la N-iodosuccinimide in DCM per due ore a temperatura ambiente. In seguito a purificazione tramite colonna cromatografica si è ottenuto **39** come un solido rosso con una resa del 71%.

2.5.5. Sintesi e caratterizzazione di un nanomateriale a base di halloysite e **39**

Similmente a quanto già descritto, anche il composto **39** ottenuto è stato legato sulla superficie esterna dell'halloysite mediante reazione di *click chemistry* con HNT-N₃ (Schema 29). Studi preliminari di solubilità di **39** hanno mostrato che quest'ultimo è parzialmente solubile in ^tBuOH, quindi in questo caso la reazione di *click-chemistry* tra **39** e HNT-N₃ è avvenuta in una miscela H₂O/^tBuOH (1:1), tramite irradiazione alle microonde, a 100 °C per un tempo di reazione di 10 min, in presenza di quantità catalitiche di CuSO₄ e ascorbato di sodio.

La stessa reazione condotta in condizioni tradizionali, non ha portato ad un grado di funzionalizzazione soddisfacente. Dopo il *work-up*, da analisi TGA è stata calcolata una percentuale di caricamento di **39** su HNT-N₃ di circa 6.1 %p/p. Sulla base dei rapporti stechiometrici di HNT-N₃ e HNT-40, ottenuti mediante analisi termogravimetrica, (rispettivamente pari a 0.31 mmol g⁻¹ e 0.10 mmol g⁻¹) si evince che non tutti i gruppi azido di HNT-N₃ hanno reagito; probabilmente ciò è dovuto all'ingombro sterico della molecola organica, anche se in maniera minore rispetto a quello di **34**.

Nell'ottica di provare a condurre la reazione in condizioni ancora più *green*, viste le proprietà di **39**, si è pensato di effettuare la stessa reazione, sotto irraggiamento alle microonde, utilizzando H₂O come solvente. Tale via sintetica non ha portato al risultato desiderato, mostrando come, per questa tipologia di reazioni, probabilmente per problematiche legate alla solubilità di **39**, il solvente organico sia necessario.



Schema 29. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale **HNT-40**

Il nanomateriale **HNT-40** è stato ampiamente caratterizzato al fine di confermare l'effettiva funzionalizzazione.

In Figura 81a sono riportati gli spettri FT-IR dei nanomateriali **HNT-N₃** e **HNT-40**. Lo spettro FT-IR del nuovo nanomateriale mostra caratteristiche vibrazionali tipiche di entrambi i precursori. In particolare, a 2938 e 2868 cm^{-1} si riscontrano i picchi corrispondenti allo *stretching* asimmetrico e simmetrico dei gruppi metile e metilene; i picchi presenti a 1532, 1464 e 1406 cm^{-1} derivano dalle vibrazioni dell'anello aromatico, mentre quelli che si riscontrano a 1348 e 1308 cm^{-1} sono derivanti dallo *stretching* dell'ammina terziaria aromatica. Si riscontra anche un picco a 1184 cm^{-1} attribuibile allo *stretching* del gruppo C-O-C. Inoltre, la riduzione dell'intensità della banda di vibrazione tipica del gruppo azido a circa 2100 cm^{-1} conferma il successo della reazione di *click chemistry*.

In Figura 81b, invece, sono presenti le curve termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-N₃** e **HNT-38**. Rispetto al termogramma di **HNT-N₃**, il nanomateriale **HNT-40** presenta ulteriori *step* degradativi. Ancora una volta, dall'analisi della curva derivata di **HNT-40** è stato possibile osservare una perdita in peso centrata a ca. 275 $^\circ\text{C}$, relativa probabilmente alla degradazione di **39**.

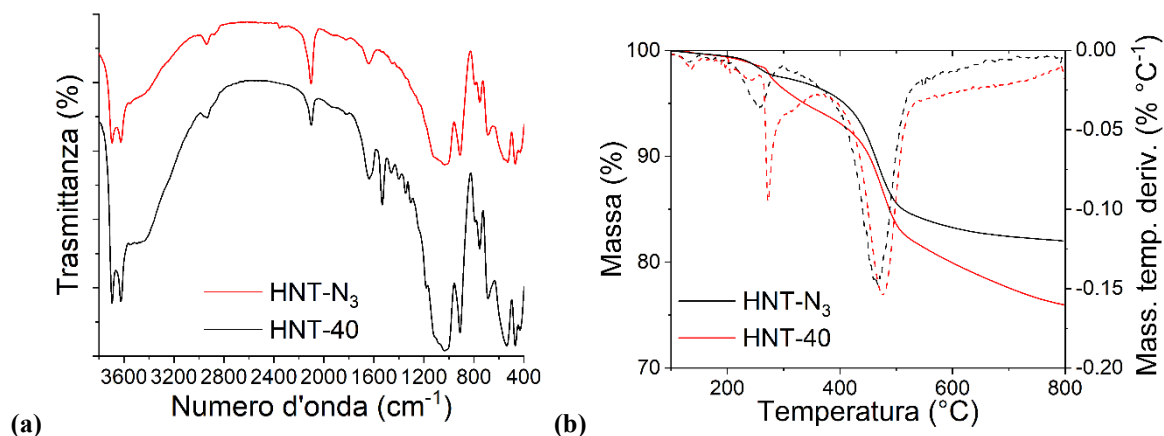


Figura 81. Confronto di (a)spettri FT-IR, (b) curve termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-N₃** e **HNT-40**

In maniera analoga a quanto discusso per **HNT-35**, l'introduzione di **39** sulla superficie esterna degli HNT ha portato ad un aumento delle dimensioni del nanomateriale (820 ± 66 nm) rispetto agli HNT non modificati (295 nm), con conseguente peggioramento della diffusione in ambiente acquoso, così come evidenziato da analisi DLS.

Anche in questo caso, misure di potenziale ζ mostrano un aumento del potenziale (-10.7 mV) rispetto agli HNT (-20 mV), a ulteriore conferma dell'effettiva funzionalizzazione.

La morfologia del nanomateriale **HNT-40** è stata studiata mediante indagini HAADF-STEM e TEM accoppiati con sonda EDX (Figura 82).

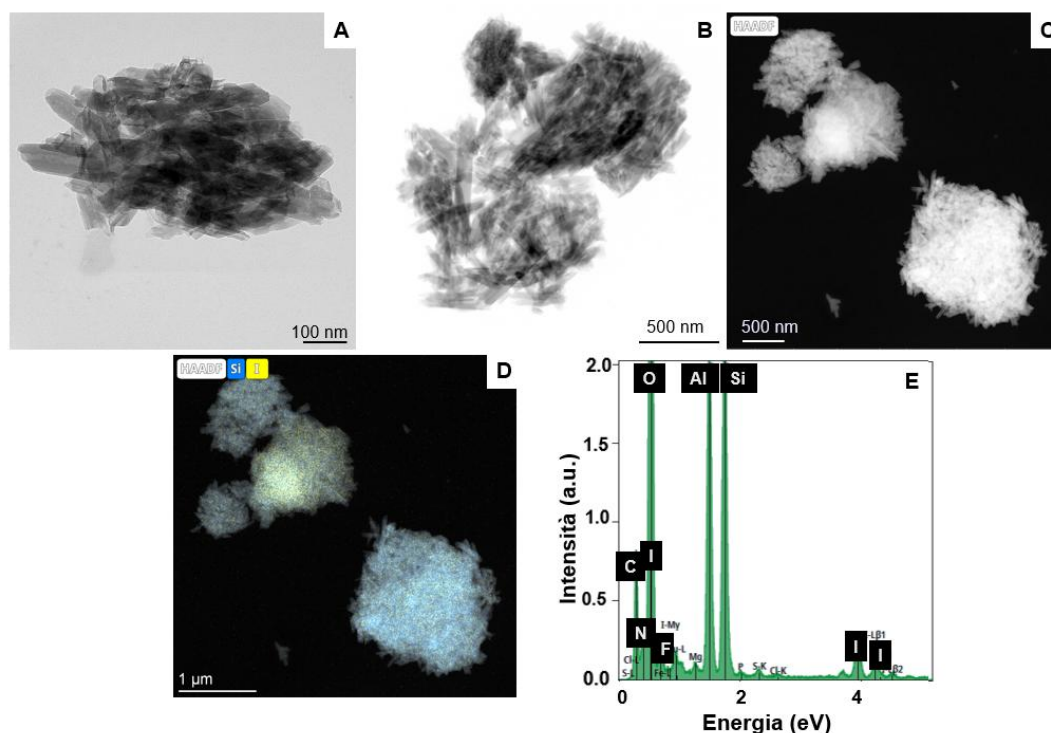


Figura 82. (A) TEM, (B-C) HAADF/STEM (D) mappatura elementale ottenuta tramite EDX, (E) spettro EDX di **HNT-40**

Come è possibile osservare dalle immagini in Figura 82A-C, **HNT-40** presenta la caratteristica struttura tubolare dell'halloysite, la quale risulta aggregata probabilmente a causa della presenza delle molecole organiche sulla superficie esterna, che possono instaurare tra loro interazioni π - π . Dalla mappatura elementale ottenuta mediante EDX, è possibile osservare che le molecole organiche sono uniformemente distribuite sulla superficie esterna di **HNT-40** (Figure 82D), come evidenziato dalla distribuzione degli atomi di iodio attribuibili a **39**. Il successo della sintesi è stato confermato dallo spettro EDX ottenuto su un'area selezionata (Figura 82E); questo mostra non solo gli elementi tipici dell'halloysite, ma anche la presenza di atomi di carbonio, azoto, fluoro e iodio.

Infine, anche in questo caso, lo studio delle proprietà fotofisiche tramite spettroscopia UV-vis e di fluorescenza conferma sia l'avvenuta funzionalizzazione che il fatto che esse vengano mantenute dopo il legame covalente con l'argilla. In Figura 83a sono riportati gli spettri UV-vis e di fluorescenza di una soluzione in DCM di **39** (10 μ M). È possibile osservare un massimo di assorbimento a 533 nm e, irradiando la stessa soluzione a tale lunghezza d'onda, si registra un picco di emissione a 550 nm, con uno *stokes shift* di 17 nm. Invece, nello spettro UV-vis del nuovo nanomateriale ottenuto (Figura 83b), è possibile osservare come, in seguito al legame covalente con l'argilla, il massimo di assorbimento abbia subito uno *shift* batocromico di ca. 15 nm. Si riscontra infatti una lunghezza d'onda massima di assorbimento a 550 nm, e irradiando alla medesima lunghezza d'onda, si registra un picco di emissione a ca. 567 nm, con uno *stokes shift* di 17 nm.

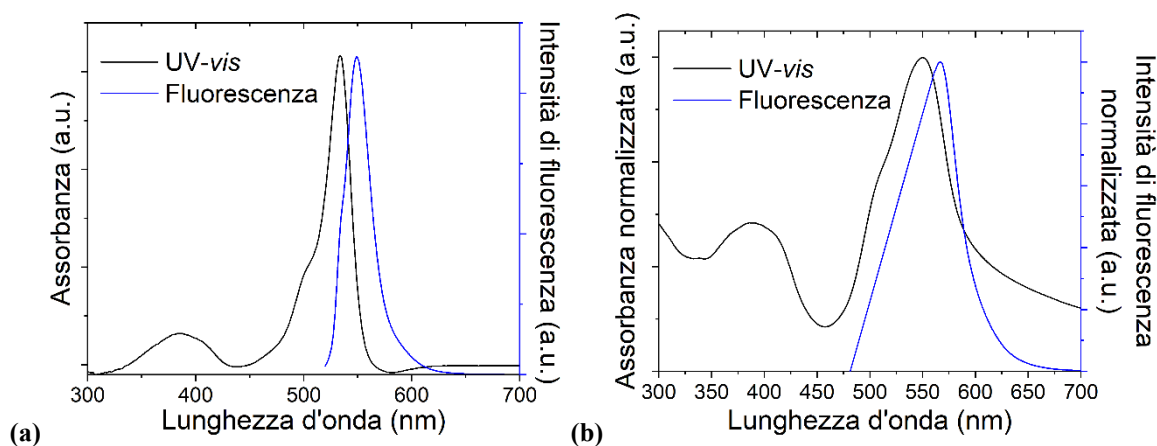


Figura 83. Spettro di assorbimento (linea nera) e di emissione (linea blu) di (a) una soluzione di **39** in DCM (10 μ M) e (b) una dispersione del nanomateriale **HNT-40** in DCM (1 mg mL⁻¹)

2.5.6. Studio delle proprietà fotosensibilizzanti di **39**

La modifica del *core* BODIPY con atomi di iodio in posizione 2,6 ha permesso la sintesi di una molecola capace di generare ossigeno singoletto, e quindi con potenziali applicazioni nel campo della PDT. A tal fine, dunque, la capacità di generare $^1\text{O}_2$ da parte di **39** è stata studiata attraverso irradiazione laser di una sua soluzione in presenza di acido 9,10-antracenedil-bis(metilene) dimalonico (ABDA), utilizzandolo come *scavenger* per $^1\text{O}_2$. L'ABDA è un derivato dell'antracene che mostra quattro bande di assorbimento caratteristiche a 340, 360, 380 e 400 nm. Può intrappolare in modo specifico $^1\text{O}_2$ formando un prodotto endoperossido O_2 -ABDA (Figura 84), che porta alla scomparsa delle sue tipiche bande di assorbimento. La generazione di questa forma può essere seguita sia dagli spettri UV-*vis* che da quelli di fluorescenza; in entrambi i casi, la diminuzione del picco di assorbimento o di emissione indica la quantità di ABDA consumata e di conseguenza la quantità di $^1\text{O}_2$ generata.^{167, 168}

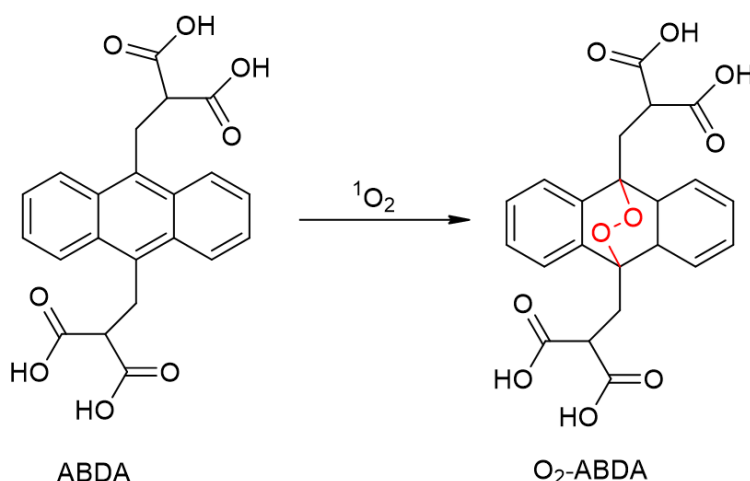


Figura 84. Reazione di $^1\text{O}_2$ con ABDA

Quindi, una soluzione in DMSO di **39** in presenza di ABDA è stata sottoposta a irradiazione tramite laser a 532 nm (50 mW) e, a dei tempi prestabiliti, si è registrato lo spettro di emissione dell'ABDA eccitando a $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm. Come si evidenzia in Figura 85a, l'intensità del segnale di emissione di ABDA ha mostrato una progressiva diminuzione in presenza di **39** (5 μM). Ciò suggerisce che durante l'irraggiamento sia stato generato $^1\text{O}_2$ che ha causato la degradazione della sonda.

Al contrario, in assenza del fotosensibilizzatore **39**, lo spettro di emissione di ABDA è rimasto invariato nel tempo, anche sotto le stesse condizioni di irradiazione, indicando l'assenza di produzione di $^1\text{O}_2$ (Figura 85b).

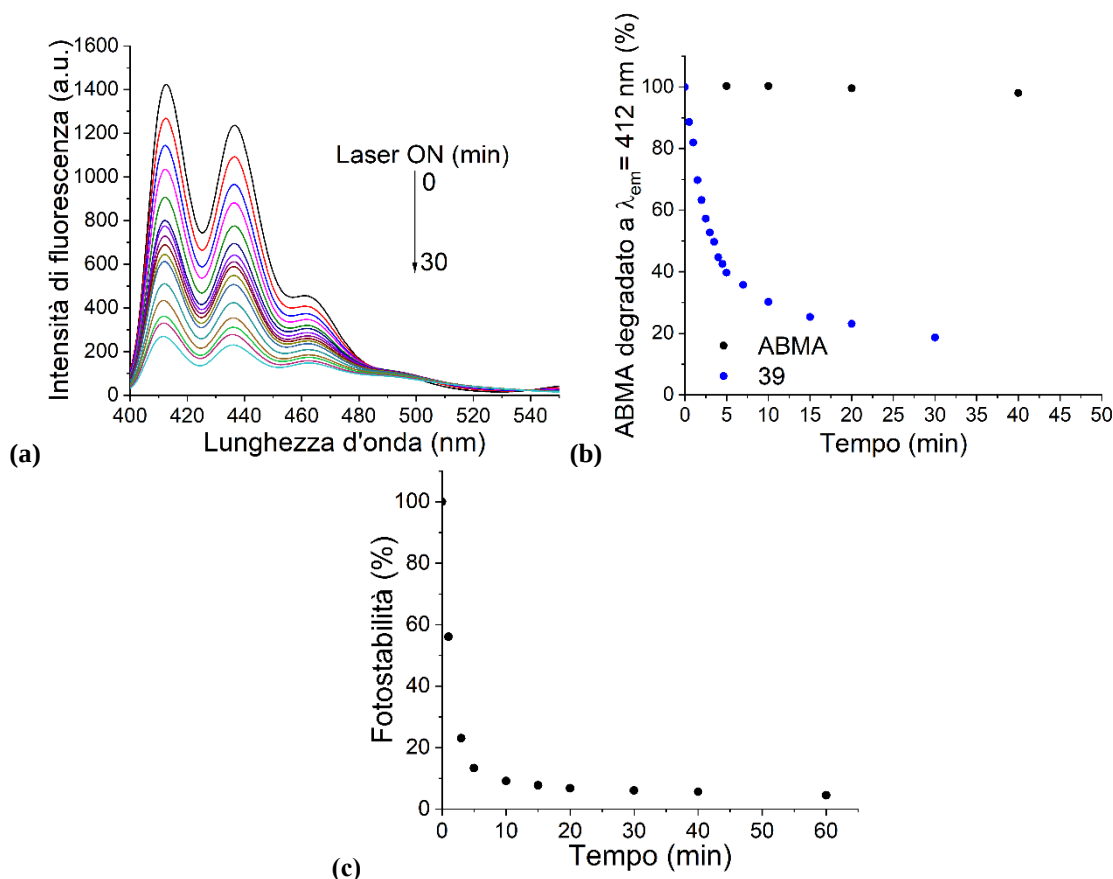


Figura 85. (a) Spettro di emissione di una soluzione di ABDA (1 mM) e **39** (5 mM) in DMSO durante irradiazione a 532 nm per 30 minuti; (b) Grafico delle variazioni di emissione a 412 nm rispetto al tempo di irradiazione in assenza (controllo) e in presenza di **39** in DMSO; (c) fotostabilità di **39** in DMSO durante irradiazione a 532 nm

È stata valutata anche la fotostabilità della molecola, verificando se durante l'irradiazione potessero comparire segnali di emissione diversi dal profilo originale dovuti alla formazione di nuove specie in soluzione. Irradiando la soluzione di **39** a 532 nm si è osservata una netta riduzione dell'emissione di fluorescenza, ma nessuna comparsa di nuove bande (Figura 85c). Ciò indica che il composto è fotodegradabile, ma l'irradiazione non causa la formazione di nuove specie.

Sono attualmente in corso studi approfonditi sul nanomateriale **HNT-40**, con l'obiettivo di valutare se il composto **39**, una volta immobilizzato sulla superficie esterna dei nanotubi di halloysite, sia in grado di conservare le proprie proprietà fotodinamiche. L'attenzione della ricerca si concentrerà, anche, sulla fotostabilità del sistema rispetto alla sola molecola organica libera, al fine di comprendere in che misura l'interazione con HNT possa influenzare la resistenza del composto ai processi di degradazione fotoindotta. Si ipotizza che, come visto in letteratura,⁵⁷ il legame covalente del composto **39** con l'halloysite possa esercitare un effetto stabilizzante, limitando la degradazione del materiale durante l'irradiazione laser e garantendo così una maggiore efficienza fotodinamica nel tempo.

In questo modo sono stati ottenuti due sistemi nanostrutturati basati su halloysite e BODIPY, caratterizzati da proprietà che li rendono potenzialmente idonei per applicazioni in ambito teranostico. La combinazione di un materiale inorganico, come la halloysite, con un fluoroforo organico, quale il BODIPY, consente infatti di integrare in un unico sistema funzionalità di tipo diagnostico e terapeutico. Inoltre, visto che tali nanomateriali presentano ancora il lume vuoto, essi potrebbero essere ulteriormente modificati tramite il caricamento di farmaci per specifiche patologie, al fine di ottenere piattaforme multifunzionali capaci di un rilascio controllato del principio attivo e di un monitoraggio simultaneo del trattamento. Questa versatilità rende i sistemi proposti promettenti candidati per future applicazioni nel campo della teranostica.

3. Conclusioni

Nel corso di questi anni di dottorato è stata approfondita la possibile applicazione dei nanotubi di halloysite come sistemi innovativi per lo sviluppo di sistemi multifunzionali in ambito teranostico. L'obiettivo principale è stato quello di valorizzare le peculiari proprietà chimico-fisiche di questo materiale naturale, esplorandone il potenziale sia nel campo diagnostico sia in quello terapeutico, attraverso la sintesi e la caratterizzazione di diversi sistemi a base di HNT e molecole organiche fluorescenti.

L'halloysite si è rivelata un materiale estremamente versatile, con la quale è possibile superare alcune limitazioni tipiche delle molecole organiche, come la scarsa solubilità, la tendenza all'aggregazione e la difficoltà nell'attraversare le barriere biologiche.

Tra i sistemi sintetizzati, il nanomateriale a base di halloysite e protoporfirina IX o zinco-protoporfirina IX ha mostrato interessanti proprietà fotosensibilizzanti, rendendolo un promettente candidato per applicazioni nella terapia fotodinamica. In particolare, il sistema contenente zinco-protoporfirina IX ha evidenziato un'attività fotosensibilizzante superiore, confermata sia da analisi chimiche sia da test *in vitro*. Inoltre, l'impiego dell'halloysite funzionalizzata covalentemente come *filler* in piattaforme biomediche a base di chitosano ha aperto la strada a potenziali applicazioni per trattamenti topici di neoplasie cutanee.

Anche il nanomateriale a base di halloysite e oligo(fenilene etinilene) ha dimostrato ottime prospettive nella terapia fotodinamica antibatterica. L'introduzione della vancomicina all'interno del lume dei nanotubi ha ulteriormente potenziato l'attività del sistema, fornendo una duplice azione antibatterica.

Parallelamente, la realizzazione di un sistema a base di halloysite, una sonda fluorescente alocromica sensibile al pH e Fe₃O₄NPs ha permesso di sviluppare un materiale con comportamento teranostico, capace non solo di distinguere le cellule sane da quelle tumorali ma anche di esercitare attività chemodinamica. Le analisi hanno infatti dimostrato la generazione di radicali idrossilici in presenza di acqua ossigenata, responsabili della morte delle cellule tumorali.

Un ulteriore sistema è stato ottenuto modificando opportunamente una naftalenediimmide legata covalentemente sulla superficie esterna dell'halloysite; ciò ha permesso di potenziarne le proprietà fotosensibilizzanti. In questo contesto, l'aggiunta di un PNA ha permesso di ottenere un sistema che in futuro potrebbe essere utilizzato per la medicina di precisione, capace di riconoscere selettivamente specifiche sequenze biologiche.

Infine, durante il periodo di ricerca svolto all'estero sono state sintetizzate due molecole fluorescenti a base BODIPY, progettate per il *sensing* reversibile del glutathione e per applicazioni nella terapia fotodinamica. L'immobilizzazione di queste sonde sulla superficie esterna dell'halloysite ha permesso di ottenere sistemi stabili, biocompatibili e potenzialmente applicabili in ambito biomedico.

Nel complesso, i risultati ottenuti non solo forniscono una solida base per futuri studi sull'impiego dei nanotubi di halloysite in teranostica, ma lasciano anche intravedere molte altre possibilità di applicazione. Le diverse strategie di funzionalizzazione sviluppate mostrano infatti come l'halloysite possa diventare una piattaforma estremamente flessibile, utile non solo per scopi diagnostici e terapeutici, ma anche per la progettazione di "*smart materials*" in grado di reagire a specifici stimoli del microambiente biologico. Questo apre la strada, ad esempio, alla realizzazione di sistemi di rilascio mirato sempre più precisi, capaci di attivarsi solo in presenza di determinate condizioni fisiologiche o patologiche.

Allo stesso tempo, la natura biocompatibile e la grande stabilità dei nanomateriali prodotti suggeriscono potenziali utilizzi anche in altri ambiti della biomedicina, come nei materiali per la rigenerazione tissutale o nei rivestimenti antibatterici per dispositivi medici. Dal punto di vista clinico, le proprietà teranostiche messe in evidenza rendono questi sistemi particolarmente interessanti per approcci terapeutici personalizzati, in cui diagnosi e trattamento procedono insieme e si adattano alle caratteristiche del singolo paziente.

In prospettiva, l'impiego combinato di fotosensibilizzatori, molecole *target* e agenti chemodinamici potrebbe trovare applicazione in diversi scenari clinici, soprattutto per il trattamento locale di tumori superficiali, infezioni e patologie cutanee.

Inoltre, l'integrazione di sonde fluorescenti sensibili e selettive apre possibilità anche nella diagnostica avanzata, come l'*imaging* guidato durante gli interventi chirurgici o il monitoraggio in tempo reale dell'efficacia terapeutica.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti rappresentano dunque un punto di partenza solido sia per ulteriori sviluppi sperimentali che per una futura traduzione clinica. Proseguire su questa strada permetterà di affinare ulteriormente le strategie sintetiche proposte e di estendere le applicazioni dei materiali basati su halloysite a un numero sempre maggiore di contesti terapeutici e diagnostici, con l'obiettivo di ottenere sistemi teranostici sempre più avanzati.

4. Parte sperimentale

4.1. Materiali

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck, TCI, BLD Pharm e VWR e usati senza ulteriori purificazioni, a eccezione della 4-dietilamminosalicilaldeide che è stata acquistata dalla Fluorochem. La biotina 2'-aminoetilammide (**5**) è stata sintetizzata come riportato in letteratura.⁸² Anche il 3-azidopropiltrimetossi silano è stato sintetizzato come riportato in letteratura.¹²⁴

L'acqua bidistillata è stata preparata mediante processo di distillazione dell'acqua distillata con una soluzione di KMnO_4 e NaOH .

4.2. Metodi

Il bagno ad ultrasuoni è un modello VWR Ultrasonic Cleaner che lavora alla frequenza di 45 kHz e una potenza di 220 W.

Le sintesi eseguite tramite microonde sono state effettuate tramite un sistema monomodale CEM DISCOVER in un recipiente chiuso.

Le analisi termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-1**, **HNT-2**, **HNT-6** e **HNT-7** sono state eseguite con un apparecchio IR Q5000 (TA Instruments) del Dipartimento di Chimica-Fisica dell'Università degli Studi di Palermo, con un flusso di azoto di $25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ per il campione e di $10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ per la bilancia. Il peso di ciascun campione è di circa 10 mg. Le misure vengono eseguite riscaldando il campione da temperatura ambiente a $900 \text{ }^\circ\text{C}$ a una velocità di $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Le analisi termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-4**, **HNT-26**, **HNT-27**, **HNT-28** e **HNT-30a-c** sono state eseguite con lo strumento PerkinElmer Pyris TGA7 in un intervallo di temperatura compreso tra $50\text{--}800 \text{ }^\circ\text{C}$, con un incremento di temperatura pari a $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ con un flusso di azoto di 60 mL min^{-1} . Invece, le analisi termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-9**, **HNT-17**, **HNT-18**, **HNT-19**, **HNT-20**, **HNT-21**, **HNT-22**, **HNT-23** e **Ht-25** sono state eseguite su uno strumento Mettler Toledo, dotato di sensore e microbilancia FRS5 (precisione $0.1 \text{ }\mu\text{g}$) e pacchetto software FP89, utilizzando una velocità di riscaldamento di $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ nell'intervallo di temperatura $30\text{--}800 \text{ }^\circ\text{C}$. Le analisi termogravimetriche dei nanomateriali **HNT-35** e **HNT-40** sono state eseguite con un apparecchio Discovery SDT 650 (TA Instruments), con un flusso di azoto, in un intervallo di temperatura compreso tra $50\text{--}800 \text{ }^\circ\text{C}$, equilibrando il campione a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ per 20 min. Il peso di ciascun campione è di circa 5 mg. Le misure vengono eseguite riscaldando il campione con una velocità di $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Gli spettri FT-IR sono stati registrati con uno spettrometro Agilent Technologies Cary 630 FT-IR. I campioni per queste misure sono stati preparati pesando 5 mg di polvere dei diversi nanomateriali e circa 95 mg di KBr.

L'analisi delle dimensioni, il potenziale ζ e l'indice di polidispersità dei campioni sono stati determinati utilizzando uno strumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Londra, Regno Unito), dotato di un laser a 532 nm con un angolo di diffusione fisso di 173° . I campioni per queste misure vengono preparati disperdendo 1 mg dei diversi nanomateriali in 10 mL di acqua.

Le misure UV-vis sono state eseguite utilizzando uno spettrometro Beckmann DU 650.

Gli spettri di fluorescenza allo stato liquido sono stati acquisiti con uno spettrofluorimetro JASCO FP-777W e JASCO FP8300. Gli spettri di emissione dei campioni solidi sono stati acquisiti utilizzando uno spettrofluorimetro JASCO FP8300.

Le misure XPS dei nanomateriali **HNT-1** e **HNT-2** sono state effettuate con uno spettrometro SPECS SAGE HR 100 in alto vuoto (10^{-7} Pa), dotato di una sorgente di raggi X non monocromatica Mg con una $K\alpha$ lines di 1253.6 eV. È stato utilizzato un cannone a diluizione di elettroni per neutralizzare la carica.

Le analisi XPS del nanomateriale **HNT-24** sono state effettuate con un VG Microtech ESCA 3000 Multilab, dotato di un doppio anodo Mg/Al. Come fonte di eccitazione è stata utilizzata la radiazione Al $K\alpha$ (1486.6 eV). La polvere del campione è stata montata su un nastro biadesivo. La pressione nella camera di analisi era circa 10^{-8} Torr durante la raccolta dei dati. La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è stata eseguita con un microscopio elettronico a trasmissione ad altissima risoluzione FEI Titan G2 60-300 (FEI, Losanna, Svizzera) accoppiato ad un microscopio elettronico analitico (AEM), eseguita con un rivelatore di spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (XEDS). Gli spettri AEM sono stati salvati in modalità STEM (*scanning transmission electron microscopy*) con un rivelatore HAADF (*high angle annular dark field*). Sono state raccolte anche le mappe elementali.

Le analisi ^1H -NMR e ^{13}C -NMR delle molecole **11-16** sono state condotte tramite Spettrometro NMR Bruker Avance II 400 MHz presso ATeN Center – Advanced Technologies Network Center. Le analisi NMR delle molecole **31-39** sono state condotte tramite Spettrometro NMR Bruker 400 MHz presso la facoltà di Farmacia dell'Universitat de Barcelona.

Le misure condotte al microscopio a forza atomica (AFM) sono state eseguite in modalità tapping utilizzando un AFM Nanoscope IIIA-MultiMode (Digital Instruments, Santa

Barbara, CA, USA). Il dispositivo era dotato di uno scanner calibrato <J> utilizzando produttori di griglie. Le immagini sono state registrate a una velocità di scansione di 1 Hz e 512×512 pixel per immagine (cioè in condizioni di alta risoluzione) utilizzando punte di silicio drogato con fosforo (n) da $0.5\text{--}2\ \Omega\cdot\text{cm}$ montate su *cantilever* con una costante di forza nominale di 40 N/m e una frequenza di risonanza di 300 kHz. Durante l'*imaging*, il *set point* è stato continuamente regolato per mantenere la forza al valore più basso possibile. L'analisi delle immagini è stata effettuata utilizzando il software DI, versione 4.23r6. Le immagini sono state appiattite per rimuovere le pendenze di fondo.

Le proprietà di trazione dei film nanocompositi sono state studiate mediante analisi meccanica dinamica (DMA) utilizzando l'apparecchio DMA Q800 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). I test sono stati condotti sotto una rampa di sollecitazione controllata ($1\ \text{MPa min}^{-1}$) a $25.0 \pm 0.1\ ^\circ\text{C}$.

4.3. Sintesi

Sintesi di HNT-SH

L'halloysite è stata covalentemente modificata sulla superficie esterna tramite reazione alle microonde in assenza di solvente. Specificatamente, HNT (1 g) e il 3-mercaptopropiltrimetossi silano (2 mL) sono stati introdotti in una provetta da microonde, insieme ad un'ancoretta magnetica. La reazione è stata condotta a $100\ ^\circ\text{C}$ per 60 min, impostando una potenza iniziale dello strumento di 80 W. La miscela di reazione è stata filtrata sottovuoto, e la polvere bianca ottenuta è stata lavata ripetutamente con metanolo ed infine essiccata a $60\ ^\circ\text{C}$ sottovuoto. Dalle analisi effettuate tramite TGA, ne risulta che la percentuale di caricamento dell'organosilano sul prodotto ottenuto era dell'1.2 %p/p.

Sintesi di HNT-NH₂

In un pallone monocollo da 50 mL, è stato pesato 1 g di halloysite a cui sono stati aggiunti, sotto atmosfera inerte, 25 mL di toluene anidro. Alla dispersione ottenuta sono stati aggiunti 2 mL di (3-amminopropil)trimetossi silano. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione e a riflusso del solvente per 48 h. Trascorso questo tempo, la miscela è stata filtrata sottovuoto e la polvere bianca ottenuta, è stata lavata più volte con metanolo. Dalle analisi effettuate tramite TGA, ne risulta che la percentuale di caricamento dell'organosilano sul prodotto ottenuto era del 3.8 %p/p.

Sintesi di HNT-N₃

In un pallone monocollo da 50 mL, è stato pesato 1 g di halloysite a cui sono stati aggiunti, sotto atmosfera inerte, 25 mL di toluene anidro. Alla dispersione ottenuta sono stati aggiunti 2 mL di (3-azidopropil)trimetossi silano. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione e a riflusso del solvente per 24 h. Trascorso questo tempo, la miscela è stata filtrata sottovuoto e la polvere bianca ottenuta, è stata lavata più volte con metanolo. Dalle analisi effettuate tramite TGA, ne risulta che la percentuale di caricamento dell'organosilano sul prodotto ottenuto era del 2.6 %p/p.

Sintesi di HNT-1

In una provetta di quarzo sono stati introdotti: **HNT-SH** (150 mg), PPIX (70 mg) e metanolo (10 mL). La dispersione è stata degasata tramite argon per 15 min e dopo posta davanti una lampada a Hg (265 nm). La reazione è stata lasciata sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata filtrata sottovuoto, e la polvere ottenuta è stata lavata ripetutamente con THF, metanolo e CH₂Cl₂ e infine essiccata a 60 °C sotto vuoto. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA del prodotto ottenuto è di 2.1 %p/p.

Sintesi di HNT-2

HNT-SH (150 mg) e la PPIX (70 mg) sono stati omogenizzati e introdotti in una provetta da microonde insieme ad un'ancoretta magnetica. Successivamente è stata aggiunta una quantità catalitica di AIBN. La reazione è stata condotta in assenza di solvente a 100 °C per 60 min, impostando una potenza iniziale dello strumento di 80 W. La miscela di reazione è stata filtrata sottovuoto, e la polvere ottenuta è stata lavata ripetutamente con THF, metanolo e CH₂Cl₂ e infine essiccata a 60 °C sotto vuoto. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA del prodotto ottenuto è del 3.7 %p/p.

Sintesi di 3

In un pallone bicollo da 100 mL, ad una soluzione di PPIX (200 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq.) in DMF (50 mL) è stata aggiunta una soluzione di ZnCl₂ (480 mg, 3.6 mmol, 10.0 eq.) in DMF (10 mL). La miscela è stata agitata per una notte a 65 °C. Dopo aver evaporato il solvente, il prodotto ottenuto è stato lavato con acqua e metanolo mediante centrifugazione, ottenendo un solido marrone dal peso di 215 mg con una resa del 96%.

Sintesi di HNT-4

HNT-SH (150 mg) e **3** (70 mg) sono stati omogenizzati e introdotti in una provetta da microonde insieme ad un'ancoretta magnetica. Successivamente è stata aggiunta una quantità catalitica di AIBN. La reazione è stata condotta in assenza di solvente, a 100 °C per 60 min, impostando una potenza iniziale dello strumento pari a 80 W. La miscela di reazione è stata filtrata sottovuoto, e la polvere ottenuta è stata lavata ripetutamente con THF, metanolo e CH₂Cl₂ e infine essiccata a 60 °C sotto vuoto. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA del prodotto ottenuto è del 12.0 %p/p.

Sintesi di HNT-6

In un pallone bicollo da 25 mL sono stati introdotti **HNT-2** (50 mg) e EDC·HCl (5 mg), successivamente, in ambiente inerte, è stata aggiunta la DMF (5 mL). La reazione è stata lasciata sotto agitazione. Contemporaneamente, in un altro pallone è stata solubilizzata la biotina 2'-amminoetilammide (20 mg) in DMF (5 mL). Quest'ultima soluzione è stata quindi aggiunta nel primo pallone tramite cannula. La reazione è stata lasciata ad agitare per circa quattro giorni a temperatura ambiente. Successivamente, la miscela ottenuta è stata filtrata in condizioni di vuoto e lavata con acqua. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA del prodotto ottenuto è minore dell'1.0 %p/p.

Sintesi di HNT-7

In un pallone bicollo da 50 mL sono stati introdotti **HNT-4** (100 mg) e EDC·HCl (25 mg), successivamente, in ambiente inerte, è stata aggiunta la DMF (10 mL). La reazione è stata lasciata sotto agitazione. Contemporaneamente, in un altro pallone è stata solubilizzata la biotina 2'-amminoetilammide (100 mg) in DMF (15 mL). Quest'ultima soluzione è stata quindi aggiunta nel primo pallone tramite cannula. La reazione è stata lasciata ad agitare per circa quattro giorni a temperatura ambiente. Successivamente, la miscela ottenuta è stata filtrata in condizioni di vuoto e lavata con acqua. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA del prodotto ottenuto è minore dell'1.5 %p/p.

Sintesi di HNT-9

In un pallone da 25 mL, **8** (5.0 mg, 6.1×10^{-3} mmol) è stato sospeso in DMF (10 mL) in condizioni inerti. Successivamente è stato aggiunto l'1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC·HCl) (1.2 mg, 6.1×10^{-3} mmol). La dispersione è stata lasciata ad agitare a temperatura ambiente per 10 min, quindi è stato aggiunto

rapidamente **HNT-NH₂** (100 mg). La dispersione è stata posta ad agitazione per 48 h a temperatura ambiente. La miscela è stata filtrata sottovuoto e la polvere è stata lavata con H₂O, MeOH e CH₂Cl₂ e infine essiccata a 60 °C sotto vuoto. La percentuale di caricamento stimato dalla TGA è di circa 1.0 %p/p.

Sintesi di HNT-10

In un pallone da 10 mL, è stato disperso **HNT-9** (100 mg) in acetone (5 mL); successivamente è stata aggiunta una soluzione di vancomicina in H₂O ($1 \cdot 10^{-2}$ M, 1 mL). Dopo aver fatto dei cicli di vuoto, la dispersione ottenuta è stata lasciata ad agitare per 18 h a temperatura ambiente. Successivamente, il solvente è stato rimosso per filtrazione e la polvere ottenuta è stata lavata ripetutamente con acetone ed essiccata a 60 °C. Il caricamento di vancomicina è stato determinato spettrofotometricamente: circa 10 mg di nanomateriale sono stati accuratamente pesati e lavati con quattro porzioni di acqua (5 mL ciascuna) e la soluzione ottenuta è stata analizzata tramite spettroscopia UV-vis alla lunghezza d'onda di 278 nm. Si è stimata una percentuale di caricamento pari a circa il 16 %p/p.

Sintesi di 11

In un pallone bicollo da 50 mL, è stato solubilizzato l'acido 4-idrazinobenzoico (2.0 g, 0.013 mol, 1.0 eq.) in acido acetico glaciale (20 mL). Alla soluzione ottenuta, sono stati successivamente aggiunti 2.8 mL di 3-metil-2-butanone (0.026 mol, 2.0 eq.) e la miscela di reazione è stata lasciata ad agitare in condizioni di riflusso del solvente per circa 24 h. Successivamente, la soluzione ottenuta è stata evaporata tramite rotavapor per rimuovere l'acido acetico glaciale. Si è ottenuto un prodotto rosso scuro molto viscoso al quale è stato aggiunto K₂CO₃ per regolare il pH a ~4, per poi procedere con l'estrazione con DCM. La fase organica ottenuta è stata anidrificata con MgSO₄, filtrata e portata a secco tramite rotavapor, portando così all'ottenimento di **11** sotto forma di un solido rosso (0.902 g) con una resa del 34%.

¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ = 1.265 (6H, s), 2.244 (3H, s), 7.486-7.506 (1H, d, 8 Hz), 7.897-7.921 (1H, dd, 8 e 1.6 Hz), 7.980-7.985 (1H, dd, 1.6 e 0.4 Hz).

¹³C NMR (400 MHz, DMSO), δ = 15.80, 22.72, 53.92, 119.56, 123.17, 127.79, 130.07, 146.57, 157.86, 167.97, 192.13.

Sintesi di 12

In un pallone monocollo da 50 mL sono stati aggiunti **11** (800 mg, 4.0 mmol, 1.0 eq.), l'alcol propargilico (300 μ L, 4.7 mmol, 1.2 eq.), la DCC (810 mg, 4.0 mmol, 1.0 eq.) e il DMAP (480 mg, 4.0 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (20 mL). La miscela di reazione è stata lasciata ad agitare a temperatura ambiente per 16 h. Il precipitato ottenuto è stato filtrato e lavato con CH_2Cl_2 . Il filtrato è stato distillato a pressione ridotta ottenendo un solido. Il grezzo di reazione è stato dunque purificato tramite colonna cromatografica [SiO_2 , Esano/EtOAc (3:1, v/v)] ottenendo **12** (690 mg) come un solido giallo con una resa del 72%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ = 1.335 (6H, s), 2.320 (3H, s), 2.520-2.532 (1H, t, 2.4 Hz), 4.930-4.936 (2H, d, 2.4 Hz), 7.559-7.579 (1H, d, 1.2 Hz), 8.064-8.089 (1H, dd, 8 e 1.6 Hz).
 ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3), δ = 15.74, 22.86, 33.96, 52.41, 53.92, 74.95, 77.96, 119.74, 122.93, 126.10, 130.46, 145.82, 158.11, 165.99, 192.03.

Sintesi di 13

In un pallone monocollo da 100 mL, una soluzione di **12** (630 mg, 2.61 mmol, 1.0 eq.) e 2-clorometil-4-nitrofenolo (612 mg, 3.26 mmol, 1.25 eq.) in MeCN (50 mL) è stata lasciata ad agitare in condizioni di riflusso del solvente per 24 h. Dopo aver raffreddato la soluzione a temperatura ambiente, il solvente è stato distillato a pressione ridotta e il residuo è stato purificato tramite colonna cromatografica [SiO_2 , Esano/EtOAc (4:1, v/v)] ottenendo **13** (443 mg) come un solido bianco con una resa del 43%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ = 1.211 (3H, s), 1.577 (3H, s), 1.605 (3H, s), 2.480-2.491 (1H, t, 2.0 Hz), 4.680 (2H, s), 4.871-4.877 (2H, d, 2.4 Hz), 6.583-6.604 (1H, d, 8.4 Hz), 6.745-6.768 (1H, d, 9.2 Hz), 7.811-7.814 (1H, d, 1.2 Hz), 7.874-7.907 (1H, dd, 12.4 e 5.2 Hz), 7.964-7.993 (1H, dd, 9.2 e 2.4 Hz), 8.085-8.091 (1H, d, 2.4 Hz).

Sintesi di 14

In un pallone bicollo da 100 mL, è stata solubilizzata la 4-dietilaminosalicilaldeide (2 g, 10.3 mmol, 1.0 eq.) in etanolo assoluto (30 mL). Successivamente sono stati aggiunti il dietilmalonato (3.0 mL, 20.0 mmol, 2.0 eq.) e la piperidina (1 mL, 10 mmol, 1.0 eq.). La soluzione ottenuta è stata lasciata ad agitare per 6 h in condizioni di riflusso del solvente. L'etanolo è stato evaporato a pressione ridotta, e alla miscela ottenuta sono stati aggiunti HCl concentrato (20 mL) e acido acetico glaciale (20 mL) per idrolizzare la reazione. La sospensione è stata lasciata ad agitare a temperatura ambiente per ulteriori 6 h. La soluzione è stata raffreddata a temperatura ambiente e versata in 100 mL di acqua ghiacciata;

riscontrando così la formazione immediata di un precipitato. È stato aggiunto NaOH per modulare il pH della soluzione a ~5 in condizioni di agitazione. Infine, la miscela è stata filtrata, lavata con acqua, essiccata e ricristallizzata con toluene per ottenere **14** come cristalli arancioni (664 mg) con una resa del 30%.

Sintesi di 15

In un pallone da 25 mL, la DMF anidra (4 mL) è stata aggiunta goccia a goccia alla POCl₃ (430 µL, 4.60 mmol, 3.0 eq.) in atmosfera inerte a 50 °C. La soluzione è stata lasciata ad agitare e, successivamente, è stata introdotta una porzione di **14** (330 mg, 1.50 mmol, 1.0 eq., disciolta in 5 mL di DMF anidra) per ottenere una sospensione scarlatta. La miscela è stata agitata a 60 °C per 15 h e poi versata in 100 mL di acqua ghiacciata. Si aggiunge quindi una soluzione di HCl (18%, 30 mL), e si pone la reazione a riflusso per 6 h. In seguito, la miscela viene versata in 100 mL di acqua ghiacciata e si aggiunge una soluzione di NaOH per regolare il pH, ottenendo una grande quantità di precipitato. Il prodotto grezzo è stato filtrato, lavato accuratamente con acqua, essiccato per ottenere **15** come cristalli arancioni con una resa del 81%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ = 1.241-1.277 (6H, t, 7.2 Hz), 3.453-3.506 (4H, q, 7.2 e 14 Hz), 6.485-6.491 (1H, d, 2.4 Hz), 6.625-6.653 (1H, dd, 8.8 e 2.4 Hz), 7.402-7.724 (1H, d, 8.8 Hz), 8.254 (1H, s), 10.127 (1H, s)

Sintesi di 16

In un pallone da 50 mL, una soluzione di **13** (204 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq.), **15** (147 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq.) e TFA (250 µL, 3.3 mmol, 6.6 eq.) in EtOH (20 mL) è stata posta a riflusso del solvente per 15 h. Dopo aver raffreddato la soluzione a temperatura ambiente, il solvente è stato distillato a pressione ridotta e il residuo è stato purificato tramite colonna cromatografica [SiO₂, Esano/EtOAc (3:1, v/v)] per ottenere **16** (251 mg) come un solido verde con una resa del 79.1%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ = 1.195-1.261 (12H, m), 2.481-2.493 (1H, t, 4.8 Hz), 3.390-3.443 (4H, q, 7.2 e 14 Hz), 4.646- 4.661 (2H, d, 6 Hz), 4.877-4.882 (2H, d, 2 Hz), 6.469-6.674 (1H, d, 2 Hz), 6.557-6.585 (1H, dd, 8.8 e 2.4 Hz), 6.617-6.627 (1H, d, 4.0 Hz), 6.648-6.657 (1H, d, 3.6 Hz), 6.885-6.907 (1H, m, 8.8 Hz), 6.942 (1H, s), 7.227-7.249 (1H, d, 8.8 Hz), 7.513 (1H, s), 7.814- 7.817 (1H, d, 1.2 Hz), 7.890-7.914 (1H, dd, 8 e 1.2 Hz), 7.978-7.984 (1H, d, 2.4 Hz), 8.007-8.013 (1H, d, 2.4 Hz)

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3), δ = 12.46, 18.48, 26.62, 29.69, 40.92, 44.88, 49.75, 52.03, 74.67, 78.13, 96.93, 103.91, 107.96, 108.46, 109.23, 115.33, 117.87, 119.87, 121.51, 123.20, 124.16, 125.06, 129.13, 131.20, 131.27, 138.50, 140.88, 141.64, 151.06, 151.26, 155.96, 158.89, 160.67, 165.75

Sintesi di HNT-17 tramite approccio top down

In un pallone monocollo da 50 mL, **HNT-N₃** (200 mg) e **16** (155 mg) sono stati sospesi in una miscela $\text{H}_2\text{O}/^t\text{BuOH}$ (1:1) (16 mL) in presenza di una quantità catalitica di una soluzione $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /ascorbato di sodio (1 M, 1:10 v/v). La dispersione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Successivamente, il solvente è stato rimosso per filtrazione e la polvere è stata lavata ripetutamente con acqua e CH_2Cl_2 ottenendo una polvere verde. Dalle analisi termogravimetriche si stima una percentuale di caricamento pari a 7.2 %p/p.

Sintesi di HNT-18

In un pallone sono stati introdotti **HNT-NH₂** (500 mg), la 4-azidocinnamaldehyde (1.3 g) ed etanolo (25 mL). La reazione è stata lasciata in agitazione e a riflusso del solvente per 72 h. Successivamente, la miscela è stata lavata ripetutamente con ulteriore etanolo per rimuovere la restante 4-azidocinnamaldehyde non reagita. Dalle analisi effettuate tramite TGA, ne risulta che la percentuale di caricamento era del 9.5 %p/p.

Sintesi di HNT-19

In un pallone sono stati dispersi **HNT-NH₂** (500 mg) in metanolo (25 mL), successivamente è stato aggiunto il metilacrilato (150 μL). La dispersione è stata posta a riflusso del solvente ed in agitazione per 24 h. La miscela è stata lavata più volte con metanolo e acetone per centrifugazione. La percentuale di caricamento del metilacrilato su **HNT-NH₂** è stata stimata dalla TGA, ed è pari al 5.0 %p/p.

Sintesi di HNT-20

Il nanomateriale **HNT-19** (20 mg), bis-(2-cloroetil)-ammina (250 mg) e ^{t} butossido di potassio (5 mg) sono stati omogenizzati e introdotti in una provetta da microonde insieme ad un'ancoretta magnetica. La reazione è stata condotta in assenza del solvente, a 80 °C per 30 min, impostando una potenza iniziale dello strumento pari a 80 W. È stata ottenuta una polvere bianca che è stata lavata ripetutamente con acqua per centrifugazione.

Sintesi di HNT-21

In un pallone monocollo da 10 mL, è stato disperso **HNT-N₃** (200 mg) in una miscela H₂O/^tBuOH (1:1) (4 mL) e successivamente si è aggiunto l'alcol propargilico (0.1 mL) e una quantità catalitica di una soluzione CuSO₄ × 5H₂O/ascorbato di sodio (1 M, 1:10 v/v). La dispersione è stata lasciata in agitazione a temperature ambiente per 24 h. Trascorso questo tempo, il solvente è stato rimosso per filtrazione e la polvere è stata lavata ripetutamente con acqua e metanolo ed infine essiccata a 60 °C sottovuoto ottenendo una polvere gialla. Dalle analisi termogravimetriche si stima una percentuale di caricamento pari a 1.5 %p/p.

Sintesi di HNT-22

In un pallone monocollo da 50 mL, una dispersione di **HNT-21** (500 mg, 0.3 mmol), **11** (100 mg, 0.5 mmol), DCC (100 mg, 0.5 mmol) e DMAP (60 mg, 0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) sono stati lasciati ad agitare a temperature ambiente per 48 h. La miscela è stata quindi filtrata sottovuoto e lavata ripetutamente con H₂O, CH₃OH e CH₂Cl₂. Dalle analisi termogravimetriche si stima una percentuale di caricamento pari a 4.7 %p/p.

Sintesi di HNT-23

In un pallone monocollo da 50 mL, una dispersione di **HNT-22** (500 mg) e 2-clorometil-4-nitrofenolo (150 mg, 0.8 mmol) in MeCN (20 mL) è stata posta a riflusso del solvente ed in agitazione per 72 h. La miscela è stata quindi filtrata sottovuoto e lavata più volte con MeCN. Dalle analisi termogravimetriche si stima una percentuale di caricamento pari a 3.0 %p/p.

Sintesi di HNT-17 tramite approccio bottom up

In un pallone monocollo da 50 mL, sono stati dispersi **HNT-23** (440 mg) e **15** (100 mg, 0.4 mmol) in etanolo assoluto (20 mL) in presenza di TFA (250 µL). La dispersione ottenuta è stata posta a riflusso del solvente ed in agitazione per 48 h. La polvere verde ottenuta è stata quindi filtrata sottovuoto e lavata più volte con CH₂Cl₂ ed essiccata a 60 °C per una notte. Dalle analisi termogravimetriche si stima una percentuale di caricamento minore dell'1.0 %p/p.

Sintesi di HNT-24

In un pallone, in condizioni inerti, sono stati solubilizzati FeCl₃ (135 mg, 0.83 mmol) e FeCl₂·4H₂O (80 mg, 0.40 mmol) in acqua (5 mL). La soluzione è stata posta in agitazione a temperature ambiente per 20 min. Successivamente, la temperatura è stata aumentata a 80

°C ed è stato aggiunto **HNT-17** (500 mg). Dopo 30 min, è stata aggiunta NH_3 (2 mL) e la reazione è stata lasciata ad agitare ad 80 °C per una notte. Si ottiene una polvere marrone che è stata filtrata sottovuoto e lavata ripetutamente con acqua, metanolo e CH_2Cl_2 .

Sintesi di Ht-N₃

In un pallone monocollo da 50 mL, è stato pesato 1 g di hectorite a cui sono stati aggiunti, sotto atmosfera inerte, 25 mL di toluene anidro e il (3-azidopropil)trimetossi silano (2 mL). La reazione è stata lasciata in agitazione e a riflusso del solvente per 24 h. La miscela è stata filtrata sottovuoto e lavata ripetutamente con metanolo. Dalle analisi effettuate tramite TGA, ne risulta che la percentuale di caricamento dell'organosilano sul prodotto ottenuto era del 3.2 %p/p.

Sintesi di Ht-25

In un pallone monocollo da 50 mL, **Ht-N₃** (200 mg) e **16** (155 mg) sono stati sospesi in una miscela $\text{H}_2\text{O}/^t\text{BuOH}$ (1:1) (16 mL) in presenza di una quantità catalitica di una soluzione $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /ascorbato di sodio (1 M, 1:10 v/v). La dispersione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Successivamente, il solvente è stato quindi rimosso per filtrazione; la polvere è stata lavata ripetutamente con acqua e CH_2Cl_2 ottenendo una polvere verde. Dalle analisi termogravimetriche si stima una percentuale di caricamento pari a 12 %p/p.

Sintesi di HNT-27

In un pallone da 10 mL, il nanomateriale **HNT-26** (40 mg) è stato disperso in CH_2Cl_2 (1 mL) e successivamente sono stati aggiunti 10 μL di BBr_3 . La dispersione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. Trascorso questo tempo, la miscela è stata raccolta mediante centrifuga e lavata più volte con metanolo.

Sintesi di HNT-28

In un pallone da 10 mL, è stato disperso **HNT-28** (50 mg) in MeCN (2.5 mL); successivamente è stata aggiunta una soluzione di PNA in H_2O (2 mg mL^{-1} , 0.5 mL). La dispersione ottenuta è stata lasciata ad agitare per 18 h a temperatura ambiente. Successivamente, la miscela di reazione è stata centrifugata e la polvere ottenuta è stata lavata più volte con MeCN ed infine essiccata sotto vuoto per una notte. La quantità di PNA nella soluzione surnatante è stata valutata mediante spettrofotometria UV-vis a 266 nm. La

percentuale di caricamento del PNA in **HNT-28** stimata tramite analisi termogravimetriche è in accordo con le misure UV-vis ed è pari al 2.0 %p/p.

Sintesi di HNT-30a-c

HNT-N₃ (100 mg), **29a-c** (5 mg), CuSO₄ × 5 H₂O (1 mg) e ascorbato di sodio (1.5 mg) sono stati omogenizzati e introdotti in una provetta da microonde insieme ad un'ancoretta magnetica. Successivamente, sono stati aggiunti 2 mL di una miscela H₂O/^tBuOH (1:1) e la dispersione è stata sottoposta a ultrasuoni per circa 1 min. La reazione è stata condotta a 100 °C, in costante agitazione, per 10 min, impostando una potenza iniziale dello strumento di 80 W. La miscela di reazione è stata centrifugata e lavata più volte con acqua, CH₂Cl₂ e metanolo. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA dei diversi prodotti è di circa 1.0 %p/p.

Sintesi di 31

In un pallone bicollo da 100 mL, è stato disciolto il pirrolo-2-carbossialdeide (4 g, 42 mmol, 1.0 eq.) in metanolo (40 mL). In seguito, si sono aggiunti il dietilmalonato (6.38 mL, 42 mmol, 1.0 eq.), l'acetato di sodio (3.52 g, 42 mmol, 1.0 eq.) e la metilammina idrocloruro (2.84 g, 42 mmol, 1.0 eq.). La reazione è stata lasciata ad agitare per 3 h a temperatura ambiente. Successivamente, alla miscela sono stati aggiunti brina (40 mL) e acqua (60 mL). Si è quindi estratto con CH₂Cl₂ per tre volte e la fase organica ottenuta è stata anidrificata con MgSO₄. Dopo aver rimosso il solvente a pressione ridotta, il residuo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica [SiO₂, CH₂Cl₂] per ottenere **31** (5.9 g) come un olio arancione con una resa del 60%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.290-1.394 (6H, m), 4.276-4.384 (4H, m), 6.346-6.368 (1H, m), 6.746-6.765 (1H, m), 7.106-7.125 (1H, m), 7.690 (1H, s), 11.414 (1H, s).

Sintesi di 32

In un pallone tricollo da 250 mL, è stata disciolta la 4-idrossibenzaldeide (4 g, 32.8 mmol, 1.0 eq.) in MeCN anidro (150 mL). Successivamente, si è aggiunto il propargilbromuro (4.34 mL, 48.8 mmol, 1.5 eq.) e il carbonato di potassio (5 g, 36.2 mmol, 1.1 eq.). La reazione è stata lasciata ad agitare in condizioni di riflusso del solvente per 2 h. Dopo aver raffreddato la soluzione a temperatura ambiente, il carbonato di potassio è stato filtrato e lavato con acetonitrile. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta, ottenendo **32** come un solido giallo (5 g) con una resa del 95%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 2.588-2.600 (1H, t, 2.4 Hz), 4.805-4.811 (2H, d, 2.4 Hz), 7.107-7.129 (2H, d, 8.8 Hz), 7.875-7.897 (2H, d, 8.8 Hz), 9.931 (1H, s).

Sintesi di **33**

In un pallone da 100 mL, in condizioni inerti, sono stati disciolti **31** (2.2 g, 9.3 mmol, 3.0 eq.) e **32** (0.5 g, 3.1 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 anidro (30 mL). Successivamente si aggiunge l'acido p-toluensulfonico (4%, 88 mg, 0.51 mmol) e la soluzione viene lasciata ad agitare per una notte a circa 30 °C. Dopo aver aggiunto una soluzione di bicarbonato di sodio saturo alla miscela di reazione, si è estratto con CH_2Cl_2 per tre volte. La fase organica viene anidrificata con MgSO_4 e il solvente viene evaporato a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica [SiO_2 , Esano/EtOAc (80:20, v/v)] per ottenere **33** (40 mg) come un solido con una resa del 2.1%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.244-1.323 (12 H, m), 2.511-2.523 (1H, t, 2.4 Hz), 4.190-4.257 (8H, m), 4.680-4.686 (2H, d 2.4 Hz), 5.494 (1H, s), 6.091-6.107 (2H, dd, 2.4 Hz, 4 Hz), 6.673-6.688 (2H, dd, 2.4 Hz, 3.6 Hz), 6.963-6.984 (2H, d, 8.4 Hz), 7.174-7.195 (2H, d, 8.4 Hz), 7.582 (2H, s), 11.191 (2H, s).

Sintesi di **34**

In un pallone da 25 mL, in condizioni inerti, è stato disciolto **33** (40 mg, 0.06 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 anidro (5 mL). In seguito è stata aggiunta una sospensione di 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone (DDQ) (15 mg, 0.06 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 anidro (1 mL). La miscela viene lasciata ad agitare per 2 h a temperatura ambiente. Dopo aver rimosso il solvente a pressione ridotta, il residuo è stato disciolto in CH_2Cl_2 anidro (10 mL) in condizioni inerti. Si aggiunge quindi la trietilammina (100 μL , 0.7 mmol, 12 eq.) e si lascia ad agitare per 30 min a temperatura ambiente. Successivamente, si aggiunge goccia a goccia il trifluoruro di boro eterato (150 μL , 1.2 mmol, 20 eq.) e si pone la reazione a riflusso del solvente per 2 h. Si aggiungono quindi NaOH (1 M, 10 mL) e HCl (1 M, 10 mL) per regolare il pH della soluzione a ~6. Si è estratto con CH_2Cl_2 per tre volte e la fase organica è stata anidrificata con MgSO_4 . Dopo aver rimosso il solvente a pressione ridotta, il residuo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica [SiO_2 , CH_2Cl_2 /EtOAc (99:1, v/v)] per ottenere **34** (15 mg) come un solido verde con una resa del 40%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.318-1.395 (12H, dt, 7.2 Hz, 16.4 Hz), 2.596-2.608 (1H, t, 2.4 Hz), 4.337-4.391 (8H, q, 7.2 Hz), 4.800-4.806 (2H, d, 2.4 Hz), 6.791-6.802 (2H, d, 4.4

Hz), 6.928-6.939 (2H, d, 4.4 Hz), 7.128-7.150 (2H, dd, 2.0 Hz, 6.8 Hz), 7.486-7.508 (2H, dd, 2.0 Hz, 6.8 Hz), 8.220 (2H, s).

Sintesi di HNT-35

HNT-N₃ (100 mg), **34** (5 mg), CuSO₄ × 5 H₂O (1 mg) e ascorbato di sodio (1.5 mg) sono stati pestati tramite mortaio e introdotti in una provetta da microonde. Successivamente, sono stati aggiunti 2 mL di una miscela H₂O/DMF (1:1) e la dispersione è stata sottoposta a ultrasuoni. La reazione è stata condotta a 100 °C, sotto costante agitazione, per 10 minuti, impostando una potenza iniziale dello strumento di 80 W. La miscela è stata filtrata sottovuoto e lavata più volte con acqua, CH₂Cl₂ e MeCN. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA del prodotto ottenuto è del 3.4 %p/p.

Sintesi di 38

In un pallone tricollo da 250 mL, in condizioni inerti, sono stati disciolti il 2,4-dimetilpirrolo (1.28 mL, 12.4 mmol, 2.0 eq.) e **32** (1 g, 6.2 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ anidro (150 mL). Dopo aver aggiunto 3 gocce di acido trifluoroacetico, si è lasciata la reazione ad agitare per una notte a temperatura ambiente. Successivamente, alla miscela di reazione è stato aggiunto il tetracloro-1,4-benzochinone (1.52 g, 6.2 mmol, 1.0 eq.) e si è lasciato ad agitare a temperatura ambiente per 45 min. In seguito, sono stati aggiunti sequenzialmente la trietilammia (6 mL, 43.1 mmol, 7.0 eq.) e il trifluoruro di boro eterato (6 mL, 48.6 mmol, 8.0 eq.). Dopo 30 min, alla miscela di reazione si aggiunge acqua e si estrae con CH₂Cl₂. La fase organica è stata quindi anidrificata con MgSO₄ ed evaporata a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica [SiO₂, CHCl₃/Esano (2:1 v/v)] ottenendo **38** (250 mg) come un solido viola con una resa del 11%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.421 (6H, s), 2.549-2.561 (7H, m), 4.755-4.761 (2H, d, 2.4 Hz), 5.975 (2H, s), 7.076-7.098 (2H, dd, 2.4 Hz, 6.8 Hz), 7.185-7.207 (2H, dd, 2.4 Hz, 6.8 Hz).

Sintesi di 39

In un pallone bicollo da 50 mL, in condizioni inerti, dopo aver disciolto **38** (80 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ anidro (25 mL), si è aggiunta la N-iodosuccinimide (190 mg, 0.84 mmol, 4.0 eq.). La soluzione viene lasciata ad agitare per 2 h a temperatura ambiente. Dopo aver rimosso il solvente a pressione ridotta, il residuo ottenuto è stato purificato tramite

colonna cromatografica [SiO_2 , CH_2Cl_2 /Esano (1:1, v/v)] per ottenere **39** (95 mg) come un solido rosso con una resa del 71%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.435 (6H, s), 2.563-2.575 (1H, t, 2.4 Hz), 2.639 (6H, s), 4.777-4.783 (2H, d, 2.4 Hz), 7.104-7.126 (2H, d, 8.8 Hz), 7.154-7.176 (2H, d, 8.8 Hz).

Sintesi di HNT-40

HNT-N₃ (50 mg), **39** (10 mg), $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (1 mg) e ascorbato di sodio (1.5 mg) sono stati pestati tramite mortaio e introdotti in una provetta da microonde. Successivamente, sono stati aggiunti 2 mL di una miscela $\text{H}_2\text{O}/^t\text{BuOH}$ (1:1) e la dispersione è stata sottoposta a ultrasuoni. La reazione è stata condotta a 100 °C, sotto costante agitazione, per 10 minuti, impostando una potenza iniziale dello strumento di 80 W. La miscela è stata filtrata sottovuoto e lavata più volte con acqua, CH_2Cl_2 e DMF. La percentuale di caricamento stimata dalla TGA del prodotto ottenuto è del 6.1 %p/p.

4.4. Titolazione di HNT-2 con ioni metallici

L'interazione tra gli ioni Co^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} e il nanomateriale **HNT-2** è stata studiata mediante titolazione spettrofluorimetrica a due diverse temperature (20 °C e 37 °C). Ad una dispersione in metanolo di **HNT-2** (0.1 mg mL^{-1} , 10 mL) sono stati aggiunti volumi crescenti (0-750 μL) di una soluzione acquosa di ioni Co^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} (10^{-4} M). Gli spettri sono stati acquisiti in intervalli di lunghezza d'onda compresi tra 550 e 750 nm, eccitando le varie dispersioni con $\lambda_{\text{ex}}=410$ nm.

4.5. Studi dell'attività fotodinamica

Studio dell'attività fotodinamica di HNT-2 e HNT-4

L'attività fotodinamica dei nanomateriali **HNT-2** e **HNT-4** è stata determinata utilizzando una tecnica di rilevamento indiretto dell'ossigeno singoletto. La generazione di ROS è stata valutata utilizzando il reattivo 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) come scavenger di $^1\text{O}_2$ sotto irradiazione di luce visibile (650 nm). Ad una soluzione di DPBF (50 μM , 2 mL, DMSO) sono state aggiunte diverse quantità delle dispersioni di **HNT-2** e **HNT-4** (rispettivamente 1.0 mg e 0.2 mg, corrispondenti ad una concentrazione di 0.02 mM di PPIX e **3**). Le dispersioni ottenute sono state trasferite in un tubo di quarzo e agitate sotto irradiazione laser a una lunghezza d'onda di 650 nm (200 mW). Ad un tempo prestabilito, la dispersione è stata centrifugata e il surnatante è stato analizzato mediante spettroscopia UV-

vis. La produzione di $^1\text{O}_2$ è stata monitorata per 20 min di irradiazione seguendo la diminuzione dello spettro di assorbimento del DPBF a 413 nm. Pertanto, le rese quantiche dell'ossigeno singoletto per ciascun nanomateriale sono state calcolate utilizzando il blu di metilene (10^{-5} M) come riferimento.

Studio dell'attività fotodinamica di HNT-9

L'attività fotodinamica di **HNT-9** è stata determinata utilizzando una tecnica di rilevamento indiretto dell'ossigeno singoletto. La generazione di ROS è stata valutata utilizzando l'acido urico come scavenger di $^1\text{O}_2$ sotto irradiazione di luce visibile (365 nm). Ad una soluzione acquosa di acido urico (50 μM , 2 mL) sono stati aggiunti 2.4 mg di **HNT-9**, (corrispondenti ad una concentrazione di 14 μM di **8**). La dispersione ottenuta è stata trasferita in una cuvetta di quarzo e la si è posta in agitazione durante l'irradiazione LED ad una lunghezza d'onda di 365 nm (740 mW). A dei tempi prestabiliti, la dispersione è stata centrifugata e il surnatante è stato analizzato mediante spettroscopia UV-vis. Il LED è stato acquistato da Prizmatix Ltd (Holon, Israele).

Studio dell'attività fotodinamica di HNT-27

L'attività fotodinamica di **HNT-27** è stata determinata utilizzando una tecnica di rilevamento indiretto dell'ossigeno singoletto. La generazione di ROS è stata valutata utilizzando l'1,3-difenilisobenzofurano come scavenger di $^1\text{O}_2$ sotto irradiazione di luce visibile (515 nm). Ad una soluzione di DPBF (50 μM , 2 mL, DMSO) è stato aggiunto 1.0 mg di **HNT-27**. La dispersione ottenuta è stata trasferita in una cuvetta di quarzo e la si è posta ad agitare durante l'irradiazione LED ad una lunghezza d'onda di 515 nm (150 mW). A dei tempi prestabiliti, la dispersione è stata centrifugata e il surnatante è stato analizzato mediante spettroscopia UV-vis. Il LED è stato acquistato da Prizmatix Ltd (Holon, Israele).

Studio dell'attività fotodinamica di 39

La generazione di ROS è stata valutata utilizzando l'acido 9,10-antracenedil-bis(metilene)dimalonico (ABDA) come scavenger di $^1\text{O}_2$ sotto irradiazione di luce visibile (532 nm). A 980 μL di DMSO sono stati aggiunti 10 μL di ABDA (1 μM , DMSO) e 10 μL di **39** (5 μM , DMSO). La soluzione ottenuta è stata trasferita in una cuvetta di quarzo e irradiata tramite un laser a una lunghezza d'onda di 532 nm (50 mW). A dei tempi prestabiliti, la soluzione è stata analizzata mediante spettroscopia di fluorescenza eccitando a $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm. È stata anche studiata la fotodegradazione di **39** in assenza di ABDA. A 990 μL di DMSO

sono stati aggiunti 10 μL di **39** (5 μM , DMSO). La soluzione ottenuta è stata trasferita in un cuvetta di quarzo e irradiata tramite un laser a una lunghezza d'onda di 532 nm (50 mW). A dei tempi prestabiliti, la soluzione è stata analizzata mediante spettroscopia di fluorescenza eccitando a $\lambda_{\text{ex}} = 533$ nm.

4.6. Studi *in vitro*

Linee cellulari

Le cellule HL-60R sono state poste nel terreno di cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 al quale è stato aggiunto 10% di siero fetale bovino inattivato al calore, 2 mM di L-glutammina, 100 unità/mL di penicillina e 100 $\mu\text{g/mL}$ di streptomicina (tutti i reagenti provenivano da HyClone Europe Ltd., Cramlington, Regno Unito) in un'atmosfera umidificata a 37 °C con il 5% di CO_2 . Le cellule HL-60 sono state ottenute da ATCC® (CCL-240, Rockville, MD, USA) e sono state selezionate per la multifarmaco resistenza (MDR) mediante esposizione a concentrazioni gradualmente crescenti di doxorubicina.

Test di vitalità cellulare

Le cellule sono state seminate su piastre a 12 pozzetti con una densità di 200.000 cellule/pozzetto e incubate per una notte a 37 °C. Dopo 24 h, al tempo 0, il mezzo è stato sostituito con uno nuovo e incubato con **HNT-2** o **HNT-4**.

Dopo 24 h di esposizione, le cellule sono state irradiate con il laser per 5 min e incubate per altre 4 h. Successivamente sono state seminate su piastre a 96 pozzetti in triplicato e incubate con 15 μL della soluzione commerciale Promega Corp. (Madison, WI, USA) contenente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) e fenazina etosolfato. Utilizzando un lettore di micropiastre (iMark Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), è stata valutata la bioriduzione del colorante MTS misurando l'assorbanza di ciascun pozzetto a 490 nm. La citotossicità è stata espressa come percentuale dell'assorbanza misurata in relazione a quella delle cellule di controllo.

Test di colorazione con arancio acridina

Le sospensioni cellulari sono state raccolte mediante centrifugazione, lavate tre volte con tampone fosfato PBS e quindi risospese in 25 μL di colorante (100 $\mu\text{g/mL}$ di arancio acridina preparata in PBS e miscelata delicatamente) per 10 min. Esse sono state lavate per tre volte con PBS e immediatamente analizzate utilizzando un microscopio a fluorescenza con un ingrandimento di 40 $\times$.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati sperimentali è stata effettuata utilizzando il *software* di analisi statistica Past 4.03. Tutti i test sono stati eseguiti in duplicato o triplicato e i dati sono stati analizzati utilizzando un'analisi della varianza a una via (ANOVA). I valori di differenza significativa sono stati testati utilizzando il test di Tukey con un intervallo di confidenza del 95% ($p < 0,05$). I risultati sono mostrati sotto forma di media $\pm$ deviazione standard.

4.7. Preparazione dei film di chitosano

In delle vial sono stati dispersi il chitosano al 2 %p/p (200 mg) e HNT, **HNT-2** o **HNT-4** (10 mg) in acido acetico al 3 %v/v e sono stati lasciati ad agitare per una notte. Le miscele sono state quindi versate in diverse piastre di Petri in vetro a 60 °C per un massimo di 24 h, al fine di far evaporare la soluzione acquosa di acido acetico fino ad ottenere un peso costante e ottenere così i film. I biofilm essiccati contenevano il 5 %p/p di *nanofiller*.

4.8. Cinetiche di rilascio

Cinetica di rilascio della vancomicina da HNT-10

Il rilascio delle molecole di vancomicina dal nanomateriale **HNT-10** è stato effettuato con il metodo della membrana di dialisi. Circa 10 mg del campione sono stati dispersi in 1 mL di acqua deionizzata e trasferiti in una membrana di dialisi sigillata (MWCO 12-14000 con un diametro di 21.5 mm; Medicell International Ltd, Londra, Regno Unito). Successivamente, la membrana è stata posta in un pallone contenente 9 mL di soluzione di rilascio (tampone fosfato (50 mM) pH 7.4 e 5.5) e agitata a 37 °C. Ad intervalli di tempi prestabiliti, è stato prelevato 1 mL del mezzo di rilascio e analizzato mediante misure UV-vis alla lunghezza d'onda pari a 278 nm. Per garantire sempre le medesime condizioni, 1 mL di soluzione fresca è stata sostituita con quella prelevata. Le quantità totali di farmaco rilasciato (F_t) sono state calcolate come segue:

$$F_t = V_m C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_a C_i \quad (\text{Eq. 12})$$

dove V_m e C_t sono il volume e la concentrazione delle molecole di vancomicina al tempo t . V_a è il volume del campione prelevato e C_i è la concentrazione delle molecole di vancomicina al tempo i ($i < t$).

Cinetica di rilascio del PNA da HNT-28

Il rilascio delle molecole di PNA dal nanomateriale **HNT-28** è stato effettuato con il metodo della membrana di dialisi. Circa 10 mg del campione sono stati dispersi in 1 mL di acqua deionizzata e trasferiti in una membrana da dialisi sigillata (MWCO 12-14000 con un diametro di 21.5 mm; Medicell International Ltd, Londra, Regno Unito). Successivamente, la membrana è stata posta in un pallone contenente 9 mL di soluzione di rilascio e agitata a 37 °C. Ad intervalli di tempi prestabiliti, è stato prelevato 1 mL del mezzo di rilascio e analizzato mediante misure UV-*vis* alla lunghezza d'onda pari a 266 nm. Per garantire sempre le medesime condizioni, 1 mL di soluzione fresca è stata sostituita con quella prelevata. Le quantità totali di farmaco rilasciato (F_t) sono state calcolate come segue:

$$F_t = V_m C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_a C_i \quad (\text{Eq. 12})$$

dove V_m e C_t sono 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 ($i < t$).

4.9. Studio delle proprietà alocromatiche

In un pallone sono stati introdotti una soluzione in CH_2Cl_2 del tensioattivo P_{123} (2.5 mg mL^{-1} , 120 mL) e una dispersione in CH_2Cl_2 di **HNT-17** (2.5 mg mL^{-1} , 2 mL). Il tutto è stato lasciato ad agitare a temperatura ambiente per 15 min. Successivamente, il solvente è stato evaporato tramite rotavapor ottenendo una sostanza viscosa verde. Il residuo è stato solubilizzato in 5 mL di H_2O bidistillata, utilizzando anche gli ultrasuoni.

Per lo studio delle proprietà alocromatiche del nanomateriale **HNT-17** si è proceduto come segue: in diversi matracci si introducono 0.2 mL della dispersione in H_2O ottenuta e 1.8 mL dei tamponi a diversi pH (2.5, 3.0, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.4). Ognuno di essi viene analizzato tramite spettroscopia UV-*vis* e spettroscopia di fluorescenza.

4.10. Determinazione della percentuale di caricamento di $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ con il metodo del tiocianato

In un pallone, **HNT-24** (50 mg) è stato disperso in acqua regia (5 mL) e posto a riflusso per 2 h. Il surnatante giallo ottenuto è stato raccolto e diluito in un volume finale di 10 mL. Un'aliquota di 0.5 mL è stata aggiunta a 2 mL di una soluzione acquosa di KSCN (0.1 M). La soluzione risultante è stata analizzata mediante spettroscopia UV-*vis* e l'assorbanza del complesso $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ è stata registrata a $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$. La concentrazione di Fe^{3+} è stata

determinata tramite una curva di calibrazione, la quale è stata ottenuta variando la concentrazione di FeCl_3 (0.5 mL, 0.4 – 2 mM) in 2 mL di una soluzione acquosa di KSCN 0.1 M. La curva di calibrazione è stata costruita riportando in grafico l'assorbanza a $\lambda_{\text{max}} = 469$ nm in funzione della concentrazione di Fe^{3+} .

4.11. Studio dell'attività chemodinamica

Ossidazione catalitica di TMB

Il radicale $\cdot\text{OH}$ generato dalla decomposizione catalitica dell' H_2O_2 da parte del nanomateriale **HNT-24** è stato rilevato con un metodo colorimetrico utilizzando il reattivo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Sono state preparate diverse dispersioni di **HNT-24** (0.5, 1.0, 2.0 e 4.0 mg mL^{-1}) in tampone HAc-NaAc (50 mM, pH 5.5) in presenza di TMB (1.5 mM) e H_2O_2 (25 mM). Le dispersioni ottenute sono state incubate al buio in costante agitazione a temperatura ambiente per 60 min. A dei tempi prestabiliti, le dispersioni sono state centrifugate e il surnatante è stato analizzato mediante spettroscopia UV-vis registrando il valore di assorbanza a 655 nm. Successivamente, è stato studiato l'effetto della concentrazione di H_2O_2 sulla produzione di $\cdot\text{OH}$. Diverse concentrazioni (2.5, 5.0, 7.5, 12.5 e 25.0 mM) di H_2O_2 sono state aggiunte alle dispersioni contenenti TMB (1.5 mM) e **HNT-24** (2 mg mL^{-1}); l'assorbanza a 655 nm è stata quindi registrata entro 60 min con la stessa procedura descritta sopra. Si è riscontrato che la formazione di $\cdot\text{OH}$ segue la cinetica di Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 13})$$

Dove V è la velocità di formazione di $\cdot\text{OH}$, V_{max} è la velocità massima della reazione, K_m è la costante di Michaelis-Menten e $[S]$ è la concentrazione di H_2O_2 . Si può anche ottenere il grafico dei doppi reciproci, o di Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad (\text{Eq. 14})$$

Infine, è stato studiato l'effetto del pH sulla produzione di $\cdot\text{OH}$ tramite l'uso di tamponi a diverso pH (3.5, 4.5, 5.5, 7.0) per preparare dispersioni contenenti **HNT-24** (4 mg mL^{-1}), H_2O_2 (25 mM) e TMB (1.5 mM). Le dispersioni ottenute sono state incubate al buio sotto agitazione a temperatura ambiente per 60 min ed è stato registrato il valore di assorbanza a 655 nm come descritto precedentemente.

Degradazione catalitica di MB

In una provetta sono stati miscelati MB (50 μM) e **HNT-24** (0.1 mg mL⁻¹) in acqua senza o con l'aggiunta di H₂O₂ (10 mM). Le dispersioni sono state incubate al buio per tempi diversi, la polvere è stata depositata sul fondo con un magnete e la variazione di assorbanza del MB a 652 nm è stata monitorata con uno spettrofotometro UV-vis.

4.12. Studio di *sensing* del glutatione

L'attività di *sensing* del glutatione della molecola **34** è stata determinata analizzando le proprietà spettroscopiche di assorbimento ed emissione di una soluzione di **34** (10 μM) in assenza e in presenza di GSH (1 mM) in una miscela di tampone fosfato/MeCN (4:1, v/v, pH = 7.2, 37 °C). Dopo 30 min di incubazione al buio a 37 °C, la soluzione è stata analizzata tramite spettroscopia UV-vis e di fluorescenza eccitandola a due diverse lunghezze d'onda, 556 nm e 590 nm, confermando la presenza del nuovo derivato formatosi in seguito alla reazione tra **34** e il glutatione.

Invece, l'attività di *sensing* del glutatione del nanomateriale **HNT-35** è stata determinata analizzando le proprietà spettroscopiche di emissione ottenute eccitando a 556 nm una dispersione di **HNT-35** (0.6 mg mL⁻¹, [**34**] = 30 μM) in assenza e in presenza di GSH a diverse concentrazioni (da 0.1 mM a 0.1 M) in una miscela di tampone fosfato/MeCN (4:1, v/v, pH = 7.2, 37 °C).

5. Curriculum studiorum

Elenco delle pubblicazioni

M. Massaro, F. Leone, A. Nicosia, G. Lazzara, G. Cavallaro, G. M. L. Messina, C. Viseras, R. Sanchez-Espejo, M. Notarbartolo, R. Puglisi, P. G. Mineo, R. de Melo Barbosa, S. Riela, Protoporphyrin-grafted halloysite nanotubes for boosted photodynamic activity in chitosan nanocomposite films, *Appl. Clay Sci.* **2025**, 276, 107942.

M. Massaro, F. Leone, F. M. Raymo, R. de Melo Barbosa, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras, R. Noto, S. Riela, Design of halloysite nanotube-based nanomaterials for theranostic applications: fluorescent probes and chemodynamic activity, *J. Mater. Chem. B* **2025**, 13, 9407-9417. **Cover of the issue**

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 Appl. Nano Mater.* **2025**, 8, 12775–12783. **Cover of the issue**

A. Mancuso, M. Massaro, F. Leone, P. M. Bonaccorsi, G. Compagnini, C. M. A. Gangemi, F. Puntoriero, M. Ribagorda, V. Scardaci, C. Viseras, S. Riela, A. Barattucci, Glucosyl OPE-modified halloysite nanotubes and their potential as phototherapy agents for bacterial infections, *Surf. Interf.* **2025**, 62, 106207

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 the issue**

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.

Comunicazioni a congressi

13-18 Luglio 2025

XVIII ICC, AIPEA – International Clay Conference, Dublino, Irlanda.

Comunicazione Oral: F. Leone, S. Bagherpour, R. de Melo Barbosa, M. Massaro, R. Noto, L. Pérez-Garcia, F.M. Raymo, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras, S. Riela, “EXPLORING HALLOYSITE NANOMATERIALS FOR POTENTIAL THERANOSTIC APPLICATIONS”

10 Luglio 2025

Inhouse Meeting IN²UB 2025, Barcellona, Spagna.

Comunicazione Poster: F. Leone, S. Bagherpour, R. de Melo Barbosa, M. Massaro, R. Noto, L. Pérez-Garcia, F.M. Raymo, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras, S. Riela, “HALLOYSITE BASED NANOMATERIALS FOR POTENTIAL THERANOSTIC APPLICATION”.

1-3 Dicembre 2024

Congresso Congiunto delle Sezioni Sicilia e Calabria 2024 (SCISiCa2024), Messina.

Comunicazione Poster: F. Leone, M. Massaro, F.M. Raymo, R. Sánchez-Espejo, R. de Melo Barbosa, C. Viseras-Iborra, S. Riela, “DESIGN AND SYNTHESIS OF A MAGNETIC NANOMATERIAL BASED ON HALLOYSITE FOR POTENTIAL THERANOSTIC APPLICATION”

26-30 Agosto 2024

SCI2024 XXVIII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, Milano.

Comunicazione Poster: F. Leone, F. Cardano, G. Cinà, A. P. Falanga, A. Fin, E. Licandro, M. Massaro, G. Oliviero, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras-Iborra, S. Riela, “DEVELOPMENT OF NANOMATERIALS BASED ON HALLOYSITE/NDIs DERIVATIVES AS THERANOSTIC AGENTS”.

- 4-9 Febbraio 2024 European-Winter Physical Organic Chemistry (E-WISPOC24), Bressanone.
Comunicazione Poster: F. Leone, M. Massaro, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Notarbartolo, S. Riela, “COVALENT MODIFICATION OF HALLOYSITE FOR POTENTIAL PHOTODYNAMIC THERAPY”
- 11-12 Dicembre 2023 Congresso interregionale delle Sezioni Sicilia e Calabria della Società Chimica Italiana (SciSiCa 2023), Palermo.
Comunicazione Flash: F. Leone, M. Massaro, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Notarbartolo, S. Riela, “MODIFICATION OF HALLOYSITE CLAY MINERAL FOR POTENTIAL APPLICATION IN PHOTODYNAMIC THERAPY”
- 13-15 Novembre 2023 Merck Young Chemists' Symposium 2023 (MYCS 2023), Rimini.
Comunicazione Oral: F. Leone, M. Prato, M. Massaro, G. Cavallaro, G. Lazzara, A. Silvestri, S. Riela, “HALLOYSITE – PROTOPORPHYRIN IX A PROMISING NANOMATERIAL FOR POTENTIAL PHOTODYNAMIC THERAPY”.
- 16-18 Ottobre 2023 Autumn Meeting for Young Chemists in Biomedical Sciences (AMYC-BIOMED 2023), Firenze.
Comunicazione Poster: F. Leone, M. Massaro, F. M. Raymo, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras-Iborra, S. Riela, “SYNTHESIS OF FLUORESCENT NANOMATERIALS BASED ON HALLOYSITE FOR POTENTIAL FLUORESCENCE IMAGING”.
- 10-14 Settembre 2023 XLI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, Roma.

Comunicazione Poster: F. Leone, M. Massaro, F. M. Raymo, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras-Iborra, S. Riela, “DESIGN AND SYNTHESIS OF NANOMATERIALS BASED ON HALLOYSITE WITH HALOCROMIC PROPERTIES”.

27 Febbraio 2023

WORKSHOP: I chimici per le biotecnologie, Napoli.

Comunicazione Poster: F. Leone, M. Massaro, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Notarbartolo, A. Silvestri, M. Prato, S. Riela, “SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOMATERIALS BASED ON HALLOYSITE MODIFIED WITH PORPHYRINS FOR BIOLOGICAL PURPOSES”.

12 Gennaio 2023

First STeBICeF Young Researcher Workshop, Palermo.

Comunicazione Poster: F. Leone, M. Massaro, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Notarbartolo, A. Silvestri, M. Prato, S. Riela, “FUNCTIONALIZATION OF HALLOYSITE WITH PROTOPORPHYRIN IX AS POTENTIAL SYSTEM FOR PHOTODYNAMIC THERAPY”.

Partecipazioni a scuole

4-9 Febbraio 2024

European-Winter Physical Organic Chemistry (E-WISPOC24), Bressanone.

Emergent Multi-Functional and Complex Systems

Visiting researcher

21-28 Febbraio 2023

Laboratori strumentali dell'Università di Napoli Federico II
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”.

6. Bibliografia

- (1) Ahmed, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (17), 928-934. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.010>.
- (2) Duan, H.; Iagaru, A.; Aparici, C. M. Radiotheranostics - Precision Medicine in Nuclear Medicine and Molecular Imaging. *Nanotheranostics* **2022**, *6* (1), 103-117, Review. DOI: 10.7150/ntno.64141.
- (3) Wang, X.; Ding, Q.; Groleau, R. R.; Wu, L.; Mao, Y.; Che, F.; Kotova, O.; Scanlan, E. M.; Lewis, S. E.; Li, P.; et al. Fluorescent Probes for Disease Diagnosis. *Chem. Rev.* **2024**, *124* (11), 7106-7164. DOI: 10.1021/acs.chemrev.3c00776.
- (4) Ji, Y.; Jones, C.; Baek, Y.; Park, G. K.; Kashiwagi, S.; Choi, H. S. Near-infrared fluorescence imaging in immunotherapy. *Adv. Drug Del. Rev.* **2020**, *167*, 121-134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.012>.
- (5) Raymo, F. M. Digital Processing and Communication with Molecular Switches. *Adv. Mater.* **2002**, *14* (6), 401-414. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(20020318\)14:6<401::AID-ADMA401>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4095(20020318)14:6<401::AID-ADMA401>3.0.CO;2-F).
- (6) Fitzmaurice, O.; Bartkowski, M.; Giordani, S. Molecular Switches—Tools for Imparting Control in Drug Delivery Systems. *Front. Chem.* **2022**, *Volume 10 - 2022*, Review. DOI: 10.3389/fchem.2022.859450.
- (7) Zhang, Y.; Tang, S.; Thapaliya, E. R.; Sansalone, L.; Raymo, F. M. Fluorescence activation with switchable oxazines. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (64), 8799-8809, 10.1039/C8CC03094D. DOI: 10.1039/C8CC03094D.
- (8) Bagherpour, S.; Pérez-García, L. Recent advances on nanomaterial-based glutathione sensors. *J. Mater. Chem. B.* **2024**, *12* (34), 8285-8309, 10.1039/D4TB01114G. DOI: 10.1039/D4TB01114G.
- (9) Forman, H. J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30* (1-2), 1-12. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006 From NLM.
- (10) Rae, C. D.; Williams, S. R. Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* **2017**, *529*, 127-143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.022>.
- (11) Hanko, M.; Švorc, L.; Planková, A.; Mikuš, P. Overview and recent advances in electrochemical sensing of glutathione – A review. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1062*, 1-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.052>.
- (12) Bagherpour, S.; Vázquez, P.; Redondo-Horcajo, M.; Suárez, T.; Plaza, J. A.; Pérez-García, L. Water-Dispersible BODIPY Multifunctionalized Silicon Oxide Nanoparticles for Glutathione Sensing. *Part. Part. Syst. Char.* **2024**, *41* (10), 2400134. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppsc.202400134>.
- (13) Bagherpour, S.; Vázquez, P.; Duch, M.; Pablo Aguil, J.; Plaza, J. A.; Redondo-Horcajo, M.; Suárez, T.; Pérez-García, L. Silicon oxide microchips functionalized with fluorescent probes for quantitative real-time glutathione sensing in living cells. *J. Mater. Chem. B.* **2025**, *13* (5), 1630-1642, 10.1039/D4TB01859A. DOI: 10.1039/D4TB01859A.

- (14) Peng, F.; Ai, X.; Bu, X.; Zhao, Z.; Gao, B. Visualizing Mitochondrial Membrane Potential with FRET Probes: Integrating Fluorescence Intensity Ratio and Lifetime Imaging. *J. Fluoresc.* **2025**, *35* (7), 5593-5601. DOI: 10.1007/s10895-024-03929-w.
- (15) Mazza, M. M. A.; Cardano, F.; Baker, J. D.; Giordani, S.; Raymo, F. M. Switchable Coumarins for Ratiometric pH Sensing. *Front. Mater.* **2021**, *Volume 8 - 2021*, Original Research. DOI: 10.3389/fmats.2021.630046.
- (16) Izumi, H.; Torigoe, T.; Ishiguchi, H.; Uramoto, H.; Yoshida, Y.; Tanabe, M.; Ise, T.; Murakami, T.; Yoshida, T.; Nomoto, M.; et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **2003**, *29* (6), 541-549. DOI: 10.1016/S0305-7372(03)00106-3 (accessed 2025/09/25).
- (17) Hou, J.-T.; Ren, W. X.; Li, K.; Seo, J.; Sharma, A.; Yu, X.-Q.; Kim, J. S. Fluorescent bioimaging of pH: from design to applications. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (8), 2076-2090, 10.1039/C6CS00719H. DOI: 10.1039/C6CS00719H.
- (18) Tang, S.; Zhang, Y.; Thapaliya, E. R.; Brown, A. S.; Wilson, J. N.; Raymo, F. M. Highlighting Cancer Cells with Halochromic Switches. *ACS Sens.* **2017**, *2* (1), 92-101. DOI: 10.1021/acssensors.6b00592.
- (19) Deng, Y.; Ding, M.; Zhu, L.; Zhang, Y.; Wang, F.; Zhao, L.; Li, J. Near-infrared light-activated ROS generation using semiconducting polymer nanocatalysts for photodynamic-chemodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B.* **2023**, *11* (35), 8484-8491, 10.1039/D3TB00642E. DOI: 10.1039/D3TB00642E.
- (20) Xin, J.; Deng, C.; Aras, O.; Zhou, M.; Wu, C.; An, F. Chemodynamic nanomaterials for cancer theranostics. *J Nanobiotechnology* **2021**, *19* (1), 192. DOI: 10.1186/s12951-021-00936-y From NLM.
- (21) Zhang, C.; Bu, W.; Ni, D.; Zhang, S.; Li, Q.; Yao, Z.; Zhang, J.; Yao, H.; Wang, Z.; Shi, J. Synthesis of Iron Nanometallic Glasses and Their Application in Cancer Therapy by a Localized Fenton Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (6), 2101-2106. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201510031>.
- (22) Wenting Chen, J. L., 1 Caiyun Zheng,1 Que Bai,1 Qian Gao,1 Yanni Zhang,1 Kai Dong,2 Tingli Lu1. Research Progress on Improving the Efficiency of CDT by Exacerbating Tumor Acidification. *Int J Nanomedicine* **2022**, *17*, 2611-2628. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S366187>.
- (23) Wang, Y.; Li, X.; Fang, Y.; Wang, J.; Yan, D.; Chang, B. Degradable Fe₃O₄-based nanocomposite for cascade reaction-enhanced anti-tumor therapy. *RSC Adv.* **2023**, *13* (12), 7952-7962, 10.1039/D3RA00527E. DOI: 10.1039/D3RA00527E.
- (24) Shen, Z.; Liu, T.; Li, Y.; Lau, J.; Yang, Z.; Fan, W.; Zhou, Z.; Shi, C.; Ke, C.; Bregadze, V. I.; et al. Fenton-Reaction-Acceleratable Magnetic Nanoparticles for Ferroptosis Therapy of Orthotopic Brain Tumors. *ACS Nano* **2018**, *12* (11), 11355-11365. DOI: 10.1021/acsnano.8b06201.
- (25) Vivero-Escoto, J. L.; Vega, D. L. Stimuli-responsive protoporphyrin IX silica-based nanoparticles for photodynamic therapy in vitro. *RSC Adv.* **2014**, *4* (28), 14400-14407, 10.1039/C4RA01135J. DOI: 10.1039/C4RA01135J.
- (26) Gunaydin, G.; Gedik, M. E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. *Front. Chem.* **2021**, *Volume 9 - 2021*, Review. DOI: 10.3389/fchem.2021.686303.

- (27) Desgranges, S.; Juzenas, P.; Vasovic, V.; Gederaas, O. A.; Lindgren, M.; Warloe, T.; Peng, Q.; Contino-Pépin, C. Amphiphilic Protoporphyrin IX Derivatives as New Photosensitizing Agents for the Improvement of Photodynamic Therapy. *Biomedicines* **2022**, *10* (2), 423.
- (28) Gu, Y.; Lai, H.; Chen, Z.-Y.; Zhu, Y.; Sun, Z.; Lai, X.; Wang, H.; Wei, Z.; Chen, L.; Huang, L.; et al. Chlorination-Mediated π - π Stacking Enhances the Photodynamic Properties of a NIR-II Emitting Photosensitizer with Extended Conjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (25), e202303476. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.202303476>.
- (29) Lakshmi, V.; Rajeswara Rao, M.; Ravikanth, M. Halogenated boron-dipyrromethenes: synthesis, properties and applications. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (9), 2501-2517, 10.1039/C4OB02293A. DOI: 10.1039/C4OB02293A.
- (30) Gorbe, M.; Costero, A. M.; Sancenón, F.; Martínez-Máñez, R.; Ballesteros-Cillero, R.; Ochando, L. E.; Chulvi, K.; Gotor, R.; Gil, S. Halogen-containing BODIPY derivatives for photodynamic therapy. *Dyes Pigm.* **2019**, *160*, 198-207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.007>.
- (31) Zou, J.; Yin, Z.; Ding, K.; Tang, Q.; Li, J.; Si, W.; Shao, J.; Zhang, Q.; Huang, W.; Dong, X. BODIPY Derivatives for Photodynamic Therapy: Influence of Configuration versus Heavy Atom Effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (38), 32475-32481. DOI: 10.1021/acsami.7b07569.
- (32) Zhao, X.; Liu, J.; Fan, J.; Chao, H.; Peng, X. Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: from molecular design to application. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (6), 4185-4219, 10.1039/D0CS00173B. DOI: 10.1039/D0CS00173B.
- (33) Ormond, A. B.; Freeman, H. S. Effects of substituents on the photophysical properties of symmetrical porphyrins. *Dyes Pigm.* **2013**, *96* (2), 440-448. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.09.011>.
- (34) Wang, X.; Gong, J.; Wang, J.; Zhang, F.; Mao, Z.; Liu, Z. Engineering molecular theranostic probes for antibacterial therapy. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2023**, *167*, 117232. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117232>.
- (35) Solanki, A.; Kim, J. D.; Lee, K. B. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging. *Nanomedicine (Lond)* **2008**, *3* (4), 567-578. DOI: 10.2217/17435889.3.4.567 From NLM.
- (36) Chouly, C.; Pouliquen, D.; Lucet, I.; Jeune, J. J.; Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencaps.* **1996**, *13* (3), 245-255. DOI: 10.3109/02652049609026013.
- (37) Kohler, N.; Sun, C.; Fichtenholtz, A.; Gunn, J.; Fang, C.; Zhang, M. Methotrexate-Immobilized Poly(ethylene glycol) Magnetic Nanoparticles for MR Imaging and Drug Delivery. *Small* **2006**, *2* (6), 785-792. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.200600009>.
- (38) Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14* (14), 2161-2175, 10.1039/B402025A. DOI: 10.1039/B402025A.
- (39) Drago, S. E.; Utzeri, M. A.; Mauro, N.; Cavallaro, G. Polyamidoamine-Carbon Nanodot Conjugates with Bio-reducible Building Blocks: Smart Theranostic Platforms for Targeted

- siRNA Delivery. *Biomacromolecules* **2024**, *25* (2), 1191-1204. DOI: 10.1021/acs.biomac.3c01185.
- (40) Bhumkar, D. R.; Joshi, H. M.; Sastry, M.; Pokharkar, V. B. Chitosan Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers for Transmucosal Delivery of Insulin. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (8), 1415-1426. DOI: 10.1007/s11095-007-9257-9.
- (41) Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Briand, J.-P.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A. Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem. Commun.* **2006**, (11), 1182-1184, 10.1039/B516309A. DOI: 10.1039/B516309A.
- (42) Pantarotto, D.; Singh, R.; McCarthy, D.; Erhardt, M.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes for Plasmid DNA Gene Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (39), 5242-5246. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200460437>.
- (43) Peixoto, D.; Pereira, I.; Pereira-Silva, M.; Veiga, F.; Hamblin, M. R.; Lvov, Y.; Liu, M.; Paiva-Santos, A. C. Emerging role of nanoclays in cancer research, diagnosis, and therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *440*, 213956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213956>.
- (44) Giuseppe, L.; Riela, S.; Fakhrullin, R. F. Clay-based drug-delivery systems: What Does the Future hold? *Ther. Deliv.* **2017**, *8* (8), 633-646. DOI: 10.4155/tde-2017-0041.
- (45) Pavón, E.; Alba, M. D. Swelling layered minerals applications: A solid state NMR overview. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2021**, *124-125*, 99-128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2021.04.001>.
- (46) Carretero, M. I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. *Appl. Clay Sci.* **2002**, *21* (3), 155-163. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-1317\(01\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0169-1317(01)00085-0).
- (47) Naumenko, E. A.; Fakhrullin, R. F. Toxicological Evaluation of Clay Nanomaterials and Polymer–Clay Nanocomposites. In *Functional Polymer Composites with Nanoclays*, Lvov, Y., Guo, B., Fakhrullin, R. F. Eds.; The Royal Society of Chemistry, 2016; p 0.
- (48) Bekaroğlu, M. G.; Nurili, F.; İşçi, S. Montmorillonite as imaging and drug delivery agent for cancer therapy. *Appl. Clay Sci.* **2018**, *162*, 469-477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.06.039>.
- (49) Han, S.; Liu, F.; Wu, J.; Zhang, Y.; Xie, Y.; Wu, W.; Liu, W.; Wang, Q.; Tang, Y. Targeting of fluorescent palygorskite polyethyleneimine nanocomposite to cancer cells. *Appl. Clay Sci.* **2014**, *101*, 567-573. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.09.020>.
- (50) Bretti, C.; Cataldo, S.; Gianguzza, A.; Lando, G.; Lazzara, G.; Pettignano, A.; Sammartano, S. Thermodynamics of Proton Binding of Halloysite Nanotubes. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (14), 7849-7859. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01127.
- (51) Joo, Y.; Sim, J. H.; Jeon, Y.; Lee, S. U.; Sohn, D. Opening and blocking the inner-pores of halloysite. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (40), 4519-4521, 10.1039/C3CC40465J. DOI: 10.1039/C3CC40465J.
- (52) Massaro, M.; Noto, R.; Riela, S. Past, Present and Future Perspectives on Halloysite Clay Minerals. *Molecules* **2020**, *25* (20), 4863.
- (53) Karewicz, A.; Machowska, A.; Kasprzyk, M.; Ledwójcik, G. Application of Halloysite Nanotubes in Cancer Therapy—A Review. *Materials* **2021**, *14* (11), 2943.

- (54) Liu, H.-Y.; Du, L.; Zhao, Y.-T.; Tian, W.-Q. In Vitro Hemocompatibility and Cytotoxicity Evaluation of Halloysite Nanotubes for Biomedical Application. *J. Nanomater.* **2015**, *2015* (1), 685323. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/685323>.
- (55) Vergaro, V.; Abdullayev, E.; Lvov, Y. M.; Zeitoun, A.; Cingolani, R.; Rinaldi, R.; Leporatti, S. Cytocompatibility and Uptake of Halloysite Clay Nanotubes. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (3), 820-826. DOI: [10.1021/bm9014446](https://doi.org/10.1021/bm9014446).
- (56) Massaro, M.; Cavallaro, G.; Colletti, C. G.; D'Azzo, G.; Guernelli, S.; Lazzara, G.; Pieraccini, S.; Riela, S. Halloysite nanotubes for efficient loading, stabilization and controlled release of insulin. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *524*, 156-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.025>.
- (57) Demirel, O.; Gundogdu, S. O.; Yuce, S.; Unal, H. Indocyanine Green-Loaded Halloysite Nanotubes as Photothermal Agents. *ACS Omega* **2023**, *8* (41), 37908-37917. DOI: [10.1021/acsomega.3c03268](https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03268).
- (58) Tan, C.; Zheng, J.; Feng, Y.; Liu, M. Cell Membrane-Coated Halloysite Nanotubes for Target-Specific Nanocarrier for Cancer Phototherapy. *Molecules* **2021**, *26* (15). DOI: [10.3390/molecules26154483](https://doi.org/10.3390/molecules26154483) From NLM.
- (59) Riela, S.; Barattucci, A.; Barreca, D.; Campagna, S.; Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Massaro, M.; Pizzolanti, G.; Salerno, T. M. G.; Bonaccorsi, P.; et al. Boosting the properties of a fluorescent dye by encapsulation into halloysite nanotubes. *Dyes Pigm.* **2021**, *187*, 109094. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.109094>.
- (60) Micó-Vicent, B.; Martínez-Verdú, F. M.; Novikov, A.; Stavitskaya, A.; Vinokurov, V.; Rozhina, E.; Fakhrullin, R.; Yendluri, R.; Lvov, Y. Stabilized Dye–Pigment Formulations with Platy and Tubular Nanoclays. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28* (27), 1703553. DOI: <https://doi.org/10.1002/adfm.201703553>.
- (61) Massaro, M.; Cavallaro, G.; Colletti, C. G.; Lazzara, G.; Milioto, S.; Noto, R.; Riela, S. Chemical modification of halloysite nanotubes for controlled loading and release. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (21), 3415-3433, 10.1039/C8TB00543E. DOI: [10.1039/C8TB00543E](https://doi.org/10.1039/C8TB00543E).
- (62) Massaro, M.; Colletti, C. G.; Lazzara, G.; Milioto, S.; Noto, R.; Riela, S. Halloysite nanotubes as support for metal-based catalysts. *J. Mater. Chem. A* **2017**, *5* (26), 13276-13293, 10.1039/C7TA02996A. DOI: [10.1039/C7TA02996A](https://doi.org/10.1039/C7TA02996A).
- (63) Tan, D.; Yuan, P.; Annabi-Bergaya, F.; Yu, H.; Liu, D.; Liu, H.; He, H. Natural halloysite nanotubes as mesoporous carriers for the loading of ibuprofen. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, *179*, 89-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.05.007>.
- (64) Gorbachevskii, M. V.; Stavitskaya, A. V.; Novikov, A. A.; Fakhrullin, R. F.; Rozhina, E. V.; Naumenko, E. A.; Vinokurov, V. A. Fluorescent gold nanoclusters stabilized on halloysite nanotubes: in vitro study on cytotoxicity. *Appl. Clay Sci.* **2021**, *207*, 106106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2021.106106>.
- (65) Lazzara, G.; Massaro, M.; Milioto, S.; Riela, S. Halloysite -Based Bionanocomposites. In *Handbook of Composites from Renewable Materials*, 2017; pp 557-584.
- (66) Bertolino, V.; Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Milioto, S.; Parisi, F. Halloysite nanotubes sandwiched between chitosan layers: novel bionanocomposites with multilayer structures. *New J. Chem.* **2018**, *42* (11), 8384-8390, 10.1039/C8NJ01161C. DOI: [10.1039/C8NJ01161C](https://doi.org/10.1039/C8NJ01161C).

- (67) Liao, J.; Wang, H.; Liu, N.; Yang, H. Functionally modified halloysite nanotubes for personalized bioapplications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2023**, *311*, 102812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102812>.
- (68) Giovannetti, R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. In *Macro To Nano Spectroscopy*, Uddin, J. Ed.; IntechOpen, 2012.
- (69) Tsolekile, N.; Nelana, S.; Oluwafemi, O. S. Porphyrin as Diagnostic and Therapeutic Agent. *Molecules* **2019**, *24* (14), 2669.
- (70) Eshghi, H.; Sazgarnia, A.; Rahimizadeh, M.; Attaran, N.; Bakavoli, M.; Soudmand, S. Protoporphyrin IX–gold nanoparticle conjugates as an efficient photosensitizer in cervical cancer therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2013**, *10* (3), 304-312. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.02.003>.
- (71) Yan, L.; Amirshaghghi, A.; Huang, D.; Miller, J.; Stein, J. M.; Busch, T. M.; Cheng, Z.; Tsourkas, A. Protoporphyrin IX (PpIX)-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) Nanoclusters for Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28* (16). DOI: 10.1002/adfm.201707030 From NLM.
- (72) Massaro, M.; Riela, S.; Cavallaro, G.; Gruttadauria, M.; Milioto, S.; Noto, R.; Lazzara, G. Eco-friendly functionalization of natural halloysite clay nanotube with ionic liquids by microwave irradiation for Suzuki coupling reaction. *J. Organomet. Chem.* **2014**, *749*, 410-415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2013.10.044>.
- (73) Massaro, M.; Campofelice, A.; Colletti, C. G.; Lazzara, G.; Noto, R.; Riela, S. Functionalized halloysite nanotubes: Efficient carrier systems for antifungine drugs. *Appl. Clay Sci.* **2018**, *160*, 186-192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.01.005>.
- (74) Massaro, M.; Piana, S.; Colletti, C. G.; Noto, R.; Riela, S.; Baiamonte, C.; Giordano, C.; Pizzolanti, G.; Cavallaro, G.; Milioto, S.; et al. Multicavity halloysite–amphiphilic cyclodextrin hybrids for co-delivery of natural drugs into thyroid cancer cells. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (19), 4074-4081, 10.1039/C5TB00564G. DOI: 10.1039/C5TB00564G.
- (75) Massaro, M.; Pettignano, A.; Muratore, N.; Fusteş-Dămoc, I.; Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Meo, P. L.; Mija, A.; Sánchez-Espejo, R.; Viseras Iborra, C.; et al. Cyclodextrin-grafted-hectorite based nanomaterial for antibiotics and metal ions adsorption. *Appl. Clay Sci.* **2024**, *250*, 107271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2024.107271>.
- (76) Murphy, Z.; Kent, M.; Freeman, C.; Landge, S.; Koricho, E. Halloysite nanotubes functionalized with epoxy and thiol organosilane groups to improve fracture toughness in nanocomposites. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2* (12), 2130. DOI: 10.1007/s42452-020-03909-2.
- (77) Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Massaro, M.; Milioto, S.; Noto, R.; Parisi, F.; Riela, S. Biocompatible Poly(N-isopropylacrylamide)-halloysite Nanotubes for Thermoresponsive Curcumin Release. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (16), 8944-8951. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b00991.
- (78) Dinache, A.; Nistorescu, S.; Tozar, T.; Smarandache, A.; Boni, M.; Prepelita, P.; Staicu, A. Spectroscopic Investigations of Porphyrin-TiO₂ Nanoparticles Complexes. In *Molecules*, 2023; Vol. 28.
- (79) Imanparast, A.; Attaran, N.; Eshghi, H.; Sazgarnia, A. Surface modification of gold nanoparticles with 6-mercapto-1-hexanol to facilitate dual conjugation of protoporphyrin IX and folic acid for improving the targeted photochemical internalization. *Iran J Basic Med Sci* **2022**, *25* (8), 970-979. DOI: 10.22038/ijbms.2022.63622.14033 From NLM.

- (80) Calvino, M. M.; Cavallaro, G.; Milioto, S.; Lazzara, G. Composite materials based on halloysite clay nanotubes and cellulose from *Posidonia oceanica* sea balls: from films to geopolymers. *Environ. Sci. Nano.* **2024**, *11* (4), 1508-1520, 10.1039/D3EN00879G. DOI: 10.1039/D3EN00879G.
- (81) Massaro, M.; Colletti, C. G.; Guernelli, S.; Lazzara, G.; Liu, M.; Nicotra, G.; Noto, R.; Parisi, F.; Pibiri, I.; Spinella, C.; et al. Photoluminescent hybrid nanomaterials from modified halloysite nanotubes. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6* (27), 7377-7384, 10.1039/C8TC01424H. DOI: 10.1039/C8TC01424H.
- (82) Alfieri, M. L.; Massaro, M.; d'Ischia, M.; D'Errico, G.; Gallucci, N.; Gruttadauria, M.; Licciardi, M.; Liotta, L. F.; Nicotra, G.; Sfuncia, G.; et al. Site-specific halloysite functionalization by polydopamine: A new synthetic route for potential near infrared-activated delivery system. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *606*, 1779-1791. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.08.155>.
- (83) Myrzakhmetov, B.; Arnoux, P.; Mordon, S.; Acherar, S.; Tsoy, I.; Frochot, C. Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a, and Photofrin® in Different Conditions. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (2), 138.
- (84) Rossi, L. M.; Silva, P. R.; Vono, L. L. R.; Fernandes, A. U.; Tada, D. B.; Baptista, M. S. Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. *Langmuir* **2008**, *24* (21), 12534-12538. DOI: 10.1021/la800840k.
- (85) Dar, U. A.; Shah, S. A. UV-visible and fluorescence spectroscopic assessment of meso-tetrakis-(4-halophenyl) porphyrin; H2TXPP (X = F, Cl, Br, I) in THF and THF-water system: Effect of pH and aggregation behaviour. *Spectrochim. Acta, Pt. A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *240*, 118570. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118570>.
- (86) Massaro, M.; Notarbartolo, M.; Raymo, F. M.; Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Mazza, M. M. A.; Viseras-Iborra, C.; Riela, S. Supramolecular Association of Halochromic Switches and Halloysite Nanotubes in Fluorescent Nanoprobes for Tumor Detection. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5* (10), 13729-13736. DOI: 10.1021/acsanm.2c00603.
- (87) Imran, M.; Ramzan, M.; Qureshi, A. K.; Khan, M. A.; Tariq, M. Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging. In *Biosensors*, 2018; Vol. 8.
- (88) Shu, Y.; Ma, M.; Pan, X.; Shafiq, M.; Yu, H.; Chen, H. Cobalt protoporphyrin-induced nano-self-assembly for CT imaging, magnetic-guidance, and antioxidative protection of stem cells in pulmonary fibrosis treatment. *Bioact. Mater.* **2023**, *21*, 129-141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.08.008>.
- (89) Zhang, X.-a.; Lovejoy, K. S.; Jasanoff, A.; Lippard, S. J. Water-soluble porphyrins as a dual-function molecular imaging platform for MRI and fluorescence zinc sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (26), 10780-10785. DOI: doi:10.1073/pnas.0702393104.
- (90) Das, A.; Mohammed, T. P.; Sankaralingam, M. Biological activity of copper porphyrins. *Coord. Chem. Rev.* **2024**, *506*, 215661. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2024.215661>.
- (91) Jhonsi, M. A.; Nithya, C.; Kathiravan, A. Unravel the interaction of protoporphyrin IX with reduced graphene oxide by vital spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta, Pt. A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *178*, 86-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.01.059>.

- (92) Deepa, H. R.; Thipperudrappa, J.; Suresh Kumar, H. M. Effect of temperature on fluorescence quenching and emission characteristics of laser dyes. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2020**, *1473* (1), 012046. DOI: 10.1088/1742-6596/1473/1/012046.
- (93) Wang, D.; Ma, L.; Wang, D.; Wang, R.; Wang, N.; Li, J. Zinc(II) porphyrin-based ionic porous organic polymers (iPOPs) having abundant dual-function sites for promoting cycloaddition of CO₂ with epoxides. *Appl. Catal., A: Gen* **2023**, *665*, 119380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2023.119380>.
- (94) Zaitoun, M. A. Spectroscopic study of protoporphyrin IX zinc(II) encapsulated in sol-gel glass. *Spectrochim. Acta, Pt. A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61* (8), 1715-1719. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.07.001>.
- (95) Entradas, T.; Waldron, S.; Volk, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2020**, *204*, 111787. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>.
- (96) Nagy-Simon, T.; Potara, M.; Craciun, A. M.; Licarete, E.; Astilean, S. IR780-dye loaded gold nanoparticles as new near infrared activatable nanotheranostic agents for simultaneous photodynamic and photothermal therapy and intracellular tracking by surface enhanced resonant Raman scattering imaging. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *517*, 239-250. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.02.007>.
- (97) Stoean, B.; Lupan, I.; Cristea, C.; Silion, M.; Silaghi-Dumitrescu, L.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Gaina, L. I. Outcomes of folic acid esterification upon the properties of hydrophilic phenothiazinium dyes: New photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2024**, *451*, 115500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2024.115500>.
- (98) Hou, B.; Zhang, W.; Li, C.; Sun, X.; Feng, X.; Liu, J. Synthesis and in vitro biological evaluation of novel water-soluble porphyrin complexes for cancer photodynamic therapy. *Appl. Organomet. Chem.* **2022**, *36* (4), e6598. DOI: <https://doi.org/10.1002/aoc.6598>.
- (99) Semeraro, P.; Chimienti, G.; Altamura, E.; Fini, P.; Rizzi, V.; Cosma, P. Chlorophyll a in cyclodextrin supramolecular complexes as a natural photosensitizer for photodynamic therapy (PDT) applications. *Mater. Sci. Eng., C* **2018**, *85*, 47-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.012>.
- (100) Arcudi, F.; Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Massaro, M.; Milioto, S.; Noto, R.; Riela, S. Selective Functionalization of Halloysite Cavity by Click Reaction: Structured Filler for Enhancing Mechanical Properties of Bionanocomposite Films. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (27), 15095-15101. DOI: 10.1021/jp504388e.
- (101) Massaro, M.; Riela, S.; Baiamonte, C.; Blanco, J. L. J.; Giordano, C.; Lo Meo, P.; Milioto, S.; Noto, R.; Parisi, F.; Pizzolanti, G.; et al. Dual drug-loaded halloysite hybrid-based glyocluster for sustained release of hydrophobic molecules. *RSC Adv.* **2016**, *6* (91), 87935-87944, 10.1039/C6RA14657K. DOI: 10.1039/C6RA14657K.
- (102) Wang, C.; Xiu, Y.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Xu, J.; Yu, W.; Xing, D. Recent advances in biotin-based therapeutic agents for cancer therapy. *Nanoscale* **2025**, *17* (4), 1812-1873. DOI: 10.1039/d4nr03729d From NLM.
- (103) Balan, V.; Petrache, I. A.; Popa, M. I.; Butnaru, M.; Barbu, E.; Tsibouklis, J.; Verestiuc, L. Biotinylated chitosan-based SPIONs with potential in blood-contacting applications. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14* (2), 730. DOI: 10.1007/s11051-012-0730-y.

- (104) Fernández, Z.; Sánchez, L.; Santhosh Babu, S.; Fernández, G. Oligo(phenyleneethynylene)s: Shape-Tunable Building Blocks for Supramolecular Self-Assembly. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63* (18), e202402259. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.202402259>.
- (105) Barattucci, A.; Deni, E.; Bonaccorsi, P.; Ceraolo, M. G.; Papalia, T.; Santoro, A.; Sciortino, M. T.; Puntoriero, F. Oligo(phenylene ethynylene) Glucosides: Modulation of Cellular Uptake Capacity Preserving Light ON. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (11), 5113-5120. DOI: 10.1021/jo500661u.
- (106) Lanoë, P.-H.; Gallavardin, T.; Dupin, A.; Maury, O.; Baldeck, P. L.; Lindgren, M.; Monnereau, C.; Andraud, C. Influence of bromine substitution pattern on the singlet oxygen generation efficiency of two-photon absorbing chromophores. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (31), 6275-6278, 10.1039/C2OB25536G. DOI: 10.1039/C2OB25536G.
- (107) Dascier, D.; Ji, E.; Parthasarathy, A.; Schanze, K. S.; Whitten, D. G. Efficacy of End-Only-Functionalized Oligo(arylene-ethynylene)s in Killing Bacterial Biofilms. *Langmuir* **2012**, *28* (31), 11286-11290. DOI: 10.1021/la302476s.
- (108) Hu, W.; Zhu, N.; Tang, W.; Zhao, D. Oligo(p-phenyleneethynylene)s with Hydrogen-Bonded Coplanar Conformation. *Org. Lett.* **2008**, *10* (13), 2669-2672. DOI: 10.1021/ol800753z.
- (109) Massaro, M.; Poma, P.; Cavallaro, G.; García-Villén, F.; Lazzara, G.; Notarbartolo, M.; Muratore, N.; Sánchez-Espejo, R.; Viseras Iborra, C.; RIELA, S. Prodrug based on halloysite delivery systems to improve the antitumor ability of methotrexate in leukemia cell lines. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2022**, *213*, 112385. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112385>.
- (110) Ghalei, S.; Hopkins, S.; Douglass, M.; Garren, M.; Mondal, A.; Handa, H. Nitric oxide releasing halloysite nanotubes for biomedical applications. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *590*, 277-289. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.01.047>.
- (111) Rabello, B. R.; Gerola, A. P.; Pellosi, D. S.; Tessaro, A. L.; Aparício, J. L.; Caetano, W.; Hioka, N. Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2012**, *238*, 53-62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.04.012>.
- (112) Hammond, S. J.; Williamson, M. P.; Williams, D. H.; Boeck, L. D.; Marconi, G. G. On the biosynthesis of the antibiotic vancomycin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, (6), 344-346, 10.1039/C39820000344. DOI: 10.1039/C39820000344.
- (113) Rubinstein, E.; Keynan, Y. Vancomycin revisited - 60 years later. *Front Public Health* **2014**, *2*, 217. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00217 From NLM.
- (114) Unni, S.; Siddiqui, T. J.; Bidaisee, S. Reduced Susceptibility and Resistance to Vancomycin of Staphylococcus aureus: A Review of Global Incidence Patterns and Related Genetic Mechanisms. *Cureus* **2021**, *13* (10), e18925. DOI: 10.7759/cureus.18925 From NLM.
- (115) Di Poto, A.; Sbarra, M. S.; Provenza, G.; Visai, L.; Speziale, P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on Staphylococcus aureus biofilms. *Biomaterials* **2009**, *30* (18), 3158-3166. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.038 From NLM.

- (116) Falanga, A. P.; Massaro, M.; Borbone, N.; Notarbartolo, M.; Piccialli, G.; Liotta, L. F.; Sanchez-Espejo, R.; Viseras Iborra, C.; Raymo, F. M.; Oliviero, G.; et al. Carrier capability of halloysite nanotubes for the intracellular delivery of antisense PNA targeting mRNA of neuroglobin gene. *J. Colloid Interface Sci.* **2024**, *663*, 9-20. DOI: 10.1016/j.jcis.2024.02.136 From NLM.
- (117) Mohamed, H. B.; El-Shanawany, S. M.; Hamad, M. A.; Elsabahy, M. Niosomes: A Strategy toward Prevention of Clinically Significant Drug Incompatibilities. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 6340. DOI: 10.1038/s41598-017-06955-w.
- (118) Massaro, M.; Armetta, F.; Cavallaro, G.; Chillura Martino, D. F.; Gruttadauria, M.; Lazzara, G.; Riela, S.; d'Ischia, M. Effect of halloysite nanotubes filler on polydopamine properties. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *555*, 394-402. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.07.100 From NLM.
- (119) Trucillo, P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release. *Processes* **2022**, *10* (6), 1094.
- (120) Khalbas, A. H.; Albayati, T. M.; Ali, N. S.; Salih, I. K. Drug loading methods and kinetic release models using of mesoporous silica nanoparticles as a drug delivery system: A review. *South African Journal of Chemical Engineering* **2024**, *50*, 261-280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2024.08.013>.
- (121) Luo, Y.; Mills, D. K. The Effect of Halloysite Addition on the Material Properties of Chitosan–Halloysite Hydrogel Composites. *Gels* **2019**, *5* (3), 40.
- (122) Massaro, M.; Borrego-Sánchez, A.; Sánchez-Espejo, R.; Viseras Iborra, C.; Cavallaro, G.; García-Villén, F.; Guernelli, S.; Lazzara, G.; Miele, D.; Sainz-Díaz, C. I.; et al. Ciprofloxacin carrier systems based on hectorite/halloysite hybrid hydrogels for potential wound healing applications. *Appl. Clay Sci.* **2021**, *215*, 106310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2021.106310>.
- (123) Gao, H.; Liu, G.; Cui, C.; Wang, M.; Gao, J. Preparation and properties of a polyurethane film based on novel photochromic spirooxazine chain extension. *New J. Chem.* **2022**, *46* (19), 9128-9137, 10.1039/D2NJ00162D. DOI: 10.1039/D2NJ00162D.
- (124) Guérin, D.; Lenfant, S.; Godey, S.; Vuillaume, D. Synthesis and electrical properties of fullerene-based molecular junctions on silicon substrate. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (13), 2680-2690, 10.1039/B924255D. DOI: 10.1039/B924255D.
- (125) Massaro, M.; Licandro, E.; Cauteruccio, S.; Lazzara, G.; Liotta, L. F.; Notarbartolo, M.; Raymo, F. M.; Sánchez-Espejo, R.; Viseras-Iborra, C.; Riela, S. Nanocarrier based on halloysite and fluorescent probe for intracellular delivery of peptide nucleic acids. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *620*, 221-233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.03.151>.
- (126) Eskandarloo, H.; Arshadi, M.; Abbaspourrad, A. Magnetic Dendritic Halloysite Nanotube for Highly Selective Recovery of Heparin Digested from Porcine Intestinal Mucosa. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (11), 14561-14573. DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b03188.
- (127) Massaro, M.; Poma, P.; Colletti, C. G.; Barattucci, A.; Bonaccorsi, P. M.; Lazzara, G.; Nicotra, G.; Parisi, F.; Salerno, T. M. G.; Spinella, C.; et al. Chemical and biological evaluation of cross-linked halloysite-curcumin derivatives. *Appl. Clay Sci.* **2020**, *184*, 105400. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105400>.

- (128) John C. Crano, R. J. G. *Organic Photochromic and Thermochromic Compounds*; 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/b114211>.
- (129) Xie, Y.; Qian, D.; Wu, D.; Ma, X. Magnetic halloysite nanotubes/iron oxide composites for the adsorption of dyes. *Chem. Eng. J.* **2011**, *168* (2), 959-963. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.02.031>.
- (130) Antarnusa, G.; Jayanti, P. D.; Denny, Y. R.; Suherman, A. Utilization of co-precipitation method on synthesis of Fe₃O₄/PEG with different concentrations of PEG for biosensor applications. *Mater.* **2022**, *25*, 101525. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2022.101525>.
- (131) Verma, C.; Tapadia, K.; Soni, A. B. Determination of iron (III) in food, biological and environmental samples. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1415-1420. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.011>.
- (132) Yang, Y.; Wang, P.; Shi, R.; Zhao, Z.; Xie, A.; Shen, Y.; Zhu, M. Design of the tumor microenvironment-multiresponsive nanoplatfrom for dual-targeting and photothermal imaging guided photothermal/photodynamic/chemodynamic cancer therapies with hypoxia improvement and GSH depletion. *Chem. Eng. J.* **2022**, *441*, 136042. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136042>.
- (133) Missana, T.; Maffiotte, C.; García-Gutiérrez, M. Surface reactions kinetics between nanocrystalline magnetite and uranyl. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *261* (1), 154-160. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00227-8).
- (134) Wang, N.; Wang, M.; Quan, H.; Wang, S.; Chen, D. Waste Camellia oleifera shell-derived hierarchically porous carbon modified by Fe₃O₄ nanoparticles for capacitive removal of heavy metal ions. *Sep. Purif. Technol.* **2024**, *329*, 125184. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.125184>.
- (135) Xiao, J.; Hai, L.; Li, Y.; Li, H.; Gong, M.; Wang, Z.; Tang, Z.; Deng, L.; He, D. An Ultrasmall Fe₃O₄-Decorated Polydopamine Hybrid Nanozyme Enables Continuous Conversion of Oxygen into Toxic Hydroxyl Radical via GSH-Depleted Cascade Redox Reactions for Intensive Wound Disinfection. *Small* **2022**, *18* (9), 2105465. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.202105465>.
- (136) Tian, L.; Zhao, B.; Zhang, J.; Luo, X.; Wu, F. Magnetic covalent organic framework nanospheres with enhanced peroxidase-like activity for colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2023**, *666*, 131309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.131309>.
- (137) Gao, L.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T.; Feng, J.; Yang, D.; Perrett, S.; et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol* **2007**, *2* (9), 577-583. DOI: 10.1038/nnano.2007.260 From NLM.
- (138) Chen, J.; Liu, Y.; Zhu, G.; Yuan, A. Ag@Fe₃O₄ nanowire: fabrication, characterization and peroxidase-like activity. *Cryst. Res. Technol.* **2014**, *49* (5), 309-314. DOI: <https://doi.org/10.1002/crat.201300440>.
- (139) Liu, Y.; Yuan, M.; Qiao, L.; Guo, R. An efficient colorimetric biosensor for glucose based on peroxidase-like protein-Fe₃O₄ and glucose oxidase nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 391-396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.020>.
- (140) Liu, Y.; Xu, B.; Lu, M.; Li, S.; Guo, J.; Chen, F.; Xiong, X.; Yin, Z.; Liu, H.; Zhou, D. Ultrasmall Fe-doped carbon dots nanozymes for photoenhanced antibacterial therapy and

- wound healing. *Bioact. Mater.* **2022**, *12*, 246-256. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.023>.
- (141) Massaro, M.; Leone, F.; Raymo, F. M.; de Melo Barbosa, R.; Sánchez-Espejo, R.; Viseras, C.; Noto, R.; Riela, S. Design of halloysite nanotube-based nanomaterials for theranostic applications: fluorescent probes and chemodynamic activity. *J. Mater. Chem. B.* **2025**, *13* (31), 9407-9417, 10.1039/D5TB00510H. DOI: 10.1039/D5TB00510H.
- (142) Massaro, M.; Viseras Iborra, C.; Cavallaro, G.; Colletti, C. G.; García-Villén, F.; Lazzara, G.; Riela, S. Synthesis and Characterization of Nanomaterial Based on Halloysite and Hectorite Clay Minerals Covalently Bridged. *Nanomaterials* **2021**, *11* (2), 506.
- (143) Massaro, M.; Borrego-Sánchez, A.; Viseras-Iborra, C.; Cinà, G.; García-Villén, F.; Liotta, L. F.; Lopez Galindo, A.; Pimentel, C.; Sainz-Díaz, C. I.; Sánchez-Espejo, R.; et al. Hectorite/Phenanthroline-Based Nanomaterial as Fluorescent Sensor for Zn Ion Detection: A Theoretical and Experimental Study. *Nanomaterials* **2024**, *14* (10), 880.
- (144) Hu, Z.; Arrowsmith, R. L.; Tyson, J. A.; Mirabello, V.; Ge, H.; Eggleston, I. M.; Botchway, S. W.; Dan Pantos, G.; Pascu, S. I. A fluorescent Arg–Gly–Asp (RGD) peptide–naphthalenediimide (NDI) conjugate for imaging integrin $\alpha\beta3$ in vitro. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (32), 6901-6904, 10.1039/C4CC08265F. DOI: 10.1039/C4CC08265F.
- (145) Fin, A.; Petkova, I.; Doval, D. A.; Sakai, N.; Vauthey, E.; Matile, S. Naphthalene- and perylenediimides with hydroquinones, catechols, boronic esters and imines in the core. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (24), 8246-8252, 10.1039/C1OB05702B. DOI: 10.1039/C1OB05702B.
- (146) Doria, F.; Manet, I.; Grande, V.; Monti, S.; Freccero, M. Water-Soluble Naphthalene Diimides as Singlet Oxygen Sensitizers. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (16), 8065-8073. DOI: 10.1021/jo401347z.
- (147) Tumiatto, V.; Milelli, A.; Minarini, A.; Micco, M.; Gasperi Campani, A.; Roncuzzi, L.; Baiocchi, D.; Marinello, J.; Capranico, G.; Zini, M.; et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Substituted Naphthalene Imides and Diimides as Anticancer Agent. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (23), 7873-7877. DOI: 10.1021/jm901131m.
- (148) Collie, G. W.; Promontorio, R.; Hampel, S. M.; Micco, M.; Neidle, S.; Parkinson, G. N. Structural Basis for Telomeric G-Quadruplex Targeting by Naphthalene Diimide Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (5), 2723-2731. DOI: 10.1021/ja2102423.
- (149) Bhosale, S. V.; Jani, C. H.; Langford, S. J. Chemistry of naphthalene diimides. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 331-342, 10.1039/B615857A. DOI: 10.1039/B615857A.
- (150) Cardano, F.; Massaro, M.; Leone, F.; Cinà, G.; Borbone, N.; Falanga, A. P.; Oliviero, G.; Nicosia, A.; Fresia, M.; Fin, A.; et al. Halloysite Nanotubes Functionalized with Naphthalene Diimide and Peptide Nucleic Acid Derivatives: Toward Multifunctional Nanomaterials. *ACS Appl. Nano Mater.* **2025**, *8* (24), 12775-12783. DOI: 10.1021/acsanm.5c02027.
- (151) Toso, B.; Gastaldi, M.; Renno, G.; Pirri, C. F.; Barolo, C.; Fin, A.; Roppolo, I. Colorimetric 3D printable base-detectors exploiting halocromic core-substituted naphthalenediimides. *Polym. Chem.* **2023**, *14* (11), 1213-1223, 10.1039/D2PY01593E. DOI: 10.1039/D2PY01593E.
- (152) Moretta, R.; Terracciano, M.; Borbone, N.; Oliviero, G.; Schiattarella, C.; Piccialli, G.; Falanga, A. P.; Marzano, M.; Dardano, P.; De Stefano, L.; et al. PNA-Based Graphene

- Oxide/Porous Silicon Hybrid Biosensor: Towards a Label-Free Optical Assay for Brugada Syndrome. *Nanomaterials* **2020**, *10* (11), 2233.
- (153) Montazersaheb, S.; Hejazi, M. S.; Nozad Charoudeh, H. Potential of Peptide Nucleic Acids in Future Therapeutic Applications. *Adv Pharm Bull* **2018**, *8* (4), 551-563. DOI: 10.15171/apb.2018.064 From NLM.
- (154) Riela, S.; Borrego-Sánchez, A.; Cauteruccio, S.; de Melo Barbosa, R.; Massaro, M.; Sainz-Díaz, C. I.; Sánchez-Espejo, R.; Viseras-Iborra, C.; Licandro, E. Exploiting the interaction between halloysite and charged PNAs for their controlled release. *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11* (28), 6685-6696, 10.1039/D3TB00637A. DOI: 10.1039/D3TB00637A.
- (155) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4891-4932. DOI: 10.1021/cr078381n.
- (156) D. V. Spector, D. S. A., V. V. Bykusova, A. O. Zharovaa, E. S. Egorovaa, A. S. Voskresenskayaa, A. R. Olovyanishnikova, I. A. Kuzmichevb, A. A. Bubleya, R. L. Antipina, E. K. Beloglazkinaa, O. O. Krasnovskayaa. BODIPY: synthesis, modification, and applications in sensing and biomedicine. *Russ. Chem. Rev.* **2024**, *93* (10). DOI: <https://doi.org/10.59761/RCR5136>.
- (157) Wood, T. E.; Thompson, A. Advances in the Chemistry of Dipyrins and Their Complexes. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (5), 1831-1861. DOI: 10.1021/cr050052c.
- (158) Yu, L.; Muthukumaran, K.; Sazanovich, I. V.; Kirmaier, C.; Hindin, E.; Diers, J. R.; Boyle, P. D.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S. Excited-State Energy-Transfer Dynamics in Self-Assembled Triads Composed of Two Porphyrins and an Intervening Bis(dipyrinato)metal Complex. *Inorg. Chem.* **2003**, *42* (21), 6629-6647. DOI: 10.1021/ic034559m.
- (159) Mao, Z.; Kim, J. H.; Lee, J.; Xiong, H.; Zhang, F.; Kim, J. S. Engineering of BODIPY-based theranostics for cancer therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *476*, 214908. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214908>.
- (160) Boens, N.; Verbelen, B.; Ortiz, M. J.; Jiao, L.; Dehaen, W. Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *399*, 213024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213024>.
- (161) Bodio, E.; Goze, C. Investigation of B-F substitution on BODIPY and aza-BODIPY dyes: Development of B-O and B-C BODIPYs. *Dyes Pigm.* **2019**, *160*, 700-710. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.062>.
- (162) Guisán-Ceinos, S.; R. Rivero, A.; Romeo-Gella, F.; Simón-Fuente, S.; Gómez-Pastor, S.; Calvo, N.; Orrego, A. H.; Guisán, J. M.; Corral, I.; Sanz-Rodriguez, F.; et al. Turn-on Fluorescent Biosensors for Imaging Hypoxia-like Conditions in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (18), 8185-8193. DOI: 10.1021/jacs.2c01197.
- (163) Kumar, P. P. P.; Saxena, S.; Joshi, R. BODIPY Dyes: A New Frontier in Cellular Imaging and Theragnostic Applications. *Colorants* **2025**, *4* (2), 13.
- (164) Liu, H.; Song, W.; Zhang, S.; Chan, K. S.; Guo, Z.; Shen, Z. A ratiometric fluorescent probe for real-time monitoring of intracellular glutathione fluctuations in response to cisplatin. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (32), 8495-8501, 10.1039/D0SC02889D. DOI: 10.1039/D0SC02889D.
- (165) Shi, Y.; Hu, Y.; Zhang, Y.; Tjandra, A. D.; Park, S.; Chandrawati, R.; Tasoglu, S.; Jiang, N.; Yetisen, A. K. Microfluidic contact lens for continuous monitoring of ocular oxidative

- stress. *Biosens. Bioelectron.* **2025**, *280*, 117427. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2025.117427>.
- (166) Ly, J. T.; Presley, K. F.; Cooper, T. M.; Baldwin, L. A.; Dalton, M. J.; Grusenmeyer, T. A. Impact of iodine loading and substitution position on intersystem crossing efficiency in a series of ten methylated-meso-phenyl-BODIPY dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23* (21), 12033-12044, 10.1039/D0CP05904H. DOI: 10.1039/D0CP05904H.
- (167) Yu, Y.; Geng, J.; Ong, E. Y. X.; Chellappan, V.; Tan, Y. N. Bovine Serum Albumin Protein-Templated Silver Nanocluster (BSA-Ag13): An Effective Singlet Oxygen Generator for Photodynamic Cancer Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (19), 2528-2535. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.201600312>.
- (168) Liu, C.; Liu, Q.; Chen, L.; Li, M.; Yin, J.; Zhu, X.; Chen, D. A pH-Sensitive Self-Assembled and Carrier-Free Nanoparticle Based on Charge Reversal for Enhanced Synergetic Chemo-Phototherapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9* (17), 2000899. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202000899>.

7. Appendice 1

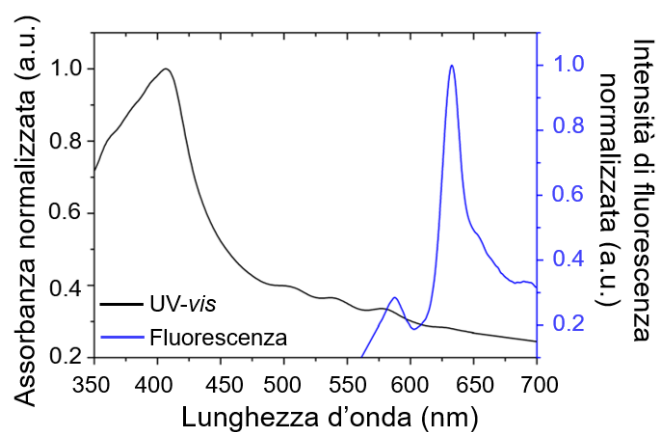


Figura A1. Spettri di assorbimento (linea nera) ed emissione (linea blu) di **HNT-1** (0.5 mg mL^{-1} , metanolo)

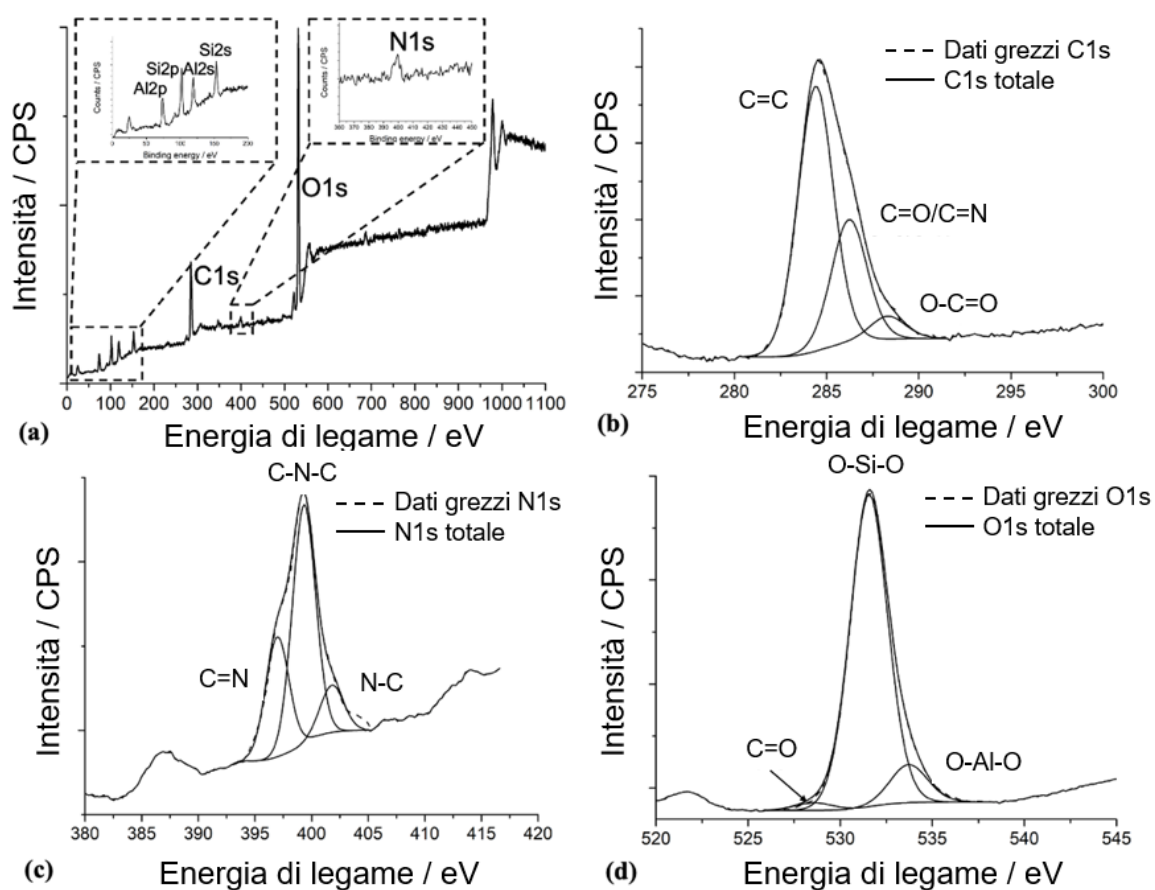


Figure A2. (a) Survey relativa al nanomateriale **HNT-1**; (b) deconvoluzione di C1s , (c) deconvoluzione di N1s , (d) deconvoluzione di O1s

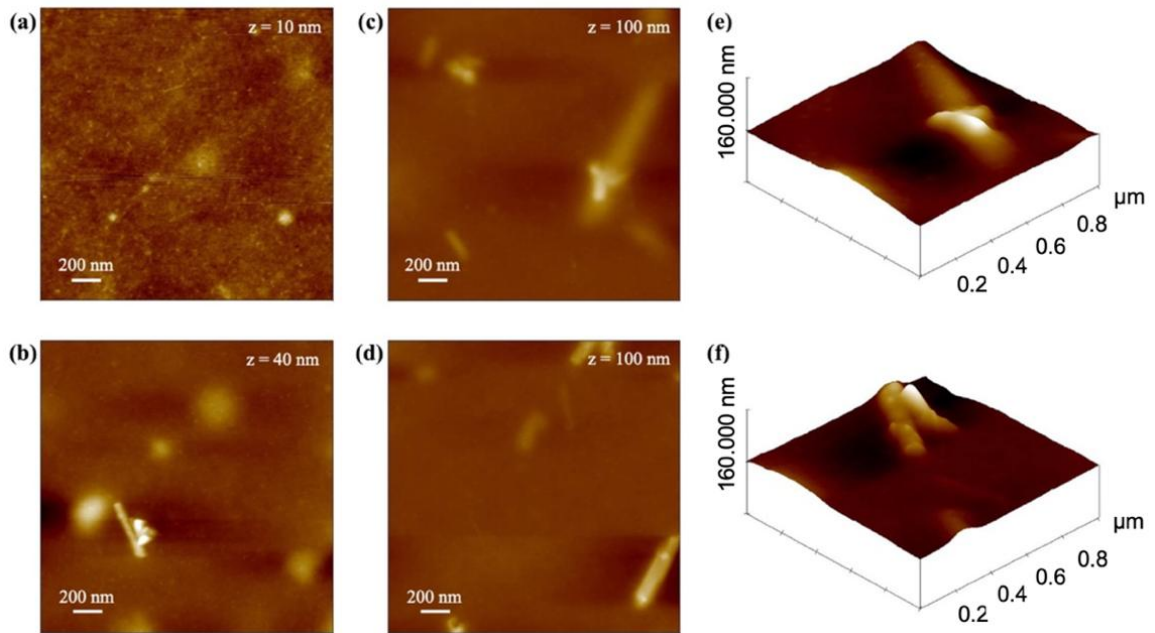


Figure A3. Immagine AFM di (a) Chit, (b) Chit/HNT, (c) Chit/HNT-2, (d) Chit/HNT-4; immagini 3D di (e) Chit/HNT-2, e (f) Chit/HNT-4

8. Appendice 2

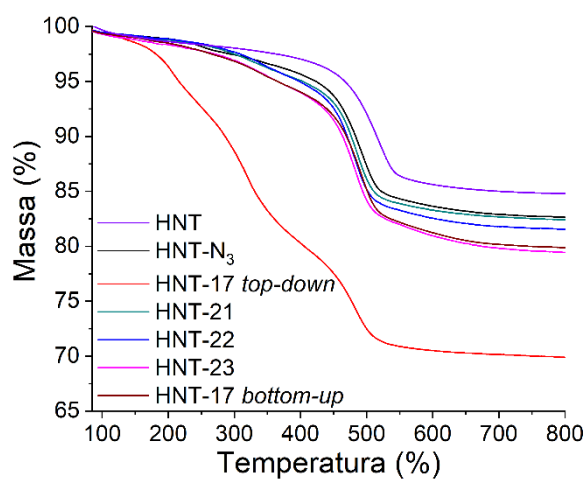


Figura A4. Confronto delle curve termogravimetriche di tutti i nanomateriali ottenuti con i due diversi approcci

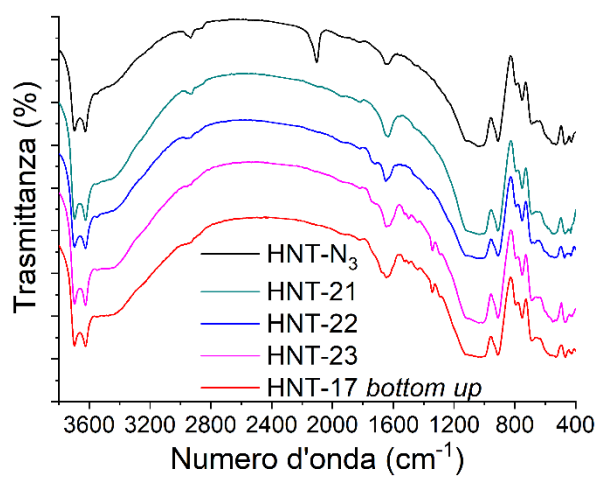


Figura A5. confronto degli spettri FT-IR dei nanomateriali ottenuti tramite approccio bottom up

9. Abbreviazioni

- ABDA = Acido 9,10-antracenedil-bis(metilene) dimalonico
- AIBN = Azobisisobutirronitrile
- AFM = Microscopia a forza atomica
- aPDT = Terapia fotodinamica antibatterica
- AuNPs = Nanoparticelle di oro
- BODIPY = 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
- CDT = Terapia chemodinamica
- Chit = Chitosano
- CNT = Nanotubi di carbonio
- DCC = N,N'-dicicloesilcarbodiimmide
- DCM = Diclorometano
- DDQ = 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone
- DLS = *Dynamic light scattering*
- DMA = Analisi meccanica dinamica
- DMAP = 4-dimetilamminopiridina
- DMF = Dimetilformammide
- DMSO = Dimetilsolfossido
- DPBF = 1,3-difenilisobenzofurano
- EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide cloridrato
- EDX = *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*
- Fe₃O₄NPs = Nanoparticelle di ossido di ferro
- FT-IR = Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier
- GSH = Glutazione
- HAADF-STEM = *High Angular Annular Dark Field - Scanning Transmission Electron Microscopy*
- HNT = Nanotubi di halloysite
- Ht = Hectorite
- HR-TEM = *High Resolution – Transmission Electron Microscopy*
- ICG = Verde indocianina
- LOD = Limite di rivelabilità
- MB = Blu di metilene
- MRI = *Imaging* a risonanza magnetica

- MTS = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio
- MTX = Metotrexato
- MW = Microonde
- NDI = Naftalendiimmide
- OPE = Oligo(fenilene etilene)
- Pal = Paligorskite
- PDT = Terapia fotodinamica
- PET = Tomografia a emissione di positroni
- PNA = Acido peptidonucleico
- PPIX = Protoporfirina IX
- PS = Fotosensibilizzatore
- PTT = Terapia fototermica
- ROS = Specie reattive dell'ossigeno
- SDT = Terapia sonodinamica
- SPECT = Tomografia a emissione di fotone singolo
- TEM = Microscopia elettronica a trasmissione
- TFA = Acido trifluoroacetico
- TGA = Analisi termogravimetrica
- TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
- TME = Microambiente tumorale
- UA = Acido urico
- UV-vis-NIR = regione ultravioletto-visibile-vicino infrarosso
- Van = Vancomicina
- XPS = *X-ray photoelectron spectroscopy*

10. Ringraziamenti

Giunta al termine di questo percorso, desidero esprimere la mia sincera gratitudine a tutte le persone che, in modi diversi, hanno contribuito a rendere possibile questo traguardo.

Innanzitutto ringrazio la mia Tutor, la Prof.ssa Serena Riela, per la guida costante e la disponibilità dimostrata in ogni fase di questo percorso. Grazie per gli inestimabili consigli e per la pazienza con cui ha affrontato ogni mia incertezza. La ringrazio per aver reso possibile questo traguardo, trasformando le sfide in opportunità di crescita scientifica e personale.

Alla mia Co-Tutor, la Dott.ssa Marina Massaro, va il mio ringraziamento per i preziosi consigli, per aver sempre saputo incoraggiarmi nei momenti più difficili e per la sua capacità di riportare ogni mia difficoltà alla giusta misura con i suoi abbracci.

Desidero inoltre ringraziare tutti i professori che, con la loro disponibilità e competenza, hanno contribuito alla realizzazione dei tanti esperimenti e alla buona riuscita di questa tesi. Un grazie particolare alla Prof.ssa Luïsa Pérez-Garcia, che mi ha accolta nel suo laboratorio presso l'Università di Barcellona, offrendomi un'esperienza stimolante e formativa, sia dal punto di vista scientifico che umano.

Ringrazio i colleghi e gli amici con cui ho condiviso tante esperienze durante questi anni. Grazie per il vostro sostegno e per aver reso più piacevoli anche le giornate più impegnative. Un ringraziamento va anche ai colleghi incontrati a Barcellona, che fin dal primo momento mi hanno fatta sentire parte del gruppo.

Un grazie speciale alla mia famiglia, per essere stati presenti in ogni momento, per avermi incoraggiata e per aver creduto in me, spesso più di quanto io credessi in me stessa. Il vostro sostegno e la vostra fiducia sono stati fondamentali per affrontare ogni sfida e raggiungere questo traguardo.

Al mio ragazzo, che mi ha sempre supportata (e sopportata) e fatto ridere anche nei momenti più complicati; grazie per essere sempre al mio fianco. Un grazie va anche alla sua famiglia, che mi ha accolta come una di loro.

In questi anni, purtroppo, sono venute a mancare molte persone care, insieme ad altre che non ho avuto la fortuna di conoscere. Ognuna di loro mi ha aiutato a diventare la persona che sono oggi. Il loro ricordo sarà sempre vivo nel mio cuore, e spero che, ovunque siano, possano essere orgogliose di me.

Questo percorso mi ha insegnato che dietro ogni conquista ci sono impegno, pazienza e la capacità di crederci, anche quando sembra difficile farlo.