



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO



Ministero dell'Istruzione  
dell'Università e Ricerca

*Università degli Studi di Bari,  
sede consorziata  
dell'Università degli Studi di Palermo*

**Facoltà di Farmacia**

**Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche  
Chimiche e Farmaceutiche**

DOTTORATO DI RICERCA  
in  
*“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”*

XXIV CICLO, A.A. 2010/2011

SSD CHIM/09

***TITOLO***

Nuove applicazioni dei polimeri mucoadesivi chitosano,  
glicole chitosano e loro derivati tiolati  
in campo biomedico-farmaceutico

**Coordinatore:**

*Ch.mo Prof. Gaetano Giammona*

**Tesi di Dottorato di Ricerca di:** *Claudio Palazzo*

**Tutor:**

*Ch.mo Prof. Giuseppe Trapani*

## INDICE

### CAPITOLO 1

<b>1.1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>pag. 5</b>
<b>1.2.FINALITÀ DELLA RICERCA.....</b>	<b>pag.10</b>

### CAPITOLO 2

<b>2.1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>pag.12</b>
<b>2.2.SCOPO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA.....</b>	<b>pag.14</b>
<b>2.3.MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag.15</b>
2.3.1. Sintesi del coniugato glicole chitosano-N-acetil cisteina (GCS-NAC)	pag.15
2.3.2.Sintesi del coniugato glicole chitosano-glutatione (GCS-GSH)	pag.16
2.3.3.Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)	pag.17
2.3.4.Spettroscopia di Risonanza magnetica nucleare del protone ( <sup>1</sup> H-NMR) e del carbonio ( <sup>13</sup> C-NMR)	pag.17
2.3.5.Analisi termica. Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	pag.17
2.3.6.Determinazione del peso molecolare medio dei coniugati polimerici mediante cromatografia d'esclusione (SEC)	pag.17
2.3.7.Determinazione del grado di sostituzione di gruppi tiolici liberi e totali con il saggio di Ellman	pag.18

2.3.8.Determinazione <i>in vitro</i> delle caratteristiche mucoadesive dei coniugati polimerici mediante il metodo turbidimetrico	pag.18
2.3.9.Determinazione <i>in vitro</i> delle caratteristiche mucoadesive dei coniugati polimerici mediante il metodo del potenziale Z	pag.19
2.3.10.Determinazione delle caratteristiche di rigonfiamento (swelling) dei coniugati polimerici sintetizzati	pag.19
2.3.11.Analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)	pag.20
2.3.12Preparazione delle colture cellulari	pag.20
2.3.13.Valutazione dell'interazione dei polimeri tiolati e non modificati con la P-gp	pag.20
<b>2.4.RISULTATI E DISCUSSIONI.....</b>	<b>pag.24</b>
<b>2.5.CONCLUSIONI.....</b>	<b>pag.40</b>
 <b>CAPITOLO 3</b>	
<b>3.1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>pag.41</b>
<b>3.2.SCOPO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA.....</b>	<b>pag.47</b>
<b>3.3.MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag.47</b>
3.3.1.Preparazione e caratterizzazione chimico fisica delle nanoparticelle mucoadesive e di forma allungata	pag.47
3.3.2.Idrolisi del glicole chitosano	pag.48
3.3.3.Procedura generale per la preparazione delle nanoparticelle di chitosano, glicole chitosano e loro derivati con PIBCA	pag.48

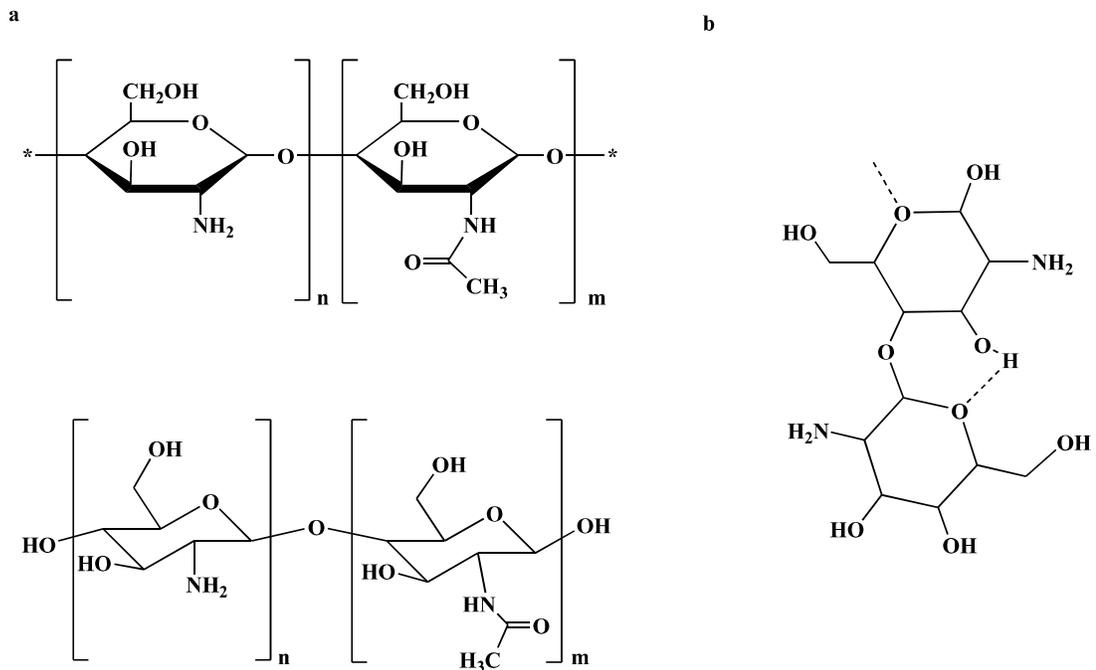
3.3.4.Procedura generale per la preparazione di nanoparticelle di chitosano, glicole chitosano e loro derivati con PIBCA contenenti Rhodamine B	pag.48
3.3.5.Preparazione di nanoparticelle di CSPIBCA allungate (ECIB)	pag.49
3.3.6.Purificazione delle ECIB ottenute con il film commerciale di STBT	pag.51
3.3.7.Size, potenziale Zeta e indice di polidispersione	pag.51
3.3.8.Transmission Electron Spectroscopy (TEM)	pag.51
3.3.9.Quantificazione dei gruppi tiolici mediante titolazione iodometrica	pag.52
3.3.10.Test di mucoadesione mediante contatto con tessuto intestinale di ratto	pag.52
3.3.11.Test di mucoadesione mediante l'utilizzo delle camere di Ussing	pag.54
<b>3.4.RISULTATI E DISCUSSIONI.....</b>	<b>pag.56</b>
<b>3.5.CONCLUSIONI.....</b>	<b>pag.71</b>
 <b>CAPITOLO 4</b>	
<b>4.1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>pag.72</b>
<b>4.2.SCOPO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA.....</b>	<b>pag.78</b>
<b>4.3.MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag.80</b>
4.3.1. Preparazione delle nanoparticelle di rame-chitosano (CuCS) a concentrazione di chitosano variabile	pag.80

4.3.2. Size, potenziale Z e indice di polidispersione	pag.81
4.3.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	pag.82
4.3.4. Analisi di superficie mediante spettroscopia elettronica a raggi X (XPS)	pag.82
4.3.5. Spettroscopia FT-IR	pag.83
4.3.6. Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	pag.83
4.3.7. Spettrofotometria ultravioletta (UV)	pag.83
4.3.8. Valutazione dell'attività antimicrobica delle nanoparticelle di CuCS su ceppi di <i>Escherichia Coli</i>	pag.83
<b>4.4.RISULTATI E DISCUSSIONI.....</b>	<b>pag.85</b>
<b>4.5.CONCLUSIONI.....</b>	<b>pag.98</b>
<b>OSSERVAZIONI CONCLUSIVE GENERALI.....</b>	<b>pag.99</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>pag,101</b>

## CAPITOLO 1

### 1.1 INTRODUZIONE

Il chitosano (CS) è un co-polimero a catena lineare caratterizzato dall'alternanza casuale di monomeri di 2-acetamido-2-deossi- $\beta$ -D-glucopiranosio e 2-amino-2-deossi- $\beta$ -D-glucopiranosio legati insieme da legami glicosidici di tipo  $\beta$ -(1-4). Il CS deriva dalla deacetilazione della chitina che rappresenta il secondo polisaccaride più abbondante in natura dopo la cellulosa poiché costituisce uno dei principali componenti dell' esoscheletro di insetti e crostacei ed è presente anche in alcuni funghi. A causa della scarsa solubilità della chitina in acqua o in molti solventi organici, essa, al contrario del chitosano, trova scarso impiego in campo biomedico e farmaceutico. Per la preparazione del CS, la chitina subisce un processo di deacetilazione in presenza di alcali. In particolare tale deacetilazione è realizzata mediante idrossido di sodio o di potassio, o mediante l'utilizzo di una soluzione di idrazina anidra e idrazina solfato.<sup>(1)</sup> Il grado di deacetilazione è determinato dalle condizioni di reazione utilizzate. I gruppi amminici liberi, a pH fisiologico, risultano essere protonati, con la formazione di una carica elettrica positiva e pertanto il CS è un policatione vale a dire un polielettrolita con cariche positive localizzate sulla catena polimerica. Inoltre i gruppi amminici liberi del CS si prestano a modifiche strutturali dando luogo a suoi derivati con caratteristiche chimico-fisiche anche molto differenti dal polimero originario. Il CS presenta una struttura cristallina rigida, grazie alla formazione di legami idrogeno inter- e intra-catena (**Figura 1**).



**Figura 1. (a) Struttura chimica del chitosano e (b) legami idrogeno intracatena**

Il CS può essere considerato per lo più idrofilico, anche se questa caratteristica è legata alla percentuale di monomeri acetilati, alla loro distribuzione, ed anche al suo peso molecolare. Tali caratteristiche influenzano considerevolmente la solubilità del polimero in acqua. La solubilità del chitosano è infatti fortemente dipendente dal grado di ionizzazione dei residui amminici liberi, e quindi dal pH del mezzo. Infatti, il CS risulta molto più solubile a pH acidi dove i gruppi amminici liberi sono protonati e quindi caricati positivamente.

Il CS ha caratteristiche farmaceutiche molto interessanti quali notevoli proprietà mucoadesive, è in grado di aprire le tight junctions epiteliali,<sup>(2-4)</sup> è biodegradato da diversi enzimi come il lisozima, e da alcuni enzimi di origine batterica presenti nelle mucose umane e in altri fluidi biologici. La velocità di degradazione del CS è strettamente legata alla lunghezza delle catene che lo compongono.<sup>(5-7)</sup> La velocità di degradazione del CS può essere valutata considerando la variazione di viscosità di una soluzione del polimero trattata con lisozima. In queste condizioni, infatti, la viscosità della soluzione stessa varia per effetto della degradazione enzimatica, ed in particolare il CS a basso peso molecolare

tende ad essere degradato più rapidamente. Infatti è proprio il lisozima e gli enzimi prodotti dai batteri presenti nel colon a svolgere un ruolo predominante nella degradazione di tale polimero. La velocità di degradazione del chitosano è grado di deacetilazione-dipendente.<sup>(8, 9)</sup> È biocompatibile ed è per questo motivo che tale polimero è molto studiato per diverse applicazioni tra cui rilascio controllato di farmaci, gene delivery, ingegneria tissutale e medicina rigenerativa.<sup>(10-12)</sup> È altresì noto che il CS presenta citotossicità dose-dipendente con una concentrazione massima di inibizione (inhibitory concentration IC<sub>50</sub>) che varia da 0,2 a 2 mg/ml nella maggior parte dei modelli cellulari (cellule miocardiche, endoteliali, epiteliali, fibroblasti, epatociti, condriociti e cheratinociti), e tale citotossicità è strettamente legata al peso molecolare e al grado di deacetilazione. Infatti la presenza dei gruppi amminici è la causa dell'interazione con la membrana cellulare. Il CS e i suoi prodotti di degradazione sono anche in grado di attivare la proliferazione dei macrofagi e dei linfociti senza la comparsa dei sintomi infiammatori nonché inibire la secrezione di citochine. In seguito a test *in vivo* fatti su conigli e cani il CS è risultato citotossico con dosi comprese tra 5 e 50 mg/kg/giorno.<sup>(13)</sup>

Il CS ha mostrato notevoli capacità mucoadesive e risulta essere un polimero bioadesivo naturale in grado di aderire ai tessuti molli e duri dell'organismo. In particolare il CS mostra una buona adesione verso i tessuti intestinali, e nei tessuti rivestiti di mucosa. È per tale motivo che sono stati sviluppati un elevato numero di sistemi a rilascio modificato basati sul CS per la veicolazione trans-mucosale di farmaci polari, peptidi, proteine, vaccini e DNA. I test clinici svolti sui biomateriali basati sul CS dimostrano che queste formulazioni non provocano reazioni allergiche o infiammatorie in seguito a somministrazione parenterale, uso topico, impianti o assunzione per via orale.<sup>(14)</sup> Uno dei settori attualmente investigati riguardanti il CS è la sua biodistribuzione derivante da somministrazioni differenti dalla via intravenosa. La biodistribuzione di farmaci contenuti nelle formulazioni a base di CS è strettamente legata al peso molecolare del polimero, al suo grado di deacetilazione, e alla grandezza dei sistemi utilizzati. Inoltre, per quanto riguarda la biodistribuzione di sistemi nanoparticellari a base di chitosano, le varianti importanti da considerare sono le dimensioni e la carica superficiale (potenziale Z). In seguito alla decomposizione delle nanoparticelle e conseguente liberazione del farmaco in esso incapsulato all'interno delle cellule o del tessuto bersaglio, il CS libero si distribuisce nel corpo ed in seguito eliminato per via renale. Nel processo di metabolizzazione del CS il

fegato è il principale centro di accumulo del CS in seguito all'azione delle cellule di Kupfer.<sup>(15)</sup> Diversi studi hanno dimostrato che il CS lega il grasso corporeo ed è in grado di ridurre il colesterolo, ma il meccanismo d'azione non è ancora ben chiaro.<sup>(16)</sup> L'assorbimento del chitosano in seguito a somministrazione orale è strettamente legato al suo peso molecolare. Infatti piccoli oligomeri mostrano la capacità di essere assorbiti dalle cellule che compongono il tessuto intestinale. Al contrario, il CS ad elevato peso molecolare è escreto senza essere assorbito.

Il CS è considerato un polimero non tossico, biologicamente compatibile ed è infatti utilizzato in regimi dietetici in Giappone, Italia e Finlandia<sup>(17)</sup> ed è stato approvato dalla FDA come medicamento per le escoriazioni. Però alcune modifiche alla struttura chimica del polimero possono provocare un aumento o diminuzione della tossicità. A tal proposito come già menzionato, numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato una notevole correlazione delle caratteristiche di tossicità del CS col peso molecolare e col grado di deacetilazione. Infatti in presenza di un elevato grado di deacetilazione la tossicità è fortemente dipendente dalla concentrazione e dal peso molecolare del CS utilizzato. Invece, con un grado di deacetilazione più basso il CS è meno tossico a prescindere dal suo peso molecolare. Un'altra caratteristica molto importante è che il CS risulta essere tossico per diversi tipi di batteri,<sup>(18)</sup> miceti e parassiti.<sup>(19)</sup> Tale caratteristica può essere utilizzata per la formulazione di forme farmaceutiche utilizzabili per il controllo di infezioni microbiche. L'inibizione della crescita batterica è particolarmente rilevante a pH 5-5,3 con CS di 87 kDa e con 92% di grado di deacetilazione, in particolar modo nei confronti della *Pseudomonas Aeruginosa* e *Staphilococcus Aureus*. Lo stesso chitosano, ma in una soluzione lipidica, risulta invece attivo nei riguardi di miceti come la *Candida Albicans* o l'*Aspergillus Niger*.<sup>(18)</sup> Tuttavia in nessuno degli studi effettuati sono stati proposti meccanismi d'azione per razionalizzare l'attività antimicrobica del CS.

Il CS si presta a diverse formulazioni tecnologico-farmaceutiche essendo in grado di controllare il rilascio di principi attivi e le sue formulazioni non necessitano dell'utilizzo di solventi organici potenzialmente tossici. Il CS è stato utilizzato per la preparazione di formulazioni mucoadesive, per aumentare la solubilità di principi attivi scarsamente idrosolubili,<sup>(20)</sup> per il rilascio sito specifico (drug targeting)<sup>(21, 22)</sup> e per favorire l'assorbimento di peptidi.<sup>(23)</sup> Per quanto riguarda le caratteristiche mucoadesive in particolare, bisogna mettere in evidenza che notevoli sforzi sono stati effettuati per

aumentare ulteriormente le già favorevoli caratteristiche del polimero. A tale riguardo, risultati eccellenti sono stati conseguiti modificando la struttura chimica del CS introducendo gruppi tiolici nella catena polimerica di questo polimero.<sup>(24)</sup> Questi derivati tiolati del CS appartengono alla classe di composti noti come “Tiomeri” che sono caratterizzati da ottimali proprietà mucoadesive in quanto essi possono formare legami covalenti con le glicoproteine costituenti la mucina mediante reazioni di scambio tiolo-disolfuro. I tiomeri inoltre hanno mostrato altre interessanti caratteristiche come la capacità di agire come “permeation enhancers” e come inibitori delle pompe di efflusso quali la glicoproteina-P (P-gp).<sup>(25-27)</sup> Questi risultati inducono a pensare che i tiomeri possono essere molto utili nella veicolazione di farmaci substrati della P-gp come molti antitumorali e farmaci che devono superare la Barriera Emato-Encefalica (BEE) che è nota esprimere la suddetta pompa di efflusso. Le caratteristiche positive del CS ne hanno incoraggiato l’uso come biomateriale per sistemi micro- nano-particellari (MPs e NPs, rispettivamente) e idrogeli.<sup>(24)</sup> Le NPs a base di CS, in particolare, hanno la capacità di incapsulare e veicolare diversi tipi di principi attivi, mantenendo la capacità di interagire con i tessuti biologici favorendo l’assorbimento del principio attivo stesso.<sup>(13)</sup>

## 1.2 FINALITA' DELLA RICERCA

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati nuovi tiomeri di un derivato del CS, precisamente il glicole chitosano (GCS), polimero che, diversamente dal CS, è solubile anche a pH fisiologico. La migliore solubilità del GCS e dei suoi tio-derivati, infatti, rendono questi polimeri una valida alternativa all'utilizzo del CS in fase formulativa. Inoltre sono stati preparati nuovi materiali compositi nanostrutturati quali nanoparticelle di rame rivestite di CS (CuCS NPs) e nanoparticelle caratterizzate da un core di poli-(isobutil)cianoacrilato (PIBCA) e rivestite da tiomeri. Lo scopo di questi studi è stato quello di individuare ulteriori applicazioni del CS cercando di superare anche alcune limitazioni intrinseche del CS stesso come per esempio la sua insoddisfacente solubilità a pH fisiologico.

Questa tesi di dottorato è articolata in tre capitoli in ciascuno dei quali vengono affrontate particolari tematiche e vengono illustrate le nuove applicazioni. In particolare, nel primo capitolo dopo aver riportato i dettagli sintetici dei nuovi tiomeri del GCS, viene descritto uno studio comparativo concernenti le proprietà mucoadesive dei tiomeri del CS, del GCS e dei corrispondenti polimeri non modificati e precisamente CS e GCS come tali. Inoltre, viene descritto anche uno studio comparativo riguardanti la capacità di inibire la pompa d'efflusso P-gp e, di notevole interesse, è stato messo in evidenza che non solo i derivati tiolati, ma anche il polimero non modificato GCS è in grado di inibire la pompa d'efflusso. La conseguenza pratica immediata di questo risultato è che il GCS, polimero commercialmente disponibile, può essere valido candidato per la formulazione di farmaci substrati della pompa d'efflusso quali numerosi antitumorali e numerosi farmaci agenti a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Nel secondo capitolo viene affrontata una tematica ad oggi poco investigata e che si riferisce all'effetto della forma geometrica di un sistema nano strutturato sulle caratteristiche farmacocinetiche di quest'ultimo. Infatti, la maggior parte dei metodi di preparazione di sistemi nanostrutturati come la nanoparticelle polimeriche forniscono particelle di forma sferica. Appare interessante quindi valutare l'effetto della variabile "forma geometrica (shape)" di detti sistemi sulle loro proprietà chimico fisiche e di biodistribuzione. Per tali scopi sono state preparate nanoparticelle polimeriche caratterizzate da un core di poli-(isobutil)cianoacrilato (PIBCA) rivestite di CS. Queste

ultime nanoparticelle sono state con successo allungate e la metodologia appare di utilizzo più generale.

Nel terzo capitolo, infine, viene affrontata la tematica concernente la combinazione dell'attività antibatterica propria del CS con quella propria delle nanoparticelle di rame. La motivazione di questo studio è da ricercarsi nella esigenza di trovare nuove sostanze ad azione antibiotica per superare il problema della resistenza agli antibiotici oggi noti.

Questi materiali compositi CuCS NPs sono stati sintetizzati con una tecnica che utilizza il raggio laser e nota come "laser-ablation". Di questi materiali è stata valutata l'attività antimicrobica nei riguardi dell'*Escherichi Coli* preso come modello e i risultati hanno confermato la validità di questi nanoantibiotici nel prevenire la crescita batterica.

## CAPITOLO 2

### 2.1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, è stata posta notevole attenzione allo sviluppo di sistemi di rilascio formulati con polimeri mucoadesivi per la veicolazione di farmaci somministrabili per via transmucosale.<sup>(25)</sup> Il vantaggio nell'utilizzo di questi polimeri è dovuto alla loro capacità di stabilire un contatto intimo maggiore con le mucose e, di conseguenza, ne deriva un aumento del tempo di contatto del farmaco con il tessuto e quindi un aumento del suo assorbimento.<sup>(26)</sup> In particolare, i polimeri mucoadesivi svolgono un ruolo importante nella somministrazione orale del farmaco che, come è noto, rappresenta la via di somministrazione più accettata essendo indolore e con alta compliance da parte del paziente. Tuttavia, questi materiali mucoadesivi mostrano alcune limitazioni quali la loro azione dipendente dal pH.<sup>(27)</sup> Così, negli ultimi anni, sono stati fatti molti sforzi per sviluppare nuovi polimeri mucoadesivi in grado di superare questi inconvenienti.

Il chitosano (CS), polimero policationico, offre molti vantaggi per la somministrazione di farmaci essendo biodegradabile, biocompatibile e non tossico.<sup>(13, 28)</sup> Inoltre, è dotato di ottime proprietà mucoadesive grazie alle interazioni ioniche tra i gruppi amminici cationici del CS e gruppi funzionali carichi negativamente (come l'acido sialico) del muco. Il CS è anche in grado di allargare le giunzioni strette epiteliali migliorando l'assorbimento dei farmaci idrofili.<sup>(29)</sup> Tuttavia, uno svantaggio di questo polimero è la sua scarsa solubilità a valori di pH fisiologici. Infatti, a causa del pKa del gruppo amminico del CS (compreso tra 5,5 e 6,5), il policatione risulta praticamente insolubile a pH superiori a 6,5. Per superare questo problema, sono stati sintetizzati vari derivati chimicamente modificati del chitosano tra i quali di particolare interesse è il glicole chitosano (GCS), un derivato del polimero coniugato con porzioni di glicole etilenico, il quale risulta solubile in acqua anche a pH neutro.<sup>(30, 31)</sup>

Come evidenziato nel Capitolo 1, per migliorarne le caratteristiche mucoadesive del CS, sono stati introdotti tio-derivati del chitosano appartenenti alla famiglia dei tiomeri. Esempi

di tiomeri del CS sono il chitosano-N acetil cisteina (CS-NAC) e il chitosano-glutatione (CS-GSH).<sup>(32, 33)</sup> Tuttavia, fino ad oggi, sono stati sintetizzati pochissimi esempi di tiomeri basati sul GCS. Tra questi, di particolare importanza è il GCS accoppiato con acido tioglicolico sintetizzato per migliorare la somministrazione polmonare di calcitonina.<sup>(34)</sup> Analogamente il glicole chitosano tiolato legato all' $\alpha$ -ciclodestrina ha dimostrato la sua utilità nella realizzazione di forme farmaceutiche a rilascio sostenuto contenenti l'ormone della crescita umano,<sup>(35)</sup> così anche i complessi glicole chitosano tiolato-siRNA si sono mostrati utili per la veicolazione sistemica del siRNA nel trattamento di alcuni tipi di tumori.<sup>(36)</sup>

Oltre alle interessanti proprietà mucoadesive, il chitosano ed i suoi tiomeri hanno attirato molta attenzione anche per la loro capacità, dimostrata da diversi studi *in vitro* e *in vivo*, di agire come promotori della permeazione e come inibitori della pompa di efflusso glicoproteina-P (P-gp).<sup>(37-39)</sup>

Infatti è stato dimostrato che il chitosano-tiobutilammide migliora notevolmente il trasporto transmucosale della rodamina 123 (Rho-123), il quale è un eccellente substrato della P-gp.<sup>(38)</sup> Questi risultati suggeriscono che questi tiomeri possono avere un elevato potenziale nel migliorare la somministrazione orale di farmaci appartenenti alla classe III e IV del sistema di classificazione biofarmaceutica (BCS). La maggior parte dei composti appartenenti a queste classi sono substrati della glicoproteina P e la loro possibilità di somministrazione per via orale è limitata. In particolare, questi polimeri possono essere utili per la veicolazione orale di farmaci antitumorali e questo tipo di somministrazione è considerata una valida alternativa alla via endovenosa.<sup>(40, 41)</sup> D'altra parte, una potenziale applicazione dei polimeri in grado di modulare l'attività della P-gp può anche essere quello di favorire il trasporto attraverso la barriera ematoencefalica (BEE) di farmaci che agiscono sul SNC ma che sono substrati della P-gp con il risultato di aumentare la loro biodistribuzione a livello cerebrale.<sup>(42)</sup>

## 2.2. SCOPO DELL'ATTIVITA' DI RICERCA

Partendo da queste premesse, sono stati preparati nuovi tiomeri del GCS e quindi si è proceduto a valutare le loro proprietà mucoadesive e a confrontarle rispetto a quelle mostrate dai polimeri corrispondenti basati sul CS. Nello specifico, sono stati preparati e caratterizzati i polimeri glicole chitosano-N acetilcisteina (GCS-NAC) e glicole chitosano - glutatione (GSH-GCS).

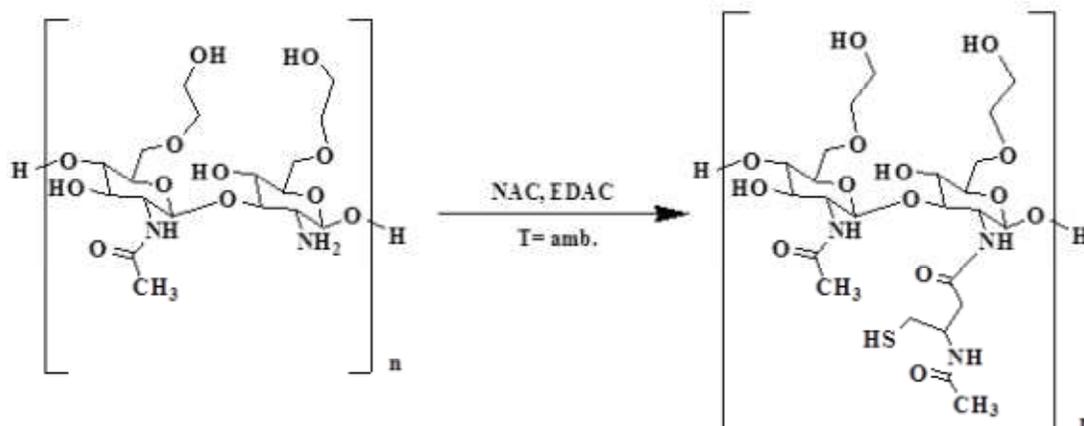
Le loro proprietà mucoadesive sono state studiate applicando due test *in vitro*, utilizzando come composti di riferimento, i corrispondenti polimeri genitori non coniugati (CS e GCS). Inoltre si è proceduto a caratterizzare i polimeri a dal punto di vista delle loro caratteristiche di superficie, in modo da poter meglio comprendere la relazione esistente tra composizione chimica superficiale e le loro proprietà mucoadesive. Infine si è proceduto a studiare l'interazione tra i polimeri GCS-NAC e GCS con la P-gp espressa nelle cellule MCDK-MDR1 e nelle cellule Caco-2 utilizzando rispettivamente la calceina-AM e Rho-123 come probes fluorescenti per la P-gp.

In definitiva l'obiettivo del lavoro descritto nel presente Capitolo è stato quello di effettuare uno studio comparativo tra CS, GCS e tiomero-derivati per quel che riguarda la mucoadesività e di interazione con la pompa di efflusso P-gp. In tal senso è stato riscontrato un diverso grado di mucoadesione tra le diverse serie di polisaccaridi ed è stato evidenziato un comportamento interessante del GCS e del GCS-NAC per quel che riguarda l'interazione con la pompa di efflusso P-gp.

### 2.3. MATERIALI E METODI

Chitosano (CS, peso molecolare 50-190 kDa, grado di deacetilazione 75-85 %), glicole chitosano (GCS, peso molecolare 400 kDa), glutatione (GSH), N-acetil cisteina (NAC) 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato (EDAC), acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (reagente di Ellman), la mucina dallo stomaco di maiale (tipo II, con contenuto in acido sialico di ~1%) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich. I reagenti utilizzati per la coltura cellulare sono stati acquistati da Celbio srl (Milano, Italia). Le piastre CulturePlate 96/wells sono state acquistate da PerkinElmer Life Science; le piastre a 96 pozzetti Millicell per il saggio di trasporto della P-gp sono acquistati da Merck Millipore; la calceina-AM e la rodamina-123 sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

#### 2.3.1. Sintesi del coniugato glicole chitosano-N-acetil cisteina (GCS-NAC)

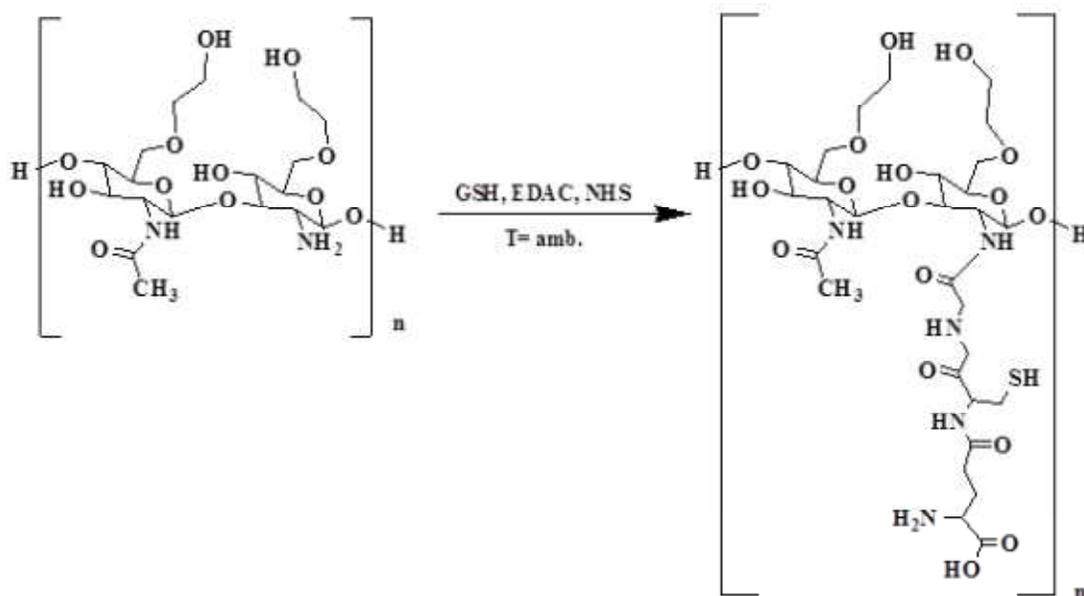


**Figura 1.** Schema di sintesi del glicole chitosano-N acetil cisteina

La sintesi del derivato polimerico GCS-NAC è stata effettuata secondo lo schema riportato in **Figura 1**. Il glicole chitosano (100 mg) è stato solubilizzato in 10 ml di acido cloridrico 0,2 mM e il pH è stato fissato a 6 con l'aggiunta di NaOH. A parte sono state solubilizzate N-acetilcisteina (100 mg, 0,6 mmol) ed EDAC (141 mg, 0,73 mmol) in 10 ml di acido cloridrico 0,2 mM. Quindi la soluzione polimerica è stata aggiunta a gocce nella soluzione di EDAC ed N-acetilcisteina. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente, con

agitazione magnetica per una durata di 7 ore. In seguito, la soluzione polimerica è stata trasferita in tubi di dialisi (MWCO 12.000-14.000) previamente idratate in acqua distillata. La dialisi è stata dapprima effettuata per 24 ore utilizzando come soluzione esterna ai tubi di dialisi 1 litro di una soluzione di acido cloridrico 0,2 mM, poi per altre 24 ore 1 litro di una soluzione di acido cloridrico 0,2 mM ed EDTA per una concentrazione finale 2  $\mu$ M ed infine per altre 24 ore 1 litro di una soluzione di acido cloridrico 0,2 mM. Dopo la dialisi la miscela è stata congelata e l'acqua è stata allontanata mediante liofilizzazione per 72 ore (0,016 mBar, Christ Alpha 1-4 LSC). Il polimero è stato conservato a 4°C.

### 2.3.2. Sintesi del coniugato glicole chitosano-glutazione (GCS-GSH)



**Figura 2. Schema di sintesi del glicole chitosano-glutazione**

La sintesi del derivato polimerico GCS-GSH è stata effettuata secondo lo schema riportato in **Figura 2**. Il glicole chitosano (100 mg) è stato solubilizzato in 10 ml di acido cloridrico 0,2 mM e il pH è stato aggiustato a 6 con l'aggiunta di NaOH 1mM. A parte sono state solubilizzati Glutazione (300 mg, 0,98 mmol), EDAC (225 mg, 1,17 mmol) ed *N*-Idrossi succinimmide (134,7 mg, 1,17 mmol) in 10 ml di acido cloridrico 0,2 mM. Quindi la soluzione polimerica è stata aggiunta a gocce alla soluzione di GSH, EDAC ed NHS. La

reazione è stata condotta a temperatura ambiente, con agitazione magnetica per una durata di 7 ore. Quindi la miscela è stata trattata come riportato in precedenza per il coniugato glicole chitosano-N-acetil cisteina.

### **2.3.3. Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)**

Gli spettri FT-IR sono stati registrati utilizzando un'apparecchiatura Perkin-Elmer 1600 e dischi di KBr (2 mg del campione in 200 mg di KBr). Le scansioni sono state effettuate tra 450 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , con una risoluzione di 1  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3.4. Spettroscopia di Risonanza magnetica nucleare del protone ( $^1\text{H-NMR}$ ) e del carbonio ( $^{13}\text{C-NMR}$ )**

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$ ) sono stati registrati in  $\text{D}_2\text{O}$  utilizzando uno strumento Varian Mercury 300 MHz.

### **2.3.5. Analisi termica. Calorimetria differenziale a scansione (DSC)**

Per l'analisi DSC è stato utilizzato uno strumento Mettler-Toledo DSC 822e Star 202 System utilizzando campioni di circa 5 mg e crogioli di alluminio perforati nella parte superiore. Indio con una purezza del 99.99% è stato usato come riferimento. Le analisi DSC sono state condotte riscaldando il campione da una temperatura di 25°C a 250°C a 5°C al minuto, sotto un flusso d'azoto di 50  $\text{cm}^3/\text{min}$ .

### **2.3.6. Determinazione del peso molecolare medio dei coniugati polimerici mediante cromatografia d'esclusione (SEC)**

Il peso molecolare medio dei coniugati polimerici preparati è stato determinato mediante SEC utilizzando un apparecchio della Waters Associates (Mildford, MA) Modello 1515, una pompa per HPLC operante in condizioni isocratiche, un rivelatore ad indice di rifrazione (Waters 2414 RID) e una colonna Ultrahydrogel 500 (intervallo d'esclusione 1–500 kDa). Una soluzione 0.05 M di tampone fosfato pH 7.2 è stata usata come fase mobile a 35°C, flusso di 1 ml/min e standards di destrano (Cut-off 5–100 kDa). I dati cromatografici sono stati processati mediante il software Waters Breeze.

### **2.3.7. Determinazione del grado di sostituzione di gruppi tiolici liberi e totali con il saggio di Ellman**

La determinazione dei gruppi tiolici liberi è stata effettuata seguendo il saggio di Ellman.<sup>(43)</sup> Sono stati solubilizzati 5 mg di polimero in 2,5 ml di acqua distillata. Quindi sono stati prelevati 250 µl di soluzione polimerica e fatti reagire con 500 µl della soluzione di reattivo di Ellman. Quest'ultimo è stato preparato a parte solubilizzando 3 mg di reattivo in 10 ml di tampone fosfato (PBS) a pH 8. La reazione è stata condotta per 2 ore a temperatura ambiente. In seguito la soluzione è stata centrifugata a 24.000 g per 5 minuti; il sovranatante è stato prelevato e ne è stata misurata l'assorbanza a 450 nm. I risultati sono stati calcolati utilizzando una retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di N-acetil cisteina e/o GSH.

La determinazione dei gruppi tiolici totali presenti nei coniugati polimerici è stata effettuata utilizzando il saggio di Ellman dopo aver ridotto i gruppi disolfuro a tiolici con una soluzione al 3% di NaBH<sub>4</sub>.

### **2.3.8. Determinazione *in vitro* delle caratteristiche mucoadesive dei coniugati polimerici mediante il metodo turbidimetrico**

Le caratteristiche mucoadesive dei derivati polimerici sono state valutate a due valori di pH e precisamente pH 7 e pH 3,2. Il primo pH è stato realizzato con tampone fosfato PBS, mentre il secondo con CH<sub>3</sub>COOH 0,1% v/v. A 2,5 ml di soluzione del polimero in PBS di concentrazione 1 mg/ml sono stati aggiunti 2,5 ml della dispersione di mucina. La dispersione di mucina è stata precedentemente preparata disperdendo la mucina in PBS (1 mg/ml di tampone) ed incubata a 37°C per 24 ore in agitazione (150 rpm). Quindi è stata misurata la trasmittanza percentuale della miscela alla λ 500 nm utilizzando uno strumento Perkin-Elmer Spectrometer Lambda Bio20. Questa operazione è stata ripetuta a differenti tempi di incubazione (1, 2, 3, 5, 15, e 24 ore). Ogni misura è stata replicata 3 volte. Lo stesso procedimento è stato ripetuto solubilizzando inizialmente i derivati polimerici in acido acetico 0,1% v/v. Come controllo sono stati utilizzati idrossietilcellulosa e carbopol 934.

### 2.3.9. Determinazione *in vitro* delle caratteristiche mucoadesive dei coniugati polimerici mediante il metodo del potenziale Z

L'interazione mucoadesiva fra i coniugati polimerici preparati e mucina è stata determinata anche registrando le variazioni di potenziale zeta secondo il metodo riportato in letteratura da Takeushi et al.<sup>(44)</sup> In breve, la mucina dallo stomaco di maiale (tipo II) è stata dapprima sospesa a temperatura ambiente alla concentrazione dell'1% (w/v), a pH 7 in TRIS 10 mM. Un millilitro di questa sospensione è stata mescolata con differenti volumi di soluzioni di polimero (1 mg/ml) in CH<sub>3</sub>COOH 0.1% v/v o in TRIS 10 mM (pH 7) alla temperatura di 37 °C in agitazione (150 rpm) per 15 minuti. Il potenziale zeta della miscela mucina-polimero risultante è stato misurato utilizzando uno strumento Zetasizer NanoZS (ZEN 3600, Malvern, UK). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

### 2.3.10. Determinazione delle caratteristiche di rigonfiamento (swelling) dei coniugati polimerici sintetizzati

Per la determinazione delle caratteristiche di rigonfiamento dei coniugati polimerici preparati, sono state allestite delle compresse a faccia piana di polimero (circa 30 mg) utilizzando una pressa a punzone unico e forza di compattazione costante. Le compresse, di diametro 0,9 cm, sono state posizionate su filtri Gooch N°3, previamente pesati, quindi sono state immerse in acqua bidistillata. A tempi prefissati, l'eccesso di acqua è stato allontanato per filtrazione a bassa pressione e i filtri sono stati pesati. Tale operazione è stata ripetuta a diversi tempi di immersione (10, 20, 40 e 60 minuti). L'acqua ritenuta è stata espressa come

$$\text{Indice di swelling} = \left( \frac{P_F - P_I}{P_I} \right) \times 100$$

(dove  $P_F$  è il peso finale del polimero e del filtro,  $P_I$  è il peso iniziale del filtro e della compressa) o come valore Swelling ratio (q). Quest'ultimo è definito come il rapporto tra  $P_F$  e  $P_I$ . Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato e i risultati sono riportati come medie  $\pm$ SD.

### **2.3.11. Analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)**

Le analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) sono state eseguite utilizzando uno strumento Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Germania) Theta Probe. Lo spettrometro è dotato di una sorgente monocromatica  $AlK\alpha$  con il fascio variabile di dimensioni (20-400 micron). Le misure sono state eseguite utilizzando un monocromatore a Raggi X da 300 micron in modalità di analisi energetica costante (constant analyser energy, CAE). Sono stati acquisiti spettri ad ampia scansione e ad alta risoluzione, utilizzando un'energia di passaggio rispettivamente di 150 e 100 eV,. Gli effetti di carica sulla superficie dei campioni sono stati compensati utilizzando un flood-gun con energia elettronica bassa (-1 eV), operando con potenziale di estrazione di 40 V. La calibrazione della scala dell'energia di legame è stata effettuata impostando il segnale dei carboni alifatici C1s a  $284,8 \pm 0,1$  eV. I dati sono stati mediati su almeno tre punti per campione. L'acquisizione e la successiva elaborazione degli spettri sono stati eseguiti utilizzando il software Thermo Advantage (v 5.24, © 1999-2010 Thermo Fisher Scientific).

### **2.3.12. Preparazione delle colture cellulari**

Le cellule MDCK-MDR1 sono state gentilmente concesse dal Prof. P. Borst, NKI-AVL Institute, Amsterdam, Nederland. Tutte le cellule MDCK sono state coltivate in DMEM con una elevata concentrazione di glucosio e con l'aggiunta di siero fetale bovino al 10%, glutammina 2 mM, penicillina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml), in un incubatore umidificato a 37 ° C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%. Le cellule Caco-2 sono state donate dal Dr. Aldo Cavallini e della Dott. Caterina Messa del laboratorio di biochimica, Istituto Nazionale per le Malattie Digestive, "S. de Bellis ", Bari (Italia).

### **2.3.13. Valutazione dell'interazione dei polimeri tiolati e non modificati con la P-gp**

*- Esperimento alla calceina-AM*

L'attività di inibizione dei polimeri nei confronti della P-gp è stata determinata misurando la fluorescenza ottenuta in seguito all'azione della calceina – AM, utilizzata come sonda sulla linea cellulare MDCK-MDR1.<sup>(45)</sup> Tali cellule epiteliali renali canine transfettate

producono un'elevata quantità di P-gp. Al contrario, tutti gli altri trasportatori proteici sono pressoché inespressi. Tale caratteristica è essenziale per valutare l'effetto biologico inibitorio dei polimeri testati sulla P-gp. Le cellule MDCK - MDR1 (30 000 cellule per pozzetto) sono state seminate in piastre di coltura da 96 pozzetti ed incubate per 24 ore fino a completa confluenza cellulare.<sup>(45)</sup> I polimeri, disciolti in 100 µl di terreno di coltura, sono stati aggiunti ai monostrati cellulari. Le piastre sono quindi state incubate a 37 °C per 30 minuti. In seguito la calceina-AM (100 µl), previamente disciolta in tampone fosfato (PBS), è stata aggiunta alle cellule con una concentrazione finale pari a 2,5 mM, e la piastra è stata nuovamente incubata per 30 minuti a 37 °C. Dopo lavaggio di ciascun pozzetto con PBS conservato a 0 °C, è stato aggiunto lo stesso tampone ad ogni pozzetto ed è stata quindi misurata la fluorescenza ( $\lambda$  di eccitazione 485 nm,  $\lambda$  di emissione 535 nm; fluorimetro Victor3, PerkinElmer). Tramite questo procedimento è possibile valutare l'accumulo di calceina all'interno delle cellule, in assenza ed in presenza dei polimeri testati. La fluorescenza basale delle cellule è stata ottenuta misurando il segnale fluorescente delle cellule non trattate. I valori di EC50 sono stati determinati considerando l'aumento di fluorescenza percentuale in funzione del logaritmo della dose testata.

*- Saggio dell' ATPasi*

Le cellule MDCK-MDR1 sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti, (20.000 cellule per pozzetto) e la piastra è stata incubata per 24 ore in atmosfera umidificata, al 5% di CO<sub>2</sub> a 37 °C.<sup>(46)</sup> In seguito si è proceduto a rimuovere il medium di coltura, che è stato sostituito con 100 µl di terreno di coltura contenente i polimeri da analizzare. Il bianco è stato ottenuto utilizzando un terreno di coltura privo dei campioni in esame. La piastra è stata incubata per 2 ore in atmosfera umidificata, con il 5% di CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Al termine delle 2 ore in ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di soluzione litica di cellule di mammifero e la piastra è stata mantenuta in agitazione per cinque minuti in uno scuotitore orbitale. Quindi sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50 µl della soluzione di substrato, e la piastra è stata mantenuta in agitazione nuovamente per altri cinque minuti. La piastra è stata dunque conservata per dieci minuti al riparo dalla luce, ed in seguito si è proceduto a misurarne la luminescenza.

*- Saggio di permeabilità. Preparazione del monostrato di cellule Caco-2:*

Le cellule Caco-2 sono state coltivate in DMEM con l'aggiunta del 10% di siero fetale di vitello, inattivato mediante calore, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina e L-glutamina (2mM). Poi le cellule sono state raccolte con una soluzione di tripsina-EDTA e seminate con una densità di 10.000 cellule per pozzetto. Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 48 h per i primi 6 giorni e ogni 24 ore successivamente, e dopo 21 giorni di coltura, il monostrato di Caco-2 è stato utilizzato per gli esperimenti di permeabilità. La resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER ) dei monostrati cellulari è stata misurata ogni giorno prima e dopo l'esperimento utilizzando un voltmetro epiteliale (Millicell®-ERS; Millipore, Billerica, MA). In generale, i valori di TEER ottenuti sono stati superiori a 1000 Ω per una coltura di 21 giorni.

*- Esperimento di trasporto della polimero*

La permeabilità del polimero dal compartimento apicale al basolaterale ( Papp , AB) e dal basolaterale all'apicale (Papp, BA) è stata misurata a 120 minuti.<sup>(47-50)</sup> I polimeri sono stati sciolti in tampone Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH 7.4 (HBSS) a pH 7,4 e quindi sottoposti a filtrazione sterilizzante. Dopo 21 giorni di crescita cellulare, il mezzo di coltura è stato rimosso dai compartimenti donori e dai corrispondenti riceventi. Quindi si è proceduto ad aggiungere la soluzione di GCS o GCS-NAC (10 mg/ml in terreno DMEM ) ai compartimenti donori (75 µl per pozzetto ) e ai compartimenti riceventi (250 µl per pozzetto ).

Dopo 24 ore, è stato rimosso il mezzo da entrambi i compartimenti. I compartimenti donori sono quindi stati lavati due volte con 75 ml di tampone HBSS fresco e le piastre sono state incubate a 37°C per 30 minuti. Quindi è stato rimosso il tampone HBSS e ai pozzetti donori sono stati aggiunti 75 µl di una soluzione di rodamina ( $1 \times 10^{-4}$  M) o di polimero ad una concentrazione di 10 mg/ml. Al pozzetto ricevente sono invece stati aggiunti 250 µl di tampone HBSS. Le piastre sono state incubate a 37 ° C per 120 min . Dopo incubazione, i campioni sono stati rimossi dalla parte apicale (pozzetti donori) e basolaterale del monostrato e quindi sono stati conservati in un congelatore (-20°C). La concentrazione di rodamina è stata misurata utilizzando la spettroscopia UV, la permeabilità apparente (Papp ), misurata in unità di nm al secondo, è stato calcolata utilizzando la seguente equazione :

$$P_{app} = \left( \frac{V_A}{\text{Area} \times \text{tempo}} \right) \times \left( \frac{[\text{polimero}]_{\text{accettore}}}{[\text{polimero}]_{\text{iniziale}}} \right)$$

dove  $V_A$  è il volume (in ml) nel compartimento accettore; Area è l'area superficiale della membrana (0,11 cm<sup>2</sup> del pozzetto), il tempo è considerato il tempo di trasporto totale in secondi (7200 s) ;  $[\text{polimero}]_{\text{accettore}}$  è la concentrazione del farmaco misurata mediante spettroscopia UV;  $[\text{polimero}]_{\text{iniziale}}$  è la concentrazione di farmaco iniziale ( $1 \times 10^{-4}$  M) nel compartimento apicale o basolaterale.

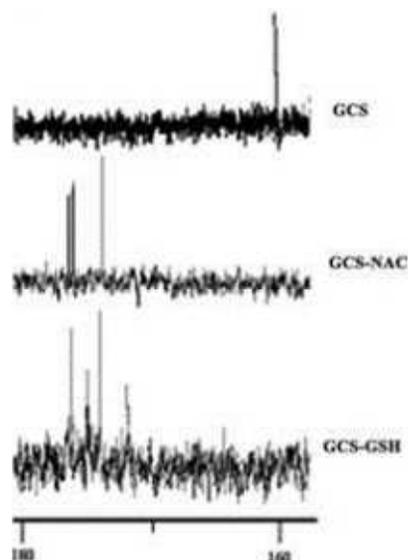
## 2.4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il glicole chitosano-NAC (GCSNAC) e il glicole chitosano-GSH (GCSGSH) sono stati sintetizzati seguendo i metodi di sintesi riportati in letteratura per chitosano-NAC (CSNAC) e chitosano-GSH (GCS-GSH), rispettivamente.<sup>(32, 33)</sup> In tutti i casi si è avuta la formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico terminale della N-acetilcisteina o del GSH con quello amminico del glicole chitosano.

Gli spettri FT-IR del GCSNAC e GCSGSH si differenziano da quelli del polimero non modificato per la presenza di un debole assorbimento a  $2525\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching -SH. Inoltre nei coniugati polimerici, accanto alla banda di assorbimento a  $1635\text{ cm}^{-1}$  dovuta allo stretching del legame ammidico del residuo acetammidico presente nel polimero non modificato, si nota la presenza di una ulteriore banda d'assorbimento a  $1558\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching del legame ammidico formatosi dopo coniugazione tra l'-NH<sub>2</sub> del glicole chitosano e il gruppo carbossilico dell'NAC o del GSH.

Negli spettri <sup>1</sup>H-NMR dei coniugati polimerici GCSNAC e GCSGSH si nota chiaramente la riduzione di intensità, rispetto a quello osservato nel GCS non modificato, del segnale del protone in posizione 2 dell'anello amminoglucosidico. Questo conferma l'avvenuto legame tra il polimero di partenza (GCS) e i sostituenti N-aceti cisteina o glutazione.

Negli spettri <sup>13</sup>C-NMR del GCSNAC e GCSGSH (**Figura 3**) si osservano dei segnali a  $\delta$  173.86, 176.63, 177.03 e  $\delta$  174.09, 175.14, 176.35, rispettivamente tutti attribuibili a C=O ammidici in accordo con la struttura assegnata. E' interessante notare lo spostamento subito dal segnale del carbonio carbonilico acetammidico che risuona di circa 13 ppm a campi più alti rispetto a quello osservato per il polimero parente.



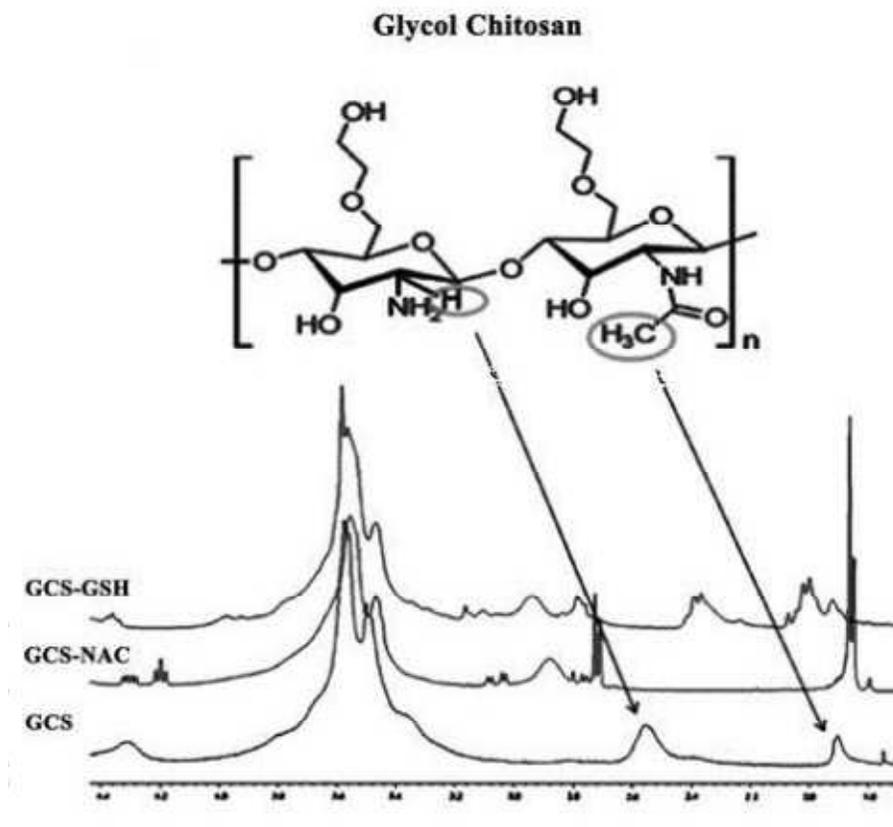
**Figura 3.** Spettro di  $^{13}\text{C}$ -NMR del GCSNAC e GCSGSH nella regione compresa tra 160 e 180 ppm (risonanze nella zona dei carbonili)

L'esame degli spettri  $^1\text{H}$ -NMR dei coniugati polimerici GCSNAC e GCSGSH ha permesso anche di calcolare il grado di sostituzione negli stessi coniugati. Come indicato in **Tabella 1**, dagli integrali dei protoni in  $\alpha$  all'ammino gruppo (D2 in **Figura 4**, risonanti a 2,4 - 2,6  $\delta$ ) e dei protoni del  $\text{CH}_3$  acetilico (D1 in **Figura 4**, risonanti a 1,8-2,0  $\delta$ ) è possibile risalire al grado di sostituzione dei coniugati polimerici preparati.

**Tabella 1.** Determinazione del grado di sostituzione GS dei coniugati polimerici sulla base degli integrali dei protoni in  $\alpha$  all'ammino gruppo (D2) e dei protoni del gruppo  $\text{CH}_3$  acetilico (D1)

	D1(%) <sup>a</sup>	D2(%) <sup>b</sup>	GS (%) <sup>c</sup>
GCS	19	81	-
GCSNAC	19	3	78
GCSGSH	19	22	59

<sup>a</sup> Numero di unità di N-acetamidoglucoio per 100 residui di zucchero. <sup>b</sup> Numero di unità di N-glucosammina non sostituita per 100 residui di zucchero. <sup>c</sup> Numero di NAC o GSH per 100 residui di zucchero.



**Figura 4. Spettri <sup>1</sup>H-NMR dei coniugati polimerici GCS-NAC e GCS-GSH e del polimero non modificato**

La quantità di gruppi tiolici parziali (-SH) e totali (ottenuti dopo riduzione con NaBH<sub>4</sub> dei gruppi -S-S-) legati al glicole-chitosano è stata determinata per via spettrofotometrica utilizzando il reattivo di Ellman. I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 2**.

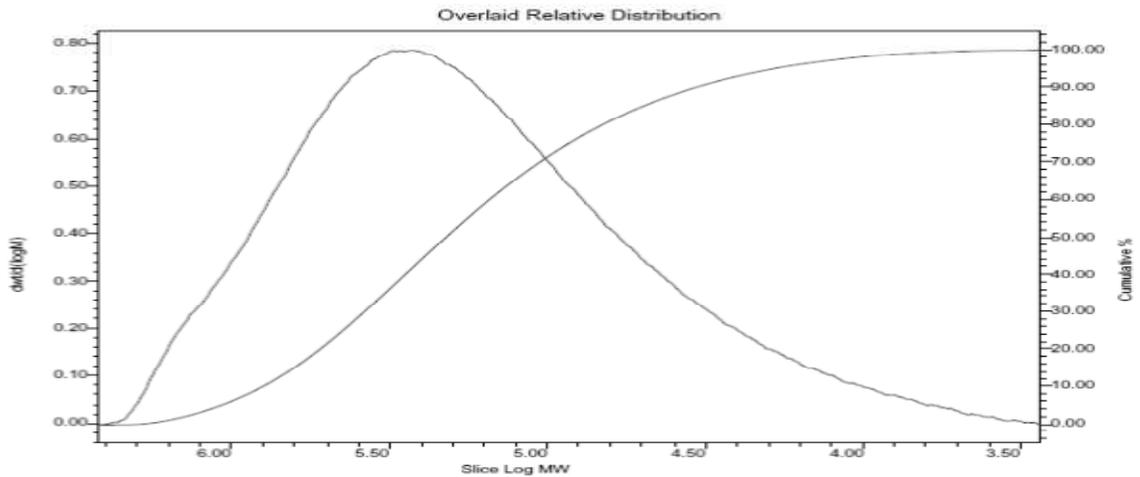
I risultati del saggio di Ellman indicano che nel caso del GCSNAC sono presenti  $6,28 \pm 0,28$  mmoli di gruppi tiolici liberi per grammo di polimero mentre nel caso del GCSGSH ne sono presenti  $2,88 \pm 0,13$  mmoli di gruppi tiolici liberi per grammo di polimero. I risultati del saggio di Ellman totali sono  $6,34 \pm 0,38$  mmoli di gruppi tiolici liberi per grammo di polimero nel caso del GCSNAC, e  $2,99 \pm 0,54$  mmoli di gruppi tiolici liberi per grammo di polimero nel caso del GCSGSH.

**Tabella 2 Risultati del saggio di Ellman valutati come mmoli di gruppi tiolici/g di polimero coniugato.**

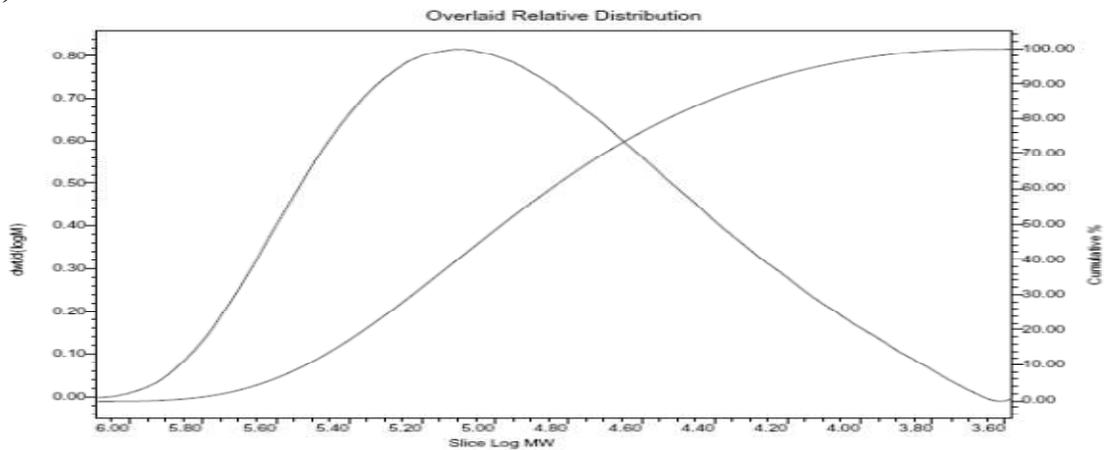
	<b>PARZIALE</b> <b>(mmol SH/g di polimero ± SD)</b>	<b>TOTALE</b> <b>(mmol SH/g di polimero ± SD)</b>
<b>GCS-NAC</b>	6,28 ± 0,28	6,34 ± 0,38
<b>GCS-GSH</b>	2,88 ± 0,13	2,99 ± 0,54

I pesi molecolari medi dei coniugati polimerici preparati sono stati ottenuti mediante cromatografia per esclusione (SEC). La **Figura 5** mostra le curve di distribuzione dei pesi molecolari.

a)



b)



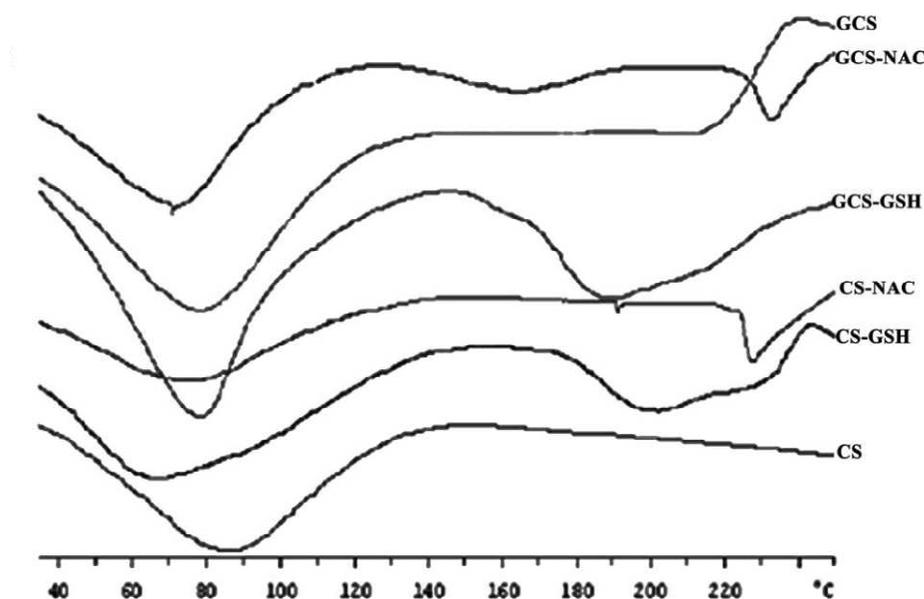
**Figura 5. Curve di distribuzione dei pesi molecolari medi dei coniugati polimerici GCS-GSH (a) e GCS-NAC (b)**

Come si può notare dai dati riportati in **Tabella 3**, i pesi molecolari medi dei coniugati sono superiori a quelli dei polisaccaridi di partenza e la distribuzione è alquanto ampia come dimostrato dall'Indice di Polidispersione (IP) superiore a 2. Un valore di IP alto può essere dovuto alla possibilità di rottura di catene polimeriche nelle condizioni di coniugazione. Inoltre bisogna anche considerare che sempre nelle condizioni di reazione impiegate per la coniugazione, i gruppi  $-SH$  introdotti possono ossidarsi dando luogo a legami crociati intercatene costituiti da ponti disolfuro.

Tabella 3. Pesi molecolari medi dei polimeri di partenza e dei rispettivi coniugati.

POLIMERO	Mn (kDa) $\pm$ SD	Mw (kDa) $\pm$ SD	I P (Mw/Mn)
CS	17,6 $\pm$ 1,2	48,1 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 0,2
CSNAC	32,6 $\pm$ 2,3	111,6 $\pm$ 14,1	3,4 $\pm$ 0,2
CSGSH	49,4 $\pm$ 0,3	153,0 $\pm$ 7,0	3,1 $\pm$ 0,1
GCS	104,1 $\pm$ 2,1	340,4 $\pm$ 14,8	3,3 $\pm$ 0,1
GCSNAC	165,6 $\pm$ 13,1	361,2 $\pm$ 23,0	2,2 $\pm$ 0,1
GCSGSH	107,2 $\pm$ 2,7	502,8 $\pm$ 1,2	4,7 $\pm$ 0,2

I coniugati polimerici preparati sono stati anche analizzati dal punto di vista termografico e i corrispondenti termogrammi sono mostrati in **Figura 6**.



**Figura 6.** Termogrammi dei polimeri tiolati e dei corrispondenti polimeri di partenza

Tutti i polimeri studiati mostrano un largo segnale tra 80 °C e 100 °C, e ciò in accordo con le caratteristiche della loro natura polisaccaridica. Questo segnale è attribuibile a perdita d'acqua. Inoltre, tutti i polimeri esaminati mostrano picchi poco intensi, alcuni endotermici, altri esotermici intorno a 240°C-250°C corrispondenti a fenomeni di decomposizione.

Quindi è stata condotta un'analisi di superficie mediante XPS per quantificare lo zolfo tiolico reattivo. Infatti, come è noto, i tioli sono gruppi funzionali in grado di favorire la mucoadesione grazie all'instaurazione di ponti disolfuro con i residui proteici che compongono il muco. La composizione chimica di superficie è stata valutata per tutti i polimeri ed i risultati sono riportati in **Tabella 4**.

**Tabella 4. Composizione elementare percentuale superficiale dei tiomeri**

<b>Tiometro</b>	<b>%C</b>	<b>%O</b>	<b>%N</b>	<b>%S</b>	<b>%Cl</b>	<b>%Si</b>
<b>CS-GSH</b>	61.9±0.7	28.0±0.5	8.2±0.5	1.5±0.5	0.4±0.5	--
<b>CS-NAC</b>	58.6±0.5	30.4±0.6	7.7±0.5	1.2±0.5	2.1±0.6	--
<b>GCS-GSH</b>	62.8±1.0	25.1±0.5	8.3±0.5	2.0±0.5	0.9±0.5	0.9±0.5
<b>GCS-NAC</b>	59.6±0.5	30.2±1.2	6.1±0.5	1.0±0.5	1.8±0.5	1.3±0.5

I risultati indicano che la quantità totale di zolfo è simile per tutti i tiomeri. Inoltre è stata indagata la regione dello spettro di questo elemento per valutare il suo stato di ossidazione. Come si vede in **Figura 7**, per tutti i coniugati il segnale principale dello zolfo si osserva a binding energy  $BE_{S2p3/2}=163,5\pm0,2$  eV ascrivibile ad un gruppo tiolico e/o ad un ponte disolfuro.

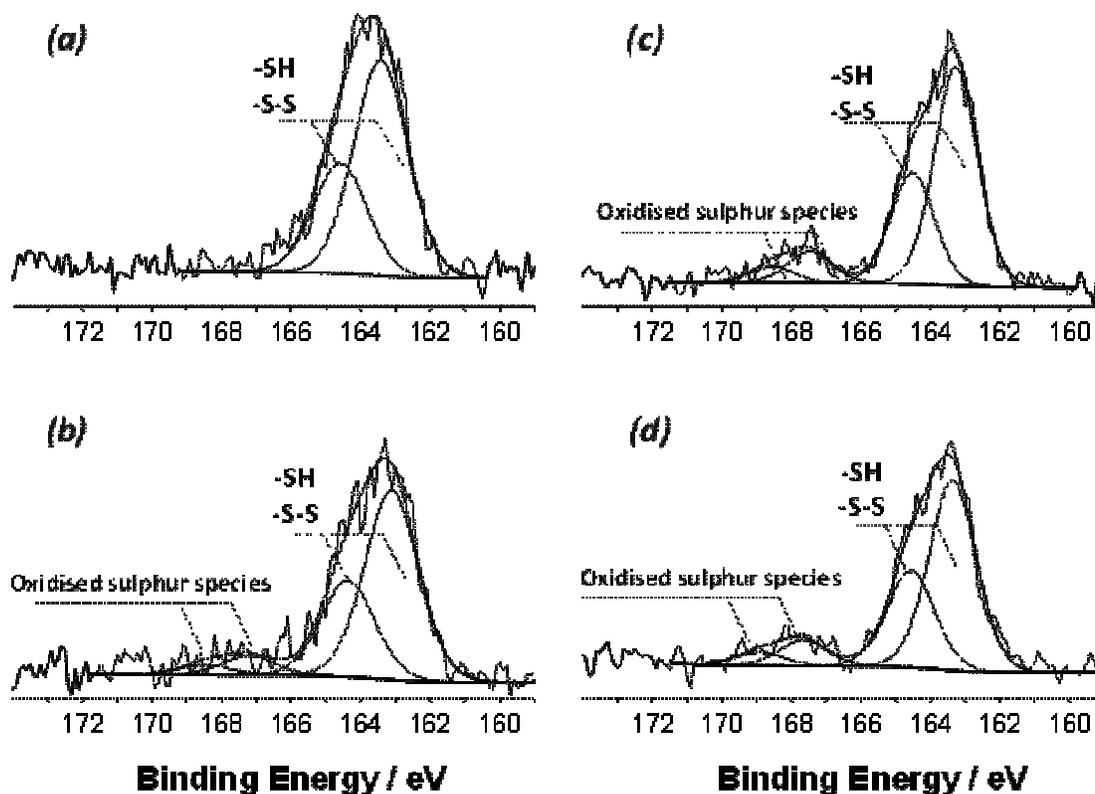


Figura 7. Segnale ad alta risoluzione dello zolfo del CS-NAC (a), GCS-NAC (b), CS-GSH (c) e GCS-GSH (d)

Inoltre è presente un secondo segnale a valori elevati il quale può essere assegnato alle specie ossidate. Purtroppo questa metodica non offre una risoluzione spettrale sufficiente per distinguere tra gruppi -SH -e disolfuro superficiali, in quanto entrambi posseggono la stessa BE. Pertanto da tali studi è possibile ricavare solo la quantità di zolfo superficiale totale, che nel caso dei tiomeri è di circa 1,2%-2,0%.

In **Figura 8 e 9** sono riassunti i risultati degli studi sulle proprietà mucoadesive mediante il metodo turbidimetrico, dei tiomeri sintetizzati e dei polimeri di partenza. Il test è stato condotto in PBS e in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1%. In entrambi i casi sono stati inseriti nello studio anche il Carbopol 934 e l'idrossietilcellulosa (HEC) come confronto. Come è noto, utilizzando questo test, si osserva una diminuzione di trasmittanza tempo di incubazione dipendente fino a raggiungere un plateau.<sup>(51, 52)</sup>

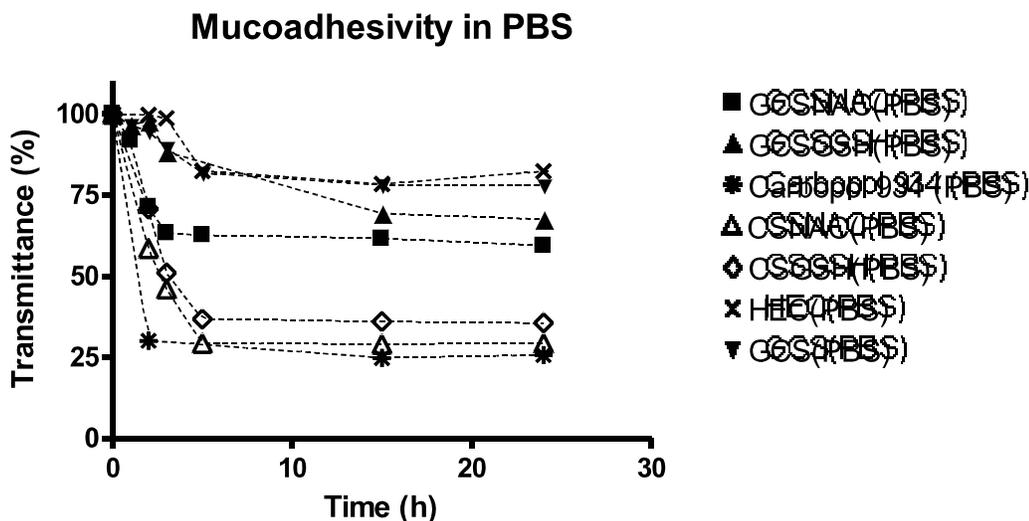


Figura 8. Misura turbidimetrica della interazione fra i polimeri esaminati mucina in PBS

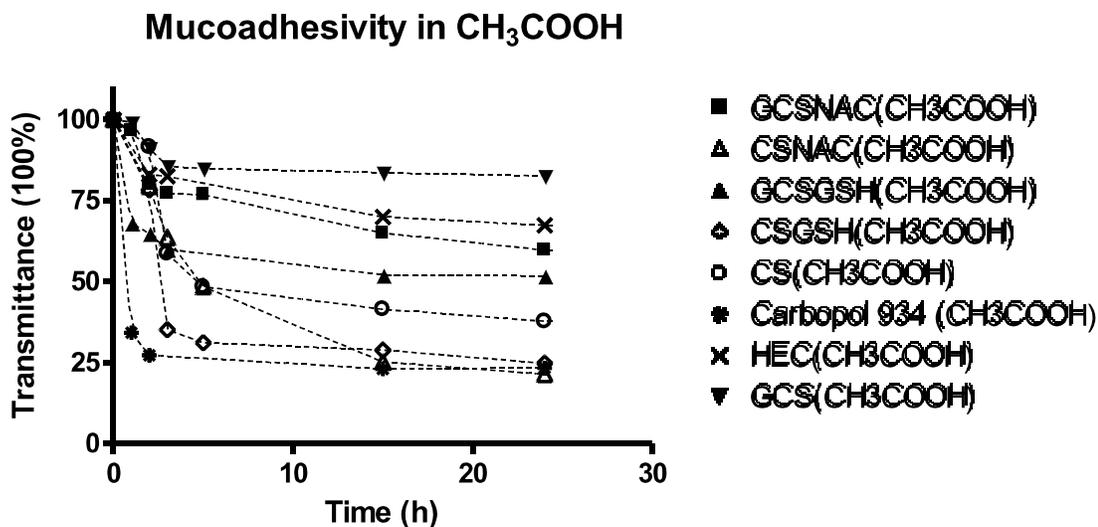


Figura 9. Misura turbidimetrica della interazione fra i polimeri esaminati mucina in CH<sub>3</sub>COOH 0,1%

Da questi studi appare evidente che sia il CS che i suoi tiomeri sono più mucoadesivi del GCS e dei corrispondenti derivati tiolati.

Tenendo in considerazione i valori al plateau si può affermare che CSNAC e CSGSH hanno un comportamento simile a quello del Carbopol che è noto possedere proprietà

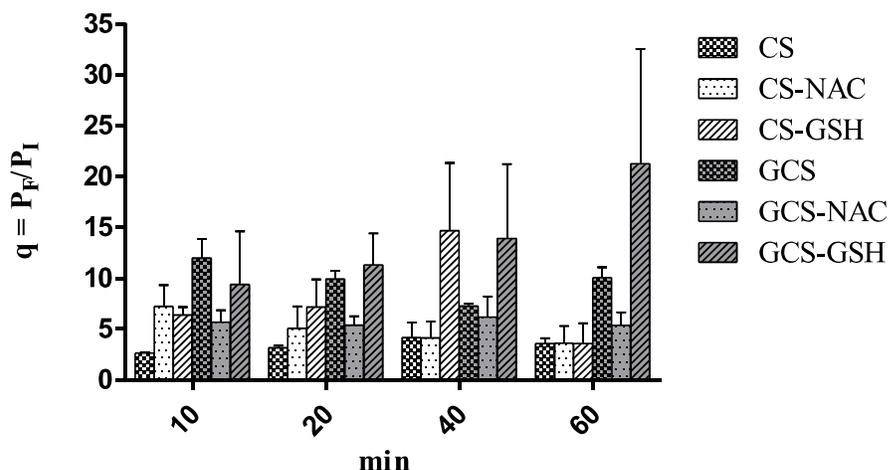
mucoadesive eccellenti.<sup>(27)</sup> Bisogna comunque notare che i derivati tiolati del GCS sono più mucoadesivi del GCS di partenza.

Se è quindi proceduto a valutare la mucoadesività con il test del potenziale Z che consiste nel misurare le variazioni di potenziale zeta per aggiunte scolarmente crescenti di GCSNAC o GCSGSH in acido acetico (0,1% p/v) alla sospensione di mucina. Appare evidente un aumento di potenziale zeta in acido acetico (0,1% p/v) da valori negativi o quasi nulli (quando è presente esclusivamente la mucina) a valori nettamente positivi di +10 mV-+15 mV dopo aggiunta dei polimeri. Questo effetto è meno intenso in PBS e differenze non significative sono state osservate tra GCSNAC e GCSGSH (dati non riportati). Il confronto delle proprietà mucoadesive mediante la determinazione dei potenziali zeta si basa sulla valutazione della pendenza del tratto lineare di incremento del potenziale zeta per ciascun profilo. Tuttavia, le lievi differenze osservate nelle pendenze, rendono difficile la classificazione dei polimeri studiati utilizzando questo metodo. Questo risultato potrebbe indicare che il metodo dell'incremento del potenziale zeta è inaffidabile quando polimeri di analoghe proprietà mucoadesive devono essere confrontati come nel caso esaminato in questo studio. Per ottenere ulteriori informazioni sull'interazione con mucina, la carica dei polimeri di partenza e coniugati in assenza di mucina è stata misurata sia a pH 7 e pH 3.2 . Come mostrato in **Tabella 5**, in entrambi i mezzi esaminati, i valori zeta potenziale di CS e tiomero derivati sono più positivi rispetto al GCS e corrispondenti tiomeri . Questo effetto è più evidente a pH 3,2 in quanto i gruppi amminici di CS e GCS sono protonati a pH acido e deprotonati a  $\text{pH} \geq 7$  .

**Tabella 5. Potenziali zeta dei polimeri misurati in assenza di mucina**

Polimero	Potenziale zeta (mV $\pm$ SD)
CS in CH <sub>3</sub> COOH 0,1%	42,43 $\pm$ 4,52
CS GSH in CH <sub>3</sub> COOH 0,1%	40,53 $\pm$ 0,5
CS NAC in CH <sub>3</sub> COOH 0,1%	39,25 $\pm$ 3,6
GCS in CH <sub>3</sub> COOH 0,1%	35,22 $\pm$ 2,80
GCS NAC in CH <sub>3</sub> COOH 0,1%	33,18 $\pm$ 4,77
GCS GSH in CH <sub>3</sub> COOH 0,1%	33,35 $\pm$ 2,90
CS GSH in PBS	1,05 $\pm$ 0,04
CS NAC in PBS	0,81 $\pm$ 0,27
GCS in PBS	0,17 $\pm$ 0,04
GCS NAC in PBS	0,41 $\pm$ 0,13
GCS GSH in PBS	0,36 $\pm$ 0,25

Questo risultato è in accordo con l'ordine di mucoadesione osservato per via turbidimetrica che indica il CS e i suoi tiomeri più mucoadesivi dei corrispondenti polimeri contenenti GCS: In definitiva, i risultati confermano che, nel caso di polimeri come il CS e derivati, le interazioni polimero-mucina sono soprattutto di tipo elettrostatico, anche se non sono escluse interazioni di tipo legame ad idrogeno e idrofobiche.<sup>(29)</sup> Quindi, il fattore carica nel determinare le caratteristiche mucoadesive sembra notevolmente prevalere rispetto ad altri fattori ritenuti pure importanti come il peso molecolare medio. Infatti, in contrasto a quanto osservato, il GCS e derivati avendo pesi molecolari circa il doppio dei corrispondenti polimeri a base di CS, dovrebbero essere favoriti in termini di proprietà mucoadesive.<sup>(27)</sup> Anche il processo di rigonfiamento (swelling) del polimero può svolgere un ruolo importante nel processo di mucoadesione. La mucoadesione, infatti, può essere considerato un processo suddiviso in due fasi tra di loro sequenziali: una prima, cosiddetta fase di contatto, in cui il polimero a contatto con il muco viene bagnato e rigonfia stabilendo solo interazioni non covalenti. Nella seconda, chiamata fase di consolidamento, in cui le catene polimeriche e la mucina si compenetrano stabilendo sia interazioni non-covalenti (fisiche) che covalenti (chimiche). Pertanto, sono state valutate le caratteristiche di rigonfiamento di tutti i polimeri studiati utilizzando un metodo gravimetrico. I risultati espressi come indice di swelling e come valore di swelling ratio ( $q$ ) sono mostrati in **Figura 10** ed in **Tabella 6**.



**Figura 10. Caratteristiche di rigonfiamento in termini di swelling index dei polimeri esaminati per via gravimetrica in acqua bidistillata.**

Da questi risultati appare evidente che il CS si rigonfia in misura minore rispetto agli altri polimeri.

**Tabella 6. Caratteristiche di rigonfiamento in termini di swelling ratio ( $q = P_F/P_I$ ) dei polimeri esaminati per via gravimetrica in acqua bidistillata.**

<b>POLIMERO</b>	<b>10 min</b>	<b>20 min</b>	<b>40 min</b>	<b>60 min</b>
CS	2,63 ± 0,09	3,16 ± 0,21	4,15 ± 1,5	3,57 ± 0,53
CS-NAC	7,22 ± 2,09	5,06 ± 2,15	4,13 ± 1,6	3,61 ± 1,67
CS-GSH	6,37 ± 0,80	7,16 ± 2,72	14,67 ± 6,67	3,56 ± 2,01
GCS	11,97 ± 1,88	9,89 ± 0,84	7,24 ± 0,23	10,04 ± 1,03
GCS-NAC	5,67 ± 1,17	5,39 ± 0,86	6,18 ± 2,02	5,36 ± 1,27
GCS-GSH	9,38 ± 5,22	11,30 ± 3,10	13,91 ± 7,32	21,26 ± 11,29

Questo risultato può essere razionalizzato assumendo che le catene polimeriche di CS, pur rigonfiandosi in maniera limitata, si compenetrano efficacemente nella fase di consolidamento con quelle della mucina stabilendo forti interazioni mucoadesive. D'altra parte per quanto riguarda il peso molecolare maggiore del GCS e derivati rispetto ai corrispondenti CS e derivati bisogna ricordare che il fattore peso molecolare è favorevole solo quando si raggiunge un valore ottimale superato il quale l'interpenetrazione delle catene polimeriche diminuisce.

Probabilmente il valore del peso molecolare per GCS e derivati utilizzati è superiore a quello ottimale non permettendo forti interazioni mucoadesive nella fase di consolidamento.

Dopo questi studi di mucoadesione tutti i polimeri sono stati valutati in studi di trasporto per determinare il loro coefficiente di permeabilità apparente  $P_{app}$  e i loro effetti sul trasporto transepiteliale di Rho-123, un substrato ben noto proteina della P-gp, utilizzando un monostrato cellulare di cellule Caco-2. Questa linea cellulare è stata utilizzata in quanto esprime un'elevata concentrazione della pompa di efflusso P-gp. È stato quindi studiato il trasporto bidirezionale ( $B \rightarrow A/A \rightarrow B$ ) della Rho-123 in presenza dei polimeri attraverso il monostrato di cellule Caco-2. Per meglio caratterizzare il meccanismo d'azione dei polimeri sulla P-gp sono stati utilizzati altri due saggi biologici utili per gli scopi proposti.<sup>(45-49)</sup> Nel primo è stato utilizzato l'estere acetossimetilico della calceina (Calceina-AM) come probe fluorescente nelle cellule MDCK-MDR, le quali presentano una over-espressione della pompa di efflusso P-gp. La calceina-AM è un substrato della pompa ed è quindi in grado di attraversare la membrana cellulare quando la pompa è bloccata. Uno

volta raggiunto il citosol, viene idrolizzata dalle esterasi endogene dando luogo alla calceina notevolmente fluorescente. Questa molecola, non è in grado di attraversare la membrana cellulare per diffusione passiva e quindi si osserva un rapido aumento della fluorescenza citoplasmatica. Il saggio dell'attivazione dell'ATP-asi permette di valutare la deplezione dell'ATP cellulare in presenza del composto saggiato. Tale deplezione è proporzionale alla quantità di luce emessa in seguito alla conversione della luciferina in ossi-luciferina. Se il polimero testato è in grado di attivare l'ATP-asi può essere considerato come un substrato della P-gp, anche se sono necessari altri saggi biologici per confermare questo risultato. Come indicato nella **Tabella 7**, sono stati osservati rapporti di efflusso elevati (rapporto  $B \rightarrow A/A \rightarrow B$ ) per CS-NAC e CS-GSH (19 e 21 rispettivamente) mentre sono stati misurati valori più bassi con GCS e GCS-NAC (4,2 e 8,6 rispettivamente).

Inoltre nessun polimero si è dimostrato in grado di stimolare l'attività della P-gp ATP-asi. Tutti insieme questi risultati portano a considerare il GCS e il GCS-NAC come dei substrati non trasportati dalla proteina P-gp.

E' comunemente riconosciuto che un rapporto BA/AB da 18 a 20 e un rapporto  $< 2$  è caratteristico di substrati e inibitori, rispettivamente, della pompa d'efflusso mentre rapporti intermedi (da 2 a 18) individuano modulatori della P-gp.<sup>(49)</sup>

In base a questa classificazione, dai risultati riportati nella **Tabella 7** si può dedurre che sia CS-NAC sia CS-GSH potrebbero essere ritenuti substrati della P-gp .

**Tabella 7. Permeabilità apparente dei composti testate con il monostrato cellulare Caco-2 esprime la proteina P-gp umana, dal compartimento basolaterale all'apicale (BA) e dal compartimento apicale al basolaterale (AB).**

	$P_{app}^a$ (BA/AB)	$P_{app} BA^a$ nm/s	$P_{app} AB^a$ nm/s	$\lambda$ nm	$\varepsilon^b$ $M^{-1}cm^{-1}$
CS-GSH	19	179049	9260	311	92
CS-NAC	21	225233	10599	305	96
GCS	4.2	257725	60965	224	95
GCS-NAC	8.6	251987	29250	260	111
Rho 123	2.3	1130	484	500	75297
Rho-123 $P_{app}$ evaluation after pre- treatment with tested compound	$P_{app}^a$ (BA/AB)	$P_{app} BA^a$ nm/s	$P_{app} AB^a$ nm/s	$\lambda$ nm	$\varepsilon^b$ $M^{-1}cm^{-1}$
GCS <sup>c</sup>	3	1128	372	500	-
GCS-NAC <sup>d</sup>	2.3	1128	484	500	-

<sup>a</sup> I dati sono la media delle tre misure effettuate in triplicato

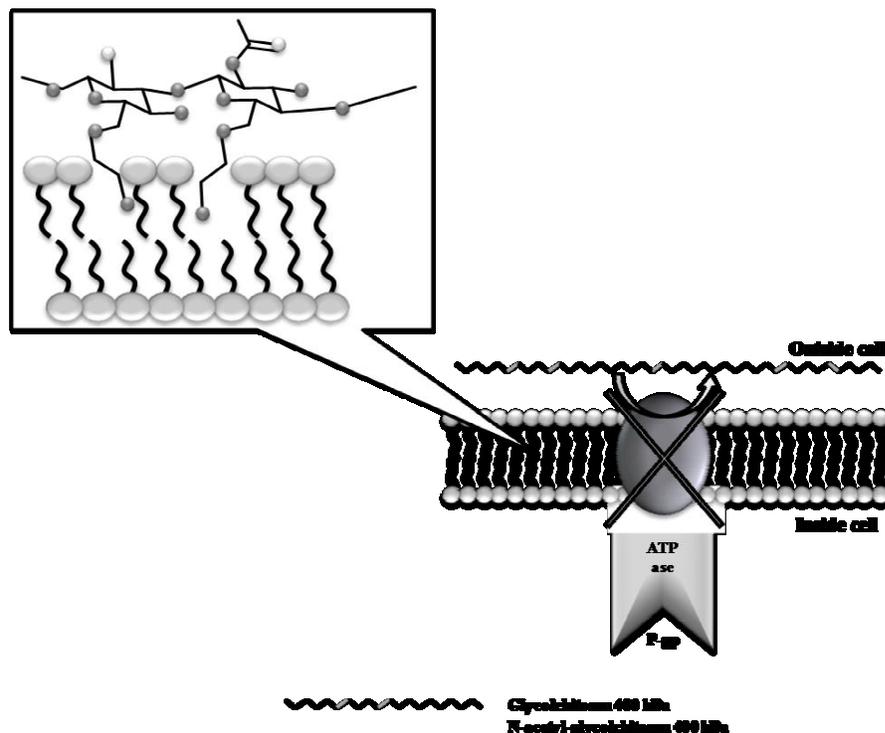
<sup>b</sup>  $\varepsilon$ = coefficient di estinzione molare misurato a  $10^{-5}$  M alla  $\lambda_{max}$  per ogni composto testato

<sup>c</sup>  $P_{app}$  della rodamina ottenuto dopo 24 h di pretrattamento con 10 mg/mL di GCS

<sup>d</sup>  $P_{app}$  della rodamina ottenuto dopo 24 h di pretrattamento con 10 mg/mL di GCSNAC

Questo è in accordo con i risultati di Bernkop - Schnurch e collaboratori, tenendo conto che il CS-NAC e il CS-GSH da noi utilizzati sono a basso peso molecolare (111,6 e 153,0 kDa, rispettivamente). D'altra parte, i rapporti AB/BA misurati con GCS e GCS-NAC (4.2 e 8.6, rispettivamente) suggeriscono che queste macromolecole agiscono come P-gp modulatori.<sup>(49)</sup> Il pretrattamento di cellule Caco-2 con GCS e GCS-NAC ha comportato una modifica dell'efflusso di rodamina portando ad un aumento del valore BA/AB per GCS mentre per GCS -NAC questo valore è rimasto non modificato. Il GCS saggiato e il GCS-NAC sono caratterizzati da pesi molecolari medi (400 kDa secondo il fornitore) che sono stati rideterminati con la SEC (340,4 kDa e 361,2 kDa per GCS GCSNAC, rispettivamente). Il gruppo di ricerca di Bernkop-Schnürch ha dimostrato che l'interazione di CS-NAC con P-gp si verifica solo quando il peso molecolare medio è di 400 kDa e questo valore di peso molecolare di 400 kDa sembra essere critico per l'interazione con la

P-gp sia per CS-NAC, ma anche per GCS-NAC. Inoltre, è stato osservato che il pretrattamento con GCS ripristina l'ingresso nella cellula della Rho-123 bloccando la P-gp. È interessante notare che, non solo il polimero tiolato GCS-NAC, ma anche il polimero non modificato GCS è in grado di ristabilire l'ingresso nella cellula della Rho-123 bloccando la P-gp (**Tabella 7**). I risultati dei saggi sull'attività ATPasica e della calceina-AM combinati con quelli provenienti da studi di trasporto ci permettono di acquisire maggiori informazioni sul possibile meccanismo di modulazione della P-gp seguito da questi polimeri. Si deve tenere conto che l'interazione con la P-gp da parte di macromolecole può essere alquanto differente da quello attualmente accettato per le piccole molecole. Infatti, per macromolecole che modulano la P-gp, sono stati proposti ulteriori meccanismi che comprendono i cambiamenti di fluidità di membrana, accanto all'interazione con i siti di binding dell'ATP promossi dall'interazione dai gruppi ossietilenici del GCS e i gruppi polari delle membrane cellulari come rappresentato in **Figura 11**.<sup>(50)</sup>



**Figura 11. Schema di inibizione della P-gp proposto per le macromolecole polimeriche contenenti gruppi tiolici**

Tale meccanismo d'azione potrebbe spiegare l'esito negativo del test dell'ATP-asi, il quale è valido solo per molecole a basso peso molecolare. Comunque sono necessari ulteriori studi per chiarire il meccanismo di interazione di queste macromolecole con la P-gp.

## 2.5. CONCLUSIONI

Le ricerche presentate e discusse in questo capitolo della tesi di dottorato hanno condotto alla individuazione delle condizioni sperimentali per la sintesi di due nuovi tiomeri del glicole chitosano, il GCS-NAC e il GCS-GSH. Dallo studio comparativo effettuato tra questi nuovi tiomeri e i corrispondenti del CS (CS-NAC e CS-GSH) insieme al chitosano e glicole chitosano non modificati, è stato possibile ottenere utili informazioni circa le loro caratteristiche di mucoadesività ed interazione con la pompa di efflusso P-gp. Da tali studi è possibile concludere che tutti i tiomeri preparati posseggono eccellenti proprietà mucoadesive, sulla base dei test effettuati *in vitro*. Tuttavia, il chitosano e i suoi derivati tiomerici presentano caratteristiche mucoadesive superiori rispetto ai corrispondenti tiomeri del GCS. Tale ordine è spiegato considerando il potenziale Z dei polimeri misurato in assenza di mucina ma non sulla base di fattori quali il peso molecolare e la capacità di rigonfiamento. Nel caso dei tiomeri, né la quantità totale di gruppi tiolici e di ponti disolfuro, come anche la quantità di zolfo totale presente sulla superficie dei polimeri è in accordo con l'ordine di mucoadesione osservato. Questi risultati suggeriscono che, nei casi esaminati, le interazioni elettrostatiche giocano un ruolo decisivo.

Per quanto riguarda l'interazione dei polimeri con la pompa di efflusso P-gp seguendo il trasporto basolaterale-apicale/apicale-basolaterale (B-A/A-B) della Rho-123, substrato della P-gp, attraverso i monostrati cellulari di Caco-2, è stato osservato che, analogamente al CS-NAC, anche il polimero GCS-NAC con la massa molecolare media ottimale di circa 400 kDa è in grado di invertire l'attività della pompa di efflusso P-gp. Un altro risultato importante in questo settore è che, oltre al tiomero GCS-NAC, anche il glicole chitosano a 400 kDa è in grado di favorire l'ingresso della Rho-123 in cellula e di invertire l'azione della proteina P-gp. Quindi, si può concludere che non solo i tiomeri CS-NAC e GCS-NAC, ma anche il polimero non modificato GCS 400 kDa possono costituire promettenti biomateriali utili per migliorare la biodisponibilità dei substrati della P-gp. Questi polimeri possono inoltre essere di particolare interesse per la formulazione di forme farmaceutiche per via orale contenenti farmaci di classe III e IV o per la veicolazione di agenti terapeutici e substrati della proteina P-gp al cervello superando l'ostacolo della BEE dove la P-gp è sovra-espressa.<sup>(42)</sup>

## CAPITOLO 3

### 3.1. INTRODUZIONE

Come precedentemente già menzionato, negli ultimi anni è stata dedicata notevole attenzione allo sviluppo di nanosistemi bioadesivi a rilascio controllato.<sup>(53, 54)</sup> Tali sistemi hanno la potenzialità di aumentare l'assorbimento dei farmaci veicolati grazie all'aumento del tempo di contatto con la mucosa intestinale, con conseguente riduzione degli effetti collaterali e aumento dell'attività terapeutica. Inoltre, tali sistemi sono in grado di proteggere il principio attivo veicolato dalla possibile degradazione enzimatica effettuata da enzimi come nucleasi e proteasi, e ciò li rende estremamente interessanti per una eventuale veicolazione di molecole bioattive quali peptidi, proteine e oligonucleotidi.<sup>(55-57)</sup>

Tra i nanosistemi bioadesivi molto studiati sono catalogati quelli nanoparticellari tra cui, in particolare le nanoparticelle (NPs) di poli(isobutilcianoacrilato) (PIBCA) che, come ampiamente dimostrato, sono in grado di incapsulare una buona quantità di principi attivi, e di controllarne il loro rilascio grazie ad un meccanismo di erosione tempo-dipendente.<sup>(58, 59)</sup> Esse sono però caratterizzate da una superficie idrofobica e anionica, la quale non favorisce l'interazione con il tessuto mucoso. Per sopperire a tale mancanza sono state apportate diverse modifiche strutturali, utilizzando diversi polimeri in grado di migliorarne le caratteristiche mucoadesive. In particolare è noto che il chitosano (CS), e in misura maggiore i derivati tiolati del chitosano, presentano una spiccata attività mucoadesiva.

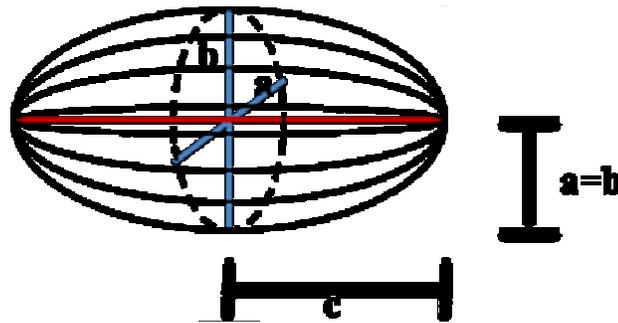
Come già menzionato il chitosano è un policatione in grado di interagire con le cariche negative superficiali del PIBCA legandosi elettrostaticamente, con la conseguente formazione di nanoparticelle con un core di PIBCA rivestito da CS o chitosano derivati. Il CS è inoltre un polimero non tossico, biodegradabile e biocompatibile, in grado di allargare le giunzioni strette epiteliali e quindi migliorare l'assorbimento di farmaci idrofili.<sup>(29)</sup> Ma tale polimero presenta una scarsa solubilità in acqua a pH vicini alla neutralità, ad eccezione del suo derivato glicole chitosano (GCS), il quale risulta solubile a pH 6-7. Inoltre, come già riportato, il CS e il GCS sono stati modificati con l'aggiunta di

gruppi tiolici sulla catena polimerica<sup>(32, 33)</sup> per migliorarne le caratteristiche mucoadesive. Polimeri come il chitosano-*N*-acetil cisteina (CSNAC), chitosano-glutatione (CSGSH) o i corrispondenti derivati col glicole chitosano [glicole chitosano-*N*-acetil cisteina (GCSNAC) e glicole chitosano-glutatione (GCSGSH)]. possono essere utilizzati come rivestimento per la formulazione di nanoparticelle mucoadesive con un core di polialchilciano-acrilato (PACA).

É noto inoltre che le caratteristiche terapeutiche di tali sistemi mucoadesivi nanoparticellari sono strettamente legate alla loro distribuzione nell'organismo. Questa distribuzione dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche delle NPs e quindi dalle loro dimensioni, dalle loro caratteristiche di superficie ed anche dalla loro forma geometrica. Bisogna notare che non sono molti gli studi rivolti a chiarire l'effetto della forma geometrica sulle caratteristiche chimico-fisiche dei sistemi nanoparticellari e questo rimane ancora un campo di sfida per i tecnologi farmaceutici. I metodi preparativi delle nanoparticelle polimeriche oggi noti permettono di avere nanoparticelle di forma pressoché sferica. Tale forma però può essere modificata con diverse metodologie, tra le quali lo "stretching" di nanoparticelle sferiche che fornisce NPs di forma ellittica.

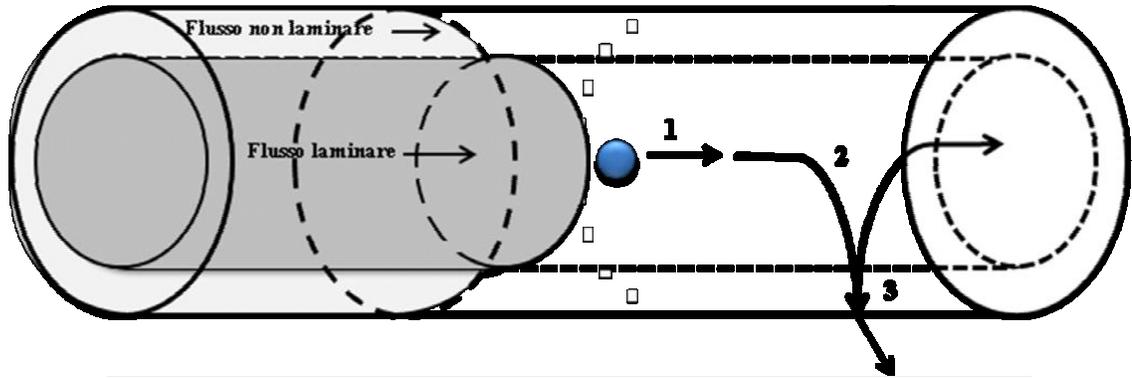
In natura ci sono diversi esempi in cui si osserva come particelle o microrganismi siano in grado di interagire in maniera diversa con i target biologici a seconda della loro forma. É per questo che capire l'influenza della forma sulla distribuzione di micro e nanoparticelle potrebbe portare notevoli progressi nel campo del drug-targeting. La maggior parte dei sistemi nanoparticellari sviluppati per il nanotargeting presentano una notevole eterogeneità strutturale e chimica, ma per lo più tutte queste forme farmaceutiche sono sferiche. Questo è dovuto alla facilità con la quale tali strutture sono ottenute, come conseguenza di una più alta stabilità termodinamica. Ad esempio, in seguito a somministrazione intravenosa, le nanoparticelle trasportate all'interno del flusso sanguigno, subiscono una distribuzione all'interno dei fluidi biologici (liquido interstiziale, citosol...) fortemente influenzata dalla loro forma. Infatti le nanoparticelle migrano dal flusso artero-venoso attraverso il tessuto endoteliale per raggiungere le cellule targets, e probabilmente la forma delle particelle influenza l'attraversamento dell'endotelio. Infine le nanoparticelle devono rilasciare il farmaco in prossimità del tessuto o dell'organo bersaglio. La forma delle nanoparticelle potrebbe influenzare anche tale fenomeno.

Le nanoparticelle disperse in soluzione sono soggette ai moti Browniani. Per le nanoparticelle a forma sferica questo movimento è isotropico nello spazio, mentre per le nanoparticelle di forma ellittica (**Figura 1**) questo movimento è più complesso.<sup>(60)</sup> Le nanoparticelle non sferiche, infatti, diffondono molto più rapidamente lungo il loro asse più lungo. Dopo un determinato arco di tempo, dipendente dalla geometria delle particelle, la rotazione delle nanoparticelle si evolve in un moto isotropico. Tali informazioni sono molto importanti per predire la diffusione delle nanoparticelle in fluidi biologici statici, come i liquidi intra ed extra cellulari. Molto probabilmente le particelle non sferiche prima attraversano il tessuto endoteliale mediante diffusione di tipo anisotropico, per poi muoversi nel liquido extracellulare mediante diffusione isotropica.



**Figura 1. Particella ellittica**

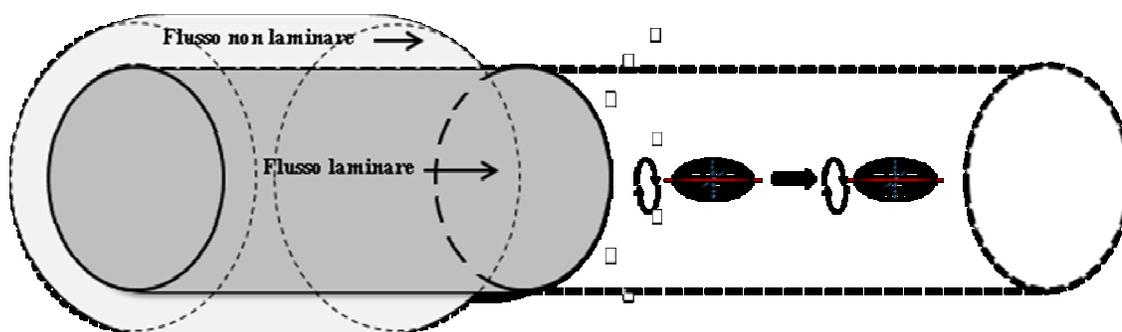
Una volta che le particelle sono iniettate nel flusso sanguigno, esse devono attraversare il tessuto endoteliale per raggiungere lo spazio interstiziale. È quindi di primaria importanza comprendere come le nanoparticelle non sferiche influenzino tale passaggio. In **Figura 2** è mostrato come può essere scomposto il movimento delle nanoparticelle in un flusso sanguigno ideale.



**Figura 2. Scomposizione schematica del flusso sanguigno. (1) Le particelle seguono il flusso sanguigno. (2) Le particelle sono “marginare”. (3) Le particelle possono attraversare il vaso, rimanere adese all’endotelio o reimmettersi nel flusso sanguigno.**

Dalla figura si può notare che le nanoparticelle che si muovono nella parte centrale del flusso sanguigno sono soggette ad un flusso di tipo laminare, al contrario delle particelle che viaggiano a ridosso della parete endoteliale. Le particelle attraversano l’endotelio grazie ad un meccanismo chiamato “marginazione” che consiste nell’adesione delle particelle alla parete endoteliale. Se le particelle interagiscono in maniera efficiente con il tessuto endoteliale, esse sono in grado di aderire ad esso e di diffondere attraverso le cellule che lo compongono. In caso contrario esse verranno reimmesse nel flusso sanguigno.

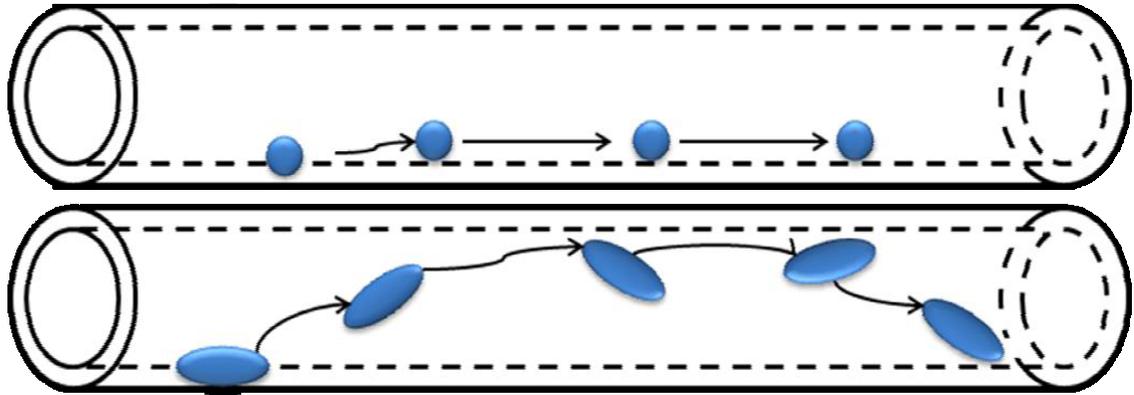
Il movimento delle nanoparticelle nei fluidi laminari è stato ampiamente illustrato da Kuo et al.<sup>(61)</sup> Le particelle sferiche seguono semplicemente la corrente del flusso laminare. Al contrario le nanoparticelle non sferiche hanno un comportamento più complesso. Nel caso di particelle non sferiche, con  $a = b < c$  le nanoparticelle ruoteranno intorno al loro asse maggiore (asse  $c$ ) con velocità costante, orientandolo parallelamente alla direzione del flusso laminare (**Figura 3**).



**Figura 3. Orientamento più probabile di particelle elicoidali nel flusso laminare sanguigno**

Le nanoparticelle che viaggiano a ridosso della parete endoteliale, invece, subiscono il fenomeno di marginazione.<sup>(62)</sup> Questo fenomeno è favorito da diversi parametri quali grandezza (la grandezza ottimale delle particelle di 100 nm); densità (particelle a densità inferiore all'acqua non hanno un buon grado di marginazione, al contrario delle nanoparticelle a densità superiore); costante dielettrica; caratteristiche di superficie quali potenziale Z e modifiche chimiche.

Tutte questi parametri ci portano a considerare che anche la forma possa svolgere un ruolo essenziale sulla marginazione delle nanoparticelle. Infatti due nanoparticelle con volume uguale ma caratterizzate da forma diversa avranno caratteristiche superficiali differenti e quindi differente comportamento durante la marginazione. Il movimento differente tra le nanoparticelle sferiche ed elicoidali è stato simulato utilizzando un capillare ideale. I risultati mostrati in **Figura 4** mostrano come le nanoparticelle sferiche tendano a ruotare sulla superficie del capillare. Le particelle elicoidali, invece, sono in grado di esplorare una superficie maggiore del capillare, avendo quindi maggiore possibilità di interagire col tessuto endoteliale.



**Figura 4. Traiettorie delle particelle sferiche (1) e ellittiche (2) in un capillare. Le nanoparticelle sferiche si muovono ad una distanza costante dalla parete del capillare e parallelamente ad essa. Le particelle ellittiche ruotano e si spostano da una parte all'altra del capillare.**

Anche l'attraversamento delle barriere biologiche può essere fortemente influenzato dalla forma delle particelle. Ogni volta che le nanoparticelle non sferiche incontrano delle barriere biologiche (membrana cellulare) senza aderire ad esse, assumono un orientamento prestabilito e diffondono attraverso tale ostacolo. Al contrario, le nanoparticelle sferiche diffondono in maniera isotropica. Nella cavità intestinale la diffusione delle nanoparticelle potrebbe essere più efficiente per le nanoparticelle allungate piuttosto che per le sferiche, in virtù del diverso meccanismo di diffusione.

### 3.2 SCOPO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA

Il lavoro descritto nel terzo capitolo della tesi di dottorato ha avuto come finalità la preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle di CSNAC-PIBCA (CNPIBCA), CSGSH-PIBCA (CGPIBCA), GCSNAC-PIBCA (GCNPIBCA), GCSGSH-PIBCA (GCGPIBCA) e glicole chitosano (GCS)-PIBCA (GCPIBCA). Di tali formulazioni sono state altresì valutate le caratteristiche di mucoadesione, e confrontate con quelle delle nanoparticelle di chitosano-PIBCA (CSPIBCA) usate come riferimento.

Sono state inoltre preparate nanoparticelle di CSPIBCA allungate (Elongated Chitosan-poly-Isobutyl-cyanoacrylate, ECIB), con la finalità di poterne esplorare le loro caratteristiche chimico-fisiche e valutare le eventuali differenze rispetto alle nanoparticelle sferiche di partenza.

### 3.3 MATERIALI E METODI

Il Chitosano (CS, Mw 20 kDa, grado di deacetilazione: 92%) è stato acquistato da Amicogen.inc (Jinju, South Korea); il Glicole chitosano (GCS, Mw 340.4 ), glutatione (GSH), N-acetil cisteina (NAC) 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato (EDAC), N-idrossisuccinimide (NHS), la Ninidrina e la Rodamina B sono stati acquistati da Sigma (St. Louis, MO, USA); l'isobutilcianoacrilato (IBCA) è stato acquistato da Loctite (Dublino, Irlanda).

#### 3.3.1 Preparazione e caratterizzazione chimico fisica delle nanoparticelle mucoadesive e di forma allungata

Preliminarmente al suo utilizzo nella preparazione delle nanoparticelle polimeriche, il CS 20 kDa è stato purificato mediante dialisi. Brevemente, un grammo di CS è stato solubilizzato in 50 ml di acqua MilliQ. Quindi la soluzione polimerica è stata purificata con membrane dialitiche (Spectra/Por membranes, 3.500 g/mol MWCO), in acido cloridrico 1 mM una volta per 2 ore, e una volta per tutta una notte. In seguito la soluzione è stata congelata e liofilizzata fino ad ottenere una polvere bianca.

### 3.3.2 Idrolisi del glicole chitosano

Il GCS è stato idrolizzato prima dell'utilizzo, così da ottenere un polimero a peso molecolare inferiore.<sup>(63)</sup> In particolare, 500 mg di GCS sono stati solubilizzati in 12.5 ml di acido acetico al 6% (v/v), sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente e in presenza di 2.5 ml di una soluzione di nitrito di sodio (2 g/l in acido acetico 6% v/v) e la miscela lasciata per 2 ore. Dopo questo tempo, la soluzione contenente il GCS idrolizzato è stata purificata mediante dialisi (Spectra/Por membranes, 3.500 g/mol MWCO) in acqua distillata 2 volte per un'ora e una volta per tutta una notte. Dopo questo tempo la miscela è stata congelata e liofilizzata fornendo una polvere bianca.

### 3.3.3. Procedura generale per la preparazione delle nanoparticelle di chitosano, glicole chitosano e loro derivati con PIBCA

L'appropriato polimero (130 mg) è stato solubilizzato sotto agitazione magnetica e in corrente di argon a 42°C in HNO<sub>3</sub> 0.2 M (8 ml). A parte è stato solubilizzato l'ammonio cerio (IV) nitrato 0,08 M in 2 ml di HNO<sub>3</sub> 0.2 M e questa soluzione è stata aggiunta alla soluzione polimerica e alla risultante miscela sono stati aggiunti 0,5 ml di IBCA. Quindi la corrente di argon è stata interrotta e la miscela di reazione è stata lasciata a 42°C sotto agitazione magnetica per 50 min. Dopo questo tempo la sospensione è stata portata a temperatura ambiente (t.a.) e purificata mediante dialisi (Spectra/Por membranes, 100.000 g/mol MWCO) in acido cloridrico pH 2,5 tre volte per un'ora e una volta per tutta una notte. La dispersione è stata conservata in atmosfera di argon a 4°C fino ad ulteriore utilizzo.<sup>(64)</sup>

### 3.3.4. Procedura generale per la preparazione di nanoparticelle di chitosano e chitosano, glicole chitosano e loro derivati con PIBCA contenenti Rhodamine B

L'appropriato polimero (50 mg) è stato solubilizzato in 3.1 ml di HNO<sub>3</sub> 0.2 M, in corrente di Ar a 42°C sotto agitazione magnetica. A parte è stato solubilizzato l'ammonio cerio (IV) nitrato 0,08 M in 2 ml di HNO<sub>3</sub> 0.2 M e questa soluzione è stata aggiunta a quella polimerica. Alla miscela risultante sono stati aggiunti 0,5 ml di IBCA e 800 µl della soluzione di Rhodamine B (0,44 mg) in acetonitrile (800 µl). Quindi la corrente di Ar è stata interrotta e la miscela di reazione è stata lasciata a 42°C sotto agitazione magnetica

per 50 min e al riparo dalla luce. Dopo questo tempo la miscela di reazione è stata portata a t.a. e purificata mediante dialisi (Spectra/Por membranes, 100.000 g/mol MWCO) in acido cloridrico (pH 2,5) tre volte per un'ora e una volta per tutta una notte. La dispersione è stata infine conservata in atmosfera d'argon a 4°C al riparo dalla luce fino ad ulteriore utilizzo.

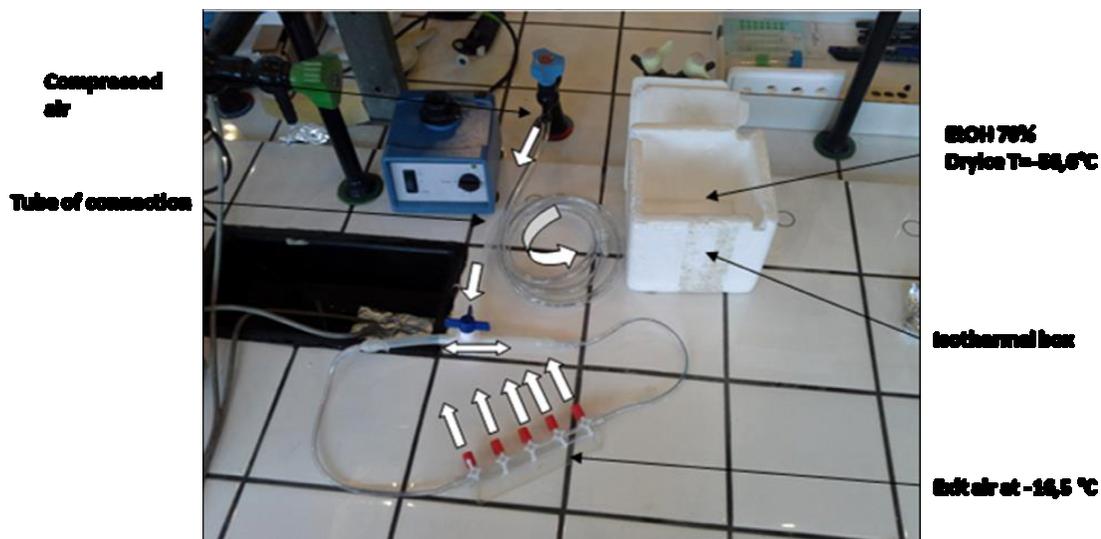
### 3.3.3. Preparazione di nanoparticelle di CSPIBCA allungate (ECIB)

Per l'allungamento delle nanoparticelle sferiche è stato utilizzato un film polimerico commerciale (STBT) a composizione non nota (in quanto coperta da brevetto) e solubile in acqua. 100 mg di STBT sono stati solubilizzati in 1,5 ml di acqua MilliQ, sotto agitazione magnetica per 4 ore a t. a. Quindi 400 µl della dispersione di CSPIBCA (30 mg/ml) sono stati aggiunti e la miscela risultante è stata lasciata in agitazione per 30 min. Dopo questo tempo la miscela STBT-CSPIBCA è stata sgocciolata su un vetrino da microscopio (2,5 x 7,5 cm), precedentemente lavato con acqua distillata, etanolo al 70% e acetone. Il vetrino è stato posto in stufa a 37°C per 24 ore in modo da favorire l'evaporazione dell'acqua. Dopo questo tempo si osserva la solidificazione del film di STBT che ingloba le nanoparticelle di CSPIBCA. Il film è stato dunque prelevato dal vetrino e collocato nell'apparecchiatura per l'allungamento del film e delle nanoparticelle in esso contenute (**Figura 5**). L'allungamento è stato condotto in stufa a 50°C, con una velocità di estensione di 0,5 mm/minuti.



**Figura 5. Apparecchiatura utilizzata per l'allungamento delle nanoparticelle di CSPIBCA**

L'allungamento massimo ottenuto è pari al 120 % delle dimensioni iniziali del film stesso. La concentrazione massima di nanoparticelle disperdibili all'interno della matrice di STBT, nonché l'allungamento massimo a cui tale film poteva essere sottoposto è stato valutato grazie allo strumento TAXT2, in grado di misurare la forza necessaria ad allungare il film fino al punto di rottura. In seguito all'allungamento, il film è stato rapidamente riportato a temperatura ambiente utilizzando un sistema di raffreddamento (**Figura 6**), che consiste nel far passare dell'aria compressa all'interno di un tubo di silicone immerso in ghiaccio secco e etanolo al 70%.



**Figura 6. Sistema di raffreddamento**

#### **3.3.4. Purificazione delle ECIB ottenute con il film commerciale di STBT**

Il film, in seguito a raffreddamento, è stato solubilizzato in 500  $\mu\text{l}$  di acido nitrico 0,2 M. Quindi è stata effettuata una purificazione mediante size exclusion chromatography (SEC), con una colonna alta 5 cm e larga 2 cm, utilizzando come fase mobile il gel Sephacryl S-1000, precedentemente trattato con tampone acetato (pH 3,2). Tale tampone è stato anche utilizzato come fase mobile.

#### **3.3.5. Size, potenziale Zeta e indice di polidispersione**

Il raggio idrodinamico (Size), l'indice di polidispersione (IP) e il potenziale Zeta sono stati valutati con uno strumento Nanosizer® N4PLUS (Beckman-Couter, Villepinte, France).

#### **3.3.6. Transmission Electron Spectroscopy (TEM)**

Le immagini TEM sono state acquisite mediante microscopio elettronico a trasmissione MET JEOL 1400 (120kV)

### 3.3.7. Quantificazione dei gruppi tiolici mediante titolazione iodometrica

La quantità dei gruppi tiolici dei tiomeri di chitosano e glicole-chitosano è stata calcolata mediante titolazione iodometrica.<sup>(65)</sup> Sono state preparate differenti soluzioni di polimeri tiolati (0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,1 mg/ml e 0,05 mg/ml) in tampone acetato (0,5 mol/l). Quindi ad ogni soluzione sono stati aggiunti 1 ml di una soluzione acquosa di amido (1%) e 0,5 ml di ioduro (1 mmol/l). La miscela è stata lasciata per 24 ore a temperatura ambiente e protetta dalla luce. Quindi i campioni sono stati centrifugati (10 min a 3500 rpm), è stato prelevato il sovrantante e ne è stata misurata l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 570 nm. Il chitosano ed il glicole-chitosano non modificati sono stati utilizzati come polimeri di controllo. La quantità di gruppi tiolici è stata calcolata dalla retta di calibrazione ottenuta utilizzando soluzioni di cisteina cloridrato a concentrazioni note (70-20  $\mu\text{mol/l}$ ). Lo iodio favorisce l'ossidazione dei gruppi tiolici, mentre lo iodio in eccesso reagisce con l'amido formando un complesso blu, la cui intensità dipende dalla quantità di ioduro rimasta in soluzione. Tale intensità può essere misurata ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

Una volta misurata la quantità di gruppi tiolici dei tiomeri, si è proceduto a quantificare i gruppi tiolici presenti sulla superficie delle nanoparticelle. Un'aliquota della dispersione di nanoparticelle (2,5 ml) è stata incubata con 250  $\mu\text{l}$  di tampone acetato (pH 2,7), 300  $\mu\text{l}$  di una soluzione di ioduro (1 mmol/l) e 500  $\mu\text{l}$  di una soluzione di amido (4%). La soluzione di amido ad una concentrazione più elevata rispetto a quella utilizzata in precedenza è necessaria in quanto la quantità di gruppi tiolici presenti sulla superficie delle nanoparticelle è inferiore rispetto a quella dei tiomeri in quanto tali. La miscela è stata lasciata a temperatura ambiente per 24 ore al riparo dalla luce. In seguito si è proceduto ad ultracentrifugare i campioni (15 min, 30.000 rpm) ed è stata misurata l'assorbanza del sovrantante ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

### 3.3.8. Test di mucoadesione mediante contatto con tessuto intestinale di ratto

È stato prelevato l'intestino tenue di un ratto maschio di tipo Wistar (Charles River, L'Arbresle, France) e tagliato in segmenti di circa 5 cm di lunghezza e aperto incidendo lungo la vena mesenterica. Ogni segmento è stato tagliato con forbici lungo la vena mesenterica, aperto e quindi fissato sull'apposito supporto costituito da un piatto di alluminio (**Figura 7**).



**Figura 7. Supporto per il tessuto intestinale**

Successivamente, sulla mucosa sono stati versati 500  $\mu$ l di dispersione di NPs fluorescenti (5 mg/ml), precedentemente diluite con tampone Ringer, ed il tutto incubato a 37°C per un'ora al riparo dalla luce. In seguito l'eccesso di dispersione nanoparticellare è stato rimosso, il tessuto è stato lavato tre volte con del tampone Ringer, quindi prelevato dall'apposito supporto e disperso in 5 ml di una soluzione di Sodio Dodecil solfato (SDS) 2% m/v e NaOH 1% m/v in acqua MilliQ ed incubata per 24 ore a 37°C in bagno oscillante.

Il campione è stato analizzato con un fluorimetro (spettrometro L550B, Perkin Elmer, Norwalk, USA), con emissione a 575 nm e con eccitazione alla lunghezza d'onda di 555 nm. Come riferimento è stato utilizzato del tessuto intestinale trattato esclusivamente con tampone Ringer. La percentuale di mucoadesione delle NPs nel muco è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{Mucoadesione (\%/cm}^2\text{)} = \frac{F(m) - F(b)}{2 \times F(t_0)} \times 100$$

dove:

F(m) è la fluorescenza del tessuto trattato con la dispersione di nanoparticelle

F(b) è la fluorescenza del tessuto non trattato

F(t<sub>0</sub>) è la fluorescenza della dispersione nanoparticellare prima che essa venga messa a contatto col tessuto intestinale (al tempo 0)

### 3.3.9. Test di mucoadesione mediante l'utilizzo delle camere di Ussing

La valutazione della mucoadesività è stata condotta anche mediante l'utilizzo delle camere di Ussing. Per tale metodica è stato utilizzato l'intestino tenue di ratto maschio di tipo Wistar di 200-250 mg (Charles River, L'Arbresle, France). Un centimetro di tale intestino è stato prelevato, aperto incidendo lungo la vena mesenterica e posizionato tra le semicelle che compongono la camera di Ussing, con area esposta di  $0,5 \text{ cm}^2$ , facendo attenzione a rivolgere il tessuto mucoso verso la semicella del donatore. La camera di Ussing è stata posizionata su un supporto termostataato a  $37^\circ\text{C}$ , con flusso d'ossigeno, in modo tale da mimare al meglio le condizioni fisiologiche. Quindi nel compartimento del ricevente sono stati inseriti 2 ml di tampone Ringer, mentre nel compartimento del donatore sono stati inseriti 2 ml della dispersione di nanoparticelle, al riparo dalla luce (**Figura 8**).



**Figura 8. Camere di Ussing**

Prelievi a 0, 30, 60, 90 e 120 minuti sono stati effettuati sia dal comparto donatore che dal ricevente, ed inoltre sono state annotate negli stessi intervalli di tempo i valori di differenza di potenziale (ddp) e intensità di corrente (I) ai due lati del tessuto intestinale, così da poterne ricavare la conduttanza. Dopo 120 minuti, il tessuto è stato prelevato e disperso in 1 ml di una soluzione di SDS 2% v/v e NaOH 1% v/v in acqua MilliQ ed incubata per 24 ore a 37°C in bagno oscillante. Il campione è stato analizzato con fluorimetro (spettrometro L550B, Perkin Elmer, Norwalk, USA), con emissione a 575 nm con e di eccitazione a 555 nm. Come riferimento è stato utilizzato tessuto intestinale trattato con solo tampone Ringer. La percentuale di mucoadesione delle NPs nel muco è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{Mucoadesione (\%/cm}^2\text{)} = \frac{F(m) - F(b)}{0,2 \times F(t_0)} \times 100$$

dove:

F(m) è la fluorescenza del tessuto trattato con la dispersione di nanoparticelle

F(b) è la fluorescenza del tessuto non trattato

F(t<sub>0</sub>) è la fluorescenza della dispersione nanoparticellare prima che essa venga messa a contatto col tessuto intestinale (al tempo 0)

### 3.4. RISULTATI E DISCUSSIONI

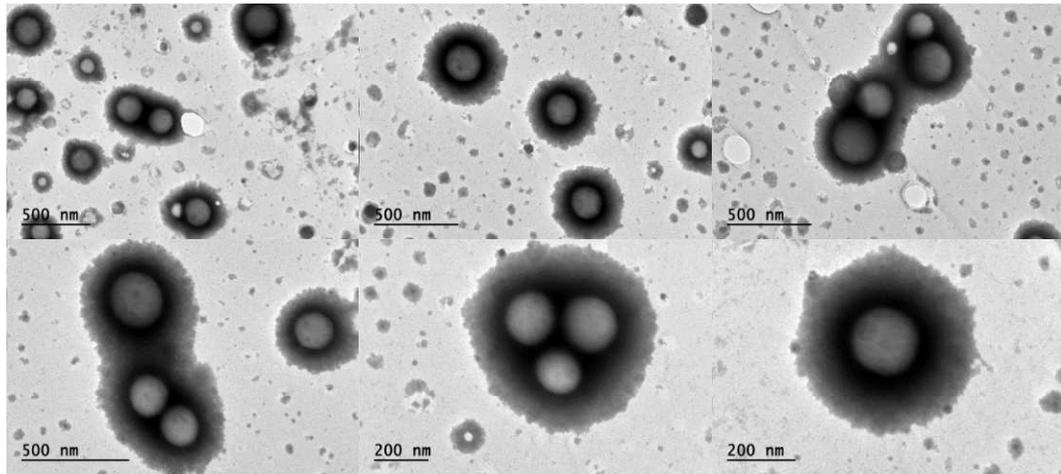
Le NPs di CSPIBCA e CS-derivatiPIBCA sono state preparate seguendo il metodo di polimerizzazione radicalica descritto in letteratura,<sup>(64)</sup> con una minore modificazione e precisamente quella di conservare, in seguito a purificazione mediante dialisi, la dispersione di nanoparticelle in acido cloridrico a pH 2.5, in modo da aumentarne la carica superficiale e ridurre il tempo di l'aggregazione. Le NPs sono state caratterizzate dal punto di vista delle dimensioni (size), carica elettrica superficiale (potenziale zeta) e indice di polidispersione (IP) e i risultati sono riportati in **Tabella 1**. Le NPs di GCPIBCA e GC-derivatiPIBCA sono state preparate in maniera analoga.

**Tabella 1. Dati di Size, potenziale Zeta e indice di polidispersione delle nanoparticelle preparate.**

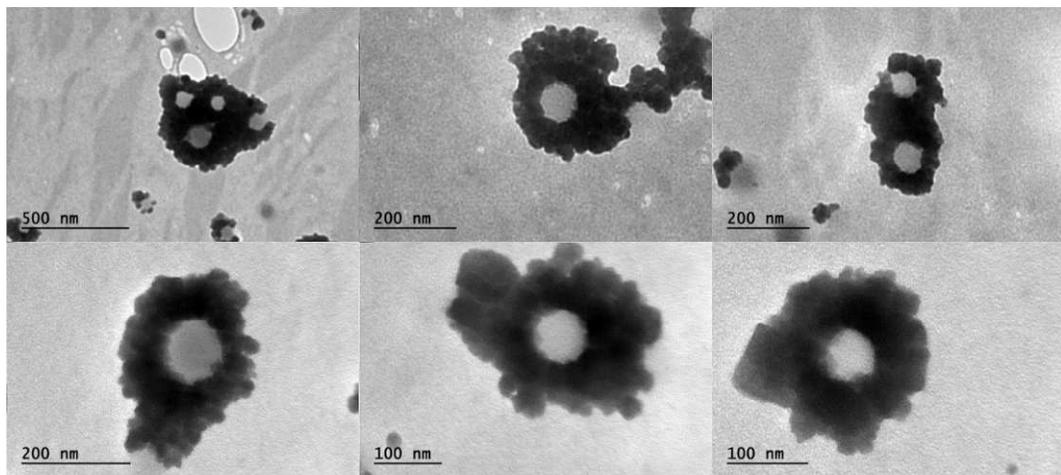
	CSPIBCA	CNPIBCA	CGPIBCA	GCPIBCA	GCNPIBCA	GCGPIBCA
<b>Size (nm)</b>	400,6±9,3	605,2±14,5	603,0±98,1	186,7±1,9	295,6±19,0	309,3±11,0
<b>Zeta (mV)</b>	41,1±1,2	41,8±1,6	25,5±1,0	37,2±1,1	48,7±0,9	31,2±0,9
<b>IP</b>	0,046±0,0	0,258±0,1	0,582±0,2	0,044±0,0	0,318±0,1	0,325±0,0

Da tali risultati si può constatare che quando si utilizzano polimeri tiolati, la grandezza delle nanoparticelle aumenta rispetto al polimero di partenza. Inoltre, in seguito ad idrolisi, il GCS e tio-derivati mostrano un raggio idrodinamico medio di circa la metà rispetto ai corrispondenti del chitosano e suoi derivati. Il potenziale Zeta positivo è conseguenziale all'utilizzo di acido cloridrico a pH 2,5 nel quale le nanoparticelle sono state conservate. Benché l'indice di polidispersione dei derivati tiolati risulti essere più elevato rispetto a CSPIBCA e GCPIBCA, dalle immagini TEM (**Figura 9.**) si evince come esse risultino essere aggregati nanoparticellari, facilmente separabili in seguito a vigorosa agitazione

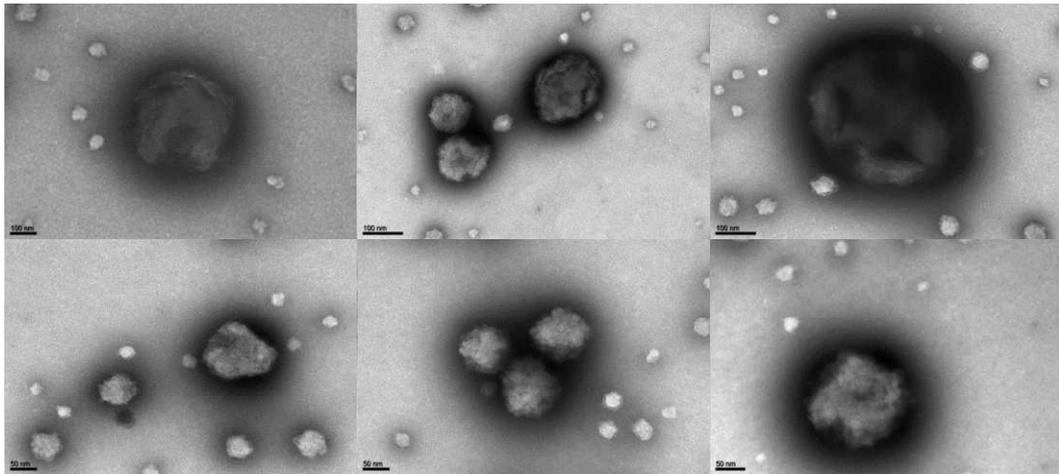
### CSPIBCA



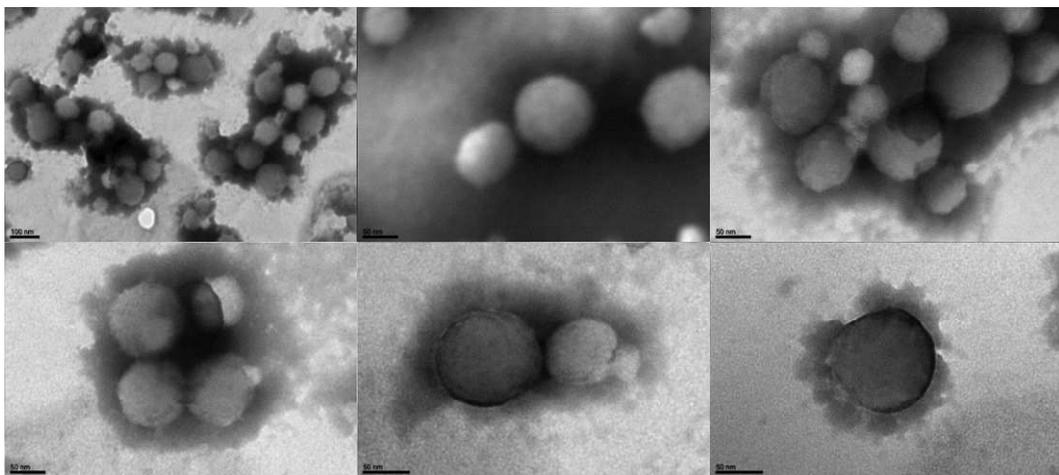
### GCPIBCA



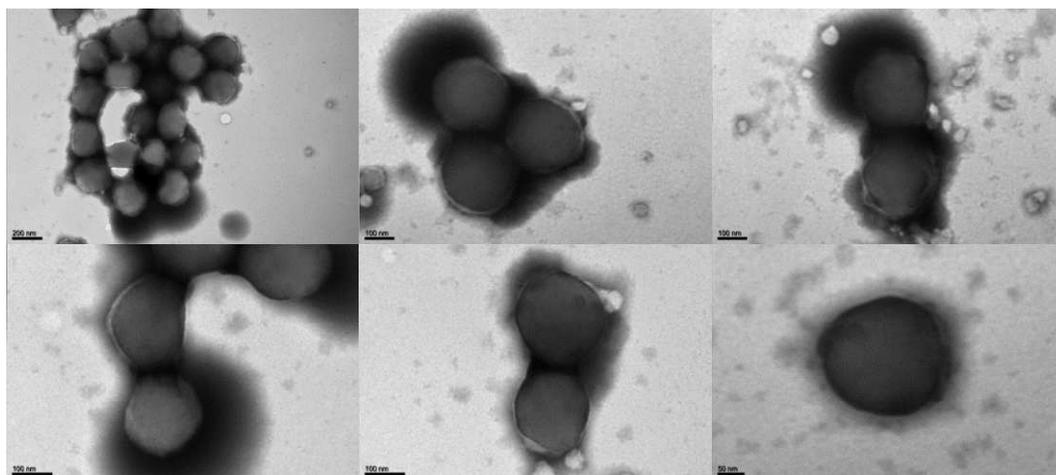
### GCNPIBCA



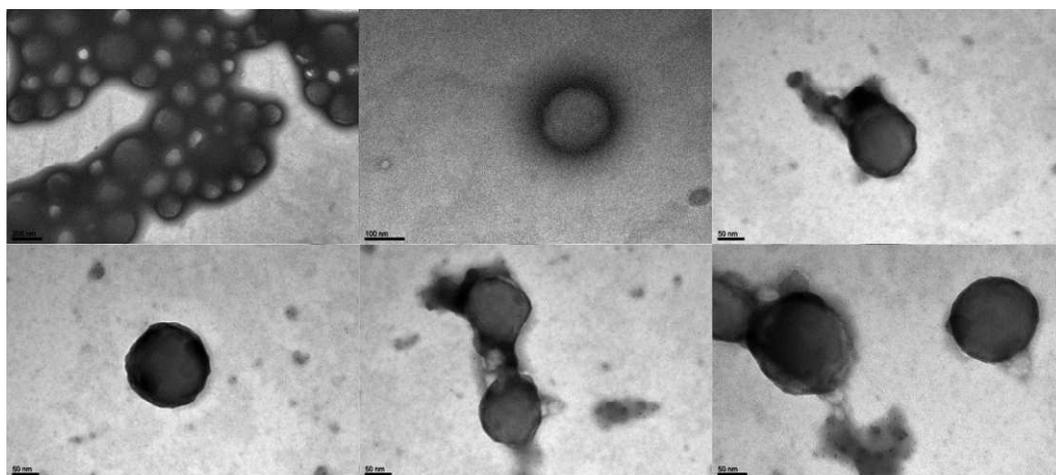
### GCGPIBCA



### CNPIBCA



### CGPIBCA



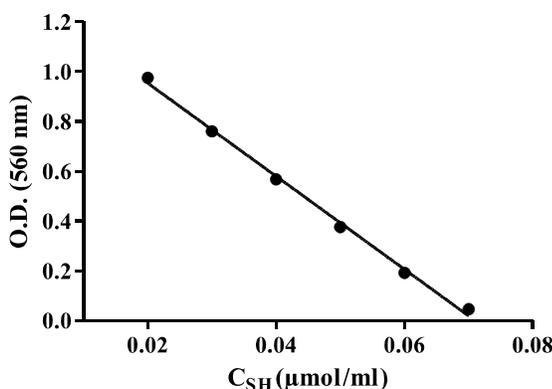
**Figura 9. Microscopia a trasmissione elettronica di CSPIBCA, GCPIBCA, GCNPIBCA, GCGPIBCA, CNPIBCA e CGPIBCA**

Dai risultati dell'analisi elementare riportati in **Tabella 2** si nota che le percentuali atomiche misurate di C, H e N dei derivati tiolati (% mis.) sono compatibili con quelle teoriche, (% teor) con conseguente riprova dell'avvenuta derivatizzazione dei polimeri di partenza (CS e GCS) con NAC e GSH.

**Tabella 2. Risultati dell'analisi elementare effettuata sui polimeri tiolati e sui reattivi di partenza.**

	GSH		N-Ac Cisteina		CS		GCS		CSNAC		CSGSH		GCSNAC		GCSGSH	
	% t	% m	% t	% m	% t	% m	% t	% m	% t	% m	% t	% m	% t	% m	% t	% m
<b>C</b>	39	39,1	37	36,8	37	33,3	43	42	ND	ND	43	38,4	44	40	44	39,6
<b>H</b>	6	5,5	6	5,5	7	6,7	8	7,1	ND	ND	5	6,3	7	7	6	6,5
<b>N</b>	14	13,5	9	8,5	7	6,1	6	5,5	ND	ND	13	10,5	8	6	11	9,5

La quantificazione dei gruppi tiolici dei tiomeri e delle nanoparticelle, ottenuta interpolando i risultati della assorbanza misurata con la retta di taratura della cisteina cloridrato (**Figura 10**), è riportata in **Tabella 3**.



**Figura 10** retta di taratura della cisteina cloridrato

Dai risultati ottenuti si osserva che per le nanoparticelle formulate con i tiomeri del chitosano le NPs di CNPIBCA hanno una concentrazione tiolica superficiale inferiore alle NPs di CGPIBCA. Per quanto riguarda i tiomeri del glicole chitosano, invece, le NPs di GCNPIBCA presentano una concentrazione tiolica superficiale superiore rispetto alle NPs di GCGPIBCA.

**Tabella 3. Risultati della quantificazione mediante titolazione iodometrica delle nanoparticelle**

	CNPIBCA	CGPIBCA	CSPIBCA	GCNPIBCA	GCGPIBCA	GCIPIBCA
$\mu\text{mol SH}/\text{cm}^2$	$250 \times 10^{-4}$	$310 \times 10^{-4}$	$90 \times 10^{-4}$	$210 \times 10^{-4}$	$100 \times 10^{-4}$	$80 \times 10^{-4}$

In **Tabella 4** sono riportati i risultati dei test di mucoadesione, dai quali si evince che i derivati tiolici risultino avere caratteristiche mucoadesive più rilevanti rispetto a CSPIBCA e GCIPIBCA, fatta eccezione per il GCNPIBCA.

**Tabella 4. Risultati dei test di mucoadesività espressi in termini di percentuale di nanoparticelle legate al tessuto intestinale rispetto alla quantità totale di partenza, per  $\text{cm}^2$ .**

	CNPIBCA	CGPIBCA	CSPIBCA	GCNPIBCA	GCGPIBCA	GCIPIBCA
Mucoadesione ( $\%/ \text{cm}^2$ )	37,32	32,88	20,1	4,12	24,07	23,56

Tali risultati sono confermati dai dati ricavati dall'analisi di mucoadesione effettuati mediante le camere di Ussing. Infatti da tali valori si può notare che i derivati tiolici mostrano spiccate caratteristiche mucoadesive, nettamente superiori rispetto ai derivati non tiolati di partenza (**Tabella 5**).

**Tabella 5. Risultati dei test di mucoadesività mediante camere di Ussing espressi in termini di percentuale di nanoparticelle legate al tessuto intestinale rispetto alla quantità totale di partenza, per  $\text{cm}^2$ .**

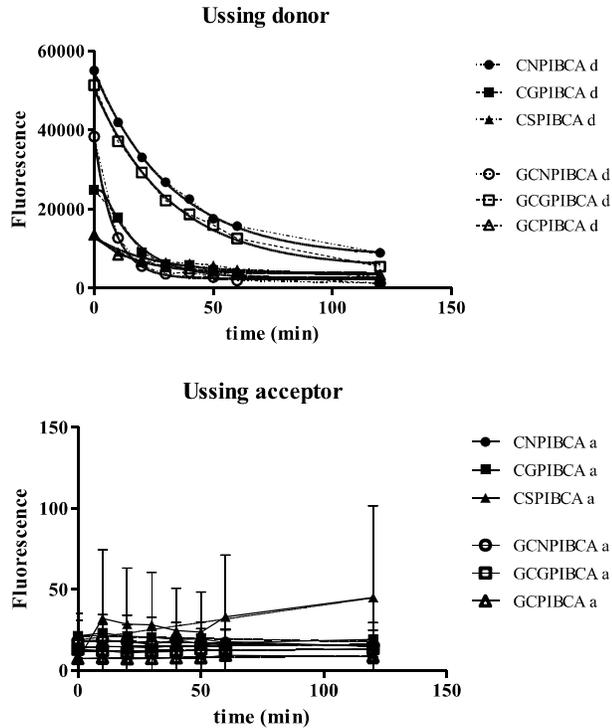
	CNPIBCA	CGPIBCA	CSPIBCA	GCNPIBCA	GCGPIBCA	GCIPIBCA
Mucoadesione $\%/ \text{cm}^2$	$90,7 \pm 57,1$	$53,3 \pm 44,9$	$20,1 \pm 9,9$	$14,2 \pm 9,4$	$58,3 \pm 39,0$	$19,4 \pm 3,12$

Inoltre dai risultati della conduttanza (**Tabella 6**) osservata e quindi della resistenza transepiteliale (TEER) si deduce che il passaggio delle nanoparticelle all'interno delle cellule della mucosa sia di tipo transcellulare, ad eccezione di GCNPIBCA e GCGPIBCA, in cui il repentino aumento di conduttanza è spiegato da un passaggio paracellulare delle nanoparticelle stesse.

**Tabella 6. Valori di conduttanza delle nanoparticelle .**

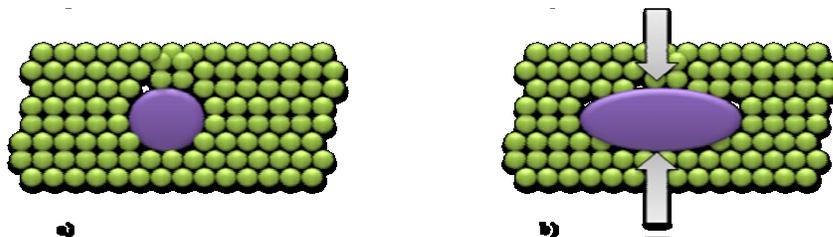
Conduttanza (mS/A)						
t (min)	CNPIBCA	CGPIBCA	CSPIBCA	GCNPIBCA	GCGPIBCA	GCIPIBCA
0	0	0	0	0	0	0
30	15,93	46,28	51,21	27,57	33,83	21,91
60	20,12	36,49	59,04	40,80	21,03	36,45
120	25,97	36,90	61,24	127,52	181,01	40,05

In **Figura 11** sono riportati i grafici delle variazioni di concentrazione nel compartimento donatore e accettore. Come si può notare, la concentrazione si riduce drasticamente nel compartimento donatore, mentre nell'accettore rimane pressoché costante, e questo è spiegato con la scarsa propensione delle nanoparticelle ad attraversare il tessuto intestinale, e restare saldamente adese alla superficie della mucosa stessa.



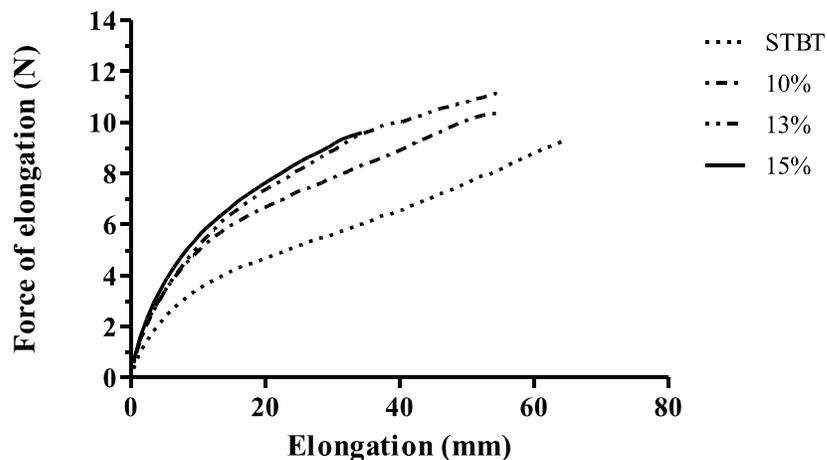
**Figura 11. Variazione di fluorescenza nel compartimento donatore e accettore delle nanoparticelle tioderivate.**

Per quanto riguarda le NPs di forma allungata, la modifica della morfologia delle CSPIBCA è attribuita alla forza che le molecole che compongono l'STBT esercitano sulla superficie delle nanoparticelle, durante il processo di stiramento del film (**Figura 12**). Tale principio si basa infatti sulla maggiore flessibilità delle CSPIBCA a temperature uguali o superiori ai 50°C. Tale caratteristica è indispensabile perché le nanoparticelle subiscano la pressione dell'STBT e la conseguente variazione di forma.

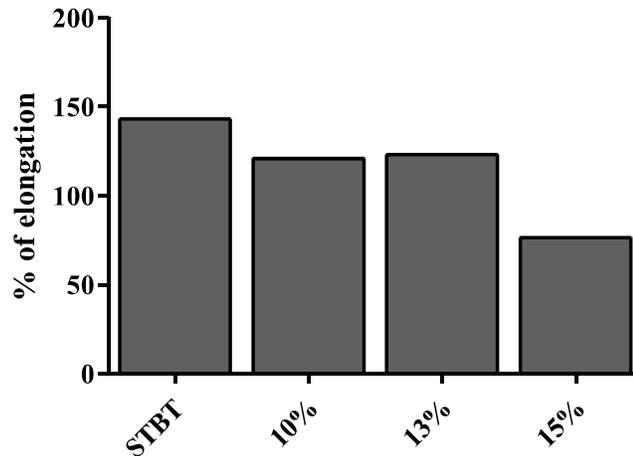


**Figura 12. CSPIBCA prima a) e dopo b) l'allungamento. In b) si osserva la forza che le particelle di STBT esercitano sul CSPIBCA a 50°C provocandone la deformazione**

Per valutare la concentrazione ottimale di CSPIBCA da aggiungere alla dispersione di STBT, sono stati preparati dei film di STBT con CSPIBCA a diversa concentrazione (10%, 13% e 15%). I film sono quindi stati allungati mediante lo strumento TAXT2 fino al loro punto di rottura. Un film di solo STBT è stato utilizzato come riferimento. I risultati sono riportati in **Figura 13**.

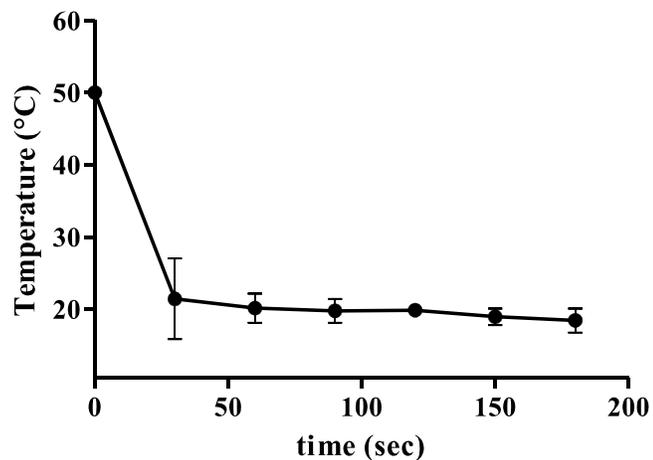


**Figura 13. Risultati del test di stretching con lo strumento TAXT2**



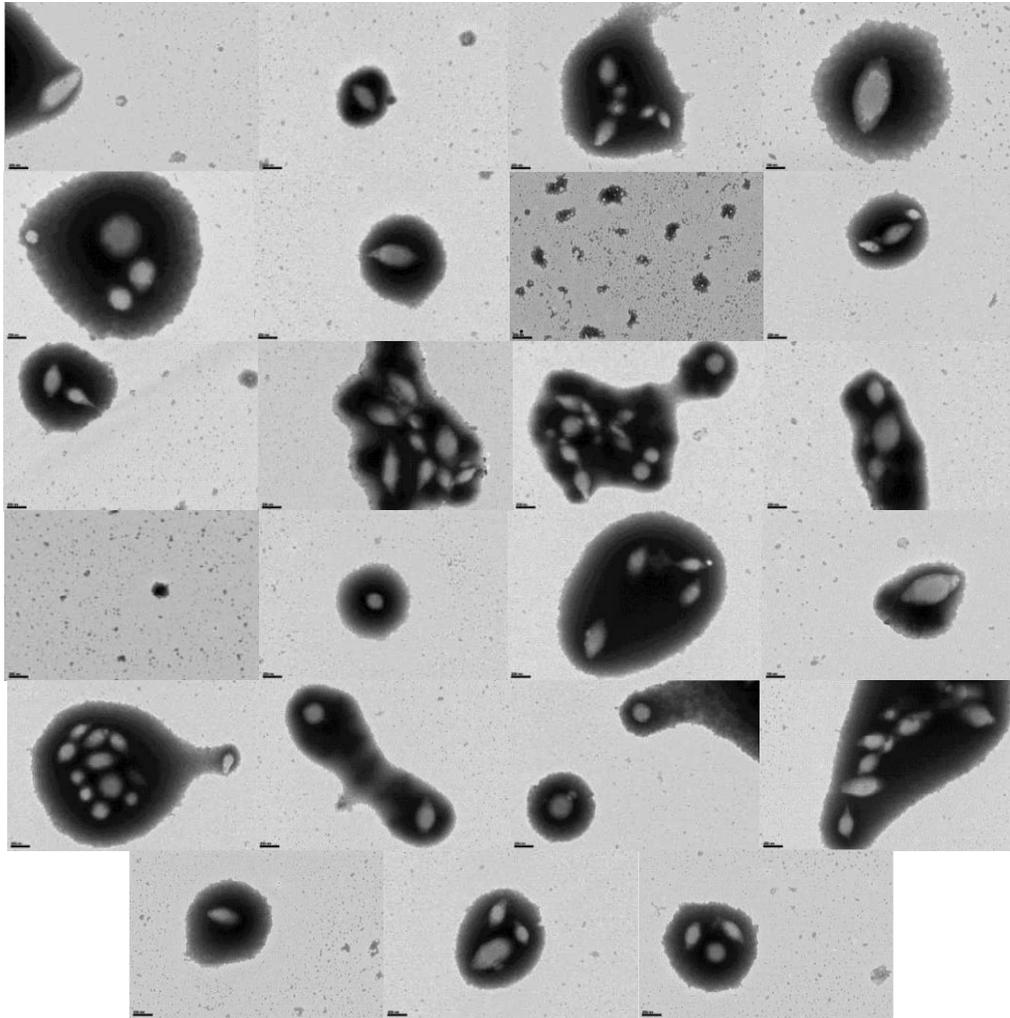
**Figura 14. Allungamento percentuale del film di STBT e NPs a differente concentrazione**

Dai risultati riportati in **Figura 14** si deduce che alla dispersione di STBT si può aggiungere al massimo, senza ridurne drasticamente le caratteristiche elastiche, una concentrazione di CSPIBCA del 13%. Inoltre molto importante è il tempo di raffreddamento delle nanoparticelle allungate, che deve risultare il più basso possibile. Infatti, più elevato è tale tempo di raffreddamento, maggiore sarà la possibilità che le nanoparticelle tornino alla forma sferica di partenza. Dalla **Figura 15** si nota che il sistema di raffreddamento utilizzato è molto efficace, ed è in grado di abbassare la temperatura da 50°C a 20°C in soli 30 secondi.



**Figura 15. Velocità di raffreddamento del film allungato**

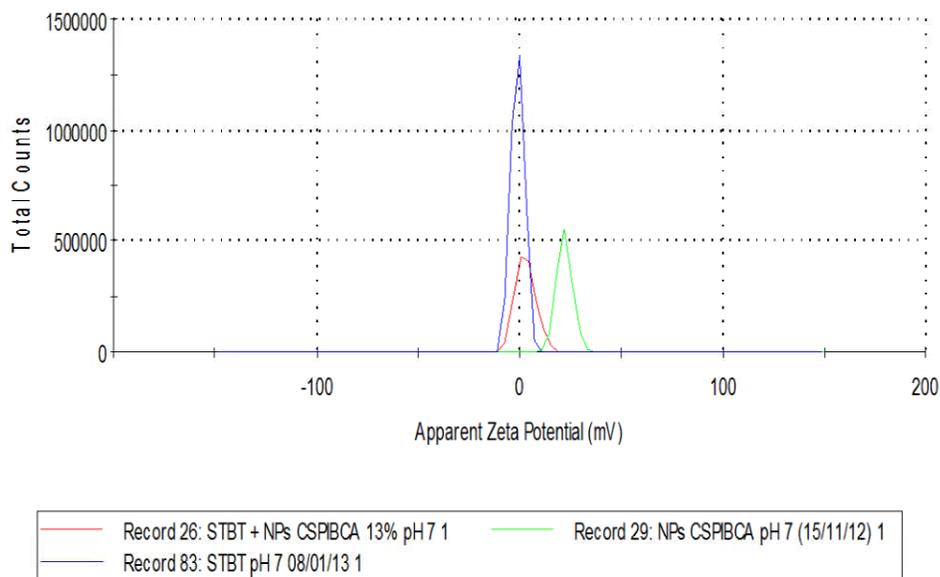
In seguito a dissoluzione in acqua, le ECIB si presentano circondate dall'STBT (**Figura 16**).



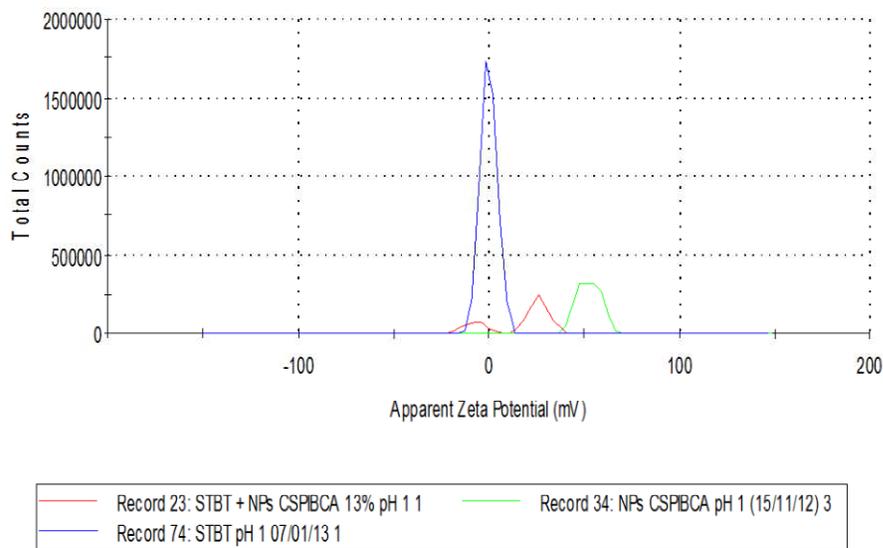
**Figura 16. Immagini TEM di ECIB non purificati**

L'interazione STBT-ECIB è confermata anche dalle misure del potenziale zeta (**Figura 17a**), che risulta essere pari a 0, in virtù del mascheramento delle cariche positive del chitosano, che ricopre l'ECIB, da parte del STBT stesso. E' stata valutata l'interazione ECIB-STBT a pH acidi dopo aver sciolto il film contenente le ECIB in acido nitrico 0.2 M, e quindi sono stati rivalutati i potenziale zeta (**Figura 17b**). E' stato notato che questi potenziali risultano di valore differenti se determinati a pH 1 o a pH 7 e questo può essere dovuto all'annullamento dell'interazione ECIB-STBT.

a)

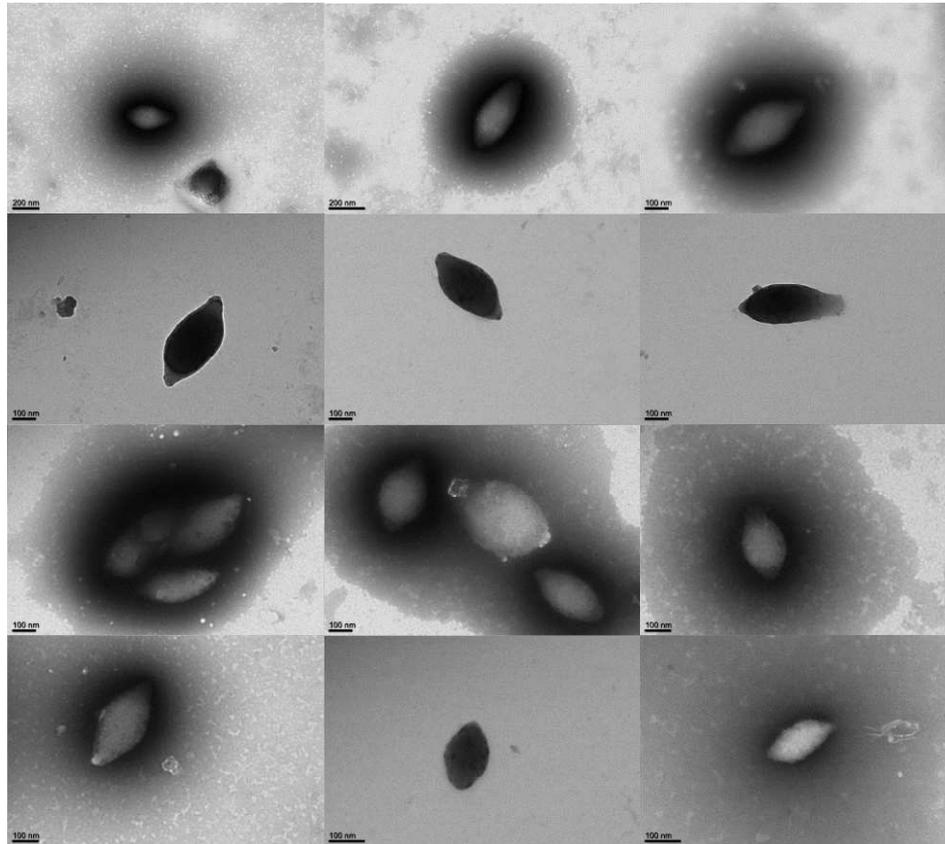


b)



**Figura 17. Potenziale Z della miscela ECIB/STBT a pH 7 (panel a) e a pH 1(panel b)**

Si è quindi proceduto alla purificazione mediante SEC delle nanoparticelle ECIB, utilizzando una fase mobile acida, così da mantenere separate queste nanoparticelle allungate dall'STBT. Dalle immagini TEM (**Figura 18**) si evince che tale tecnica di purificazione risulta efficace e preserva la forma allungata desiderata.



**Figura 18. Immagini TEM di ECIB purificati**

E' stato poi calcolato il fattore forma (Shape Factor, SF), come rapporto tra la lunghezza e l'altezza delle nanoparticelle (**Tabella 7**), il quale risulta essere uguale a  $1,76 \pm 0,29$  con circa 85% delle ECIB comprese tra 1,5 e 2,1 e solo il 15% delle ECIB risultano essere pressoché sferiche. E' noto infatti che valori di SF di gran lunga superiori all'unità sono indicativi di allungamento della forma e minor sfericità.

**Tabella 7. Distribuzione percentuale del fattore forma di ECIB**

<b><math>1.9 \leq SF \leq 2.10</math></b>	27,4	%
<b><math>1.7 \leq SF \leq 1.89</math></b>	32,3	%
<b><math>1.5 \leq SF \leq 1.69</math></b>	24,4	%
<b><math>1.3 \leq SF \leq 1.49</math></b>	10,4	%
<b><math>1.0 \leq SF \leq 1.29</math></b>	5,5	%

### 3.5. CONCLUSIONI

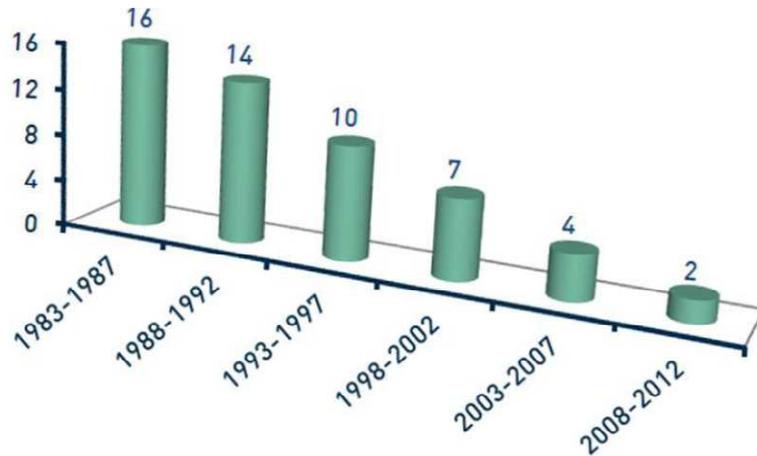
La preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle di PIBCA rivestite con derivati tiolici del CS e del GCS è stata con successo realizzata e sono state valutate le caratteristiche di mucoadesione di questi nuovi sistemi. Dal confronto è risultato che le proprietà mucoadesive delle nanoparticelle rivestite con tiomeri di CS e GCS sono più elevate rispetto a quelle dei polimeri di riferimento. Sono state inoltre trovate le condizioni sperimentali per la preparazione di nanoparticelle CSPIBCA allungate non contenenti alcun principio attivo.

Studi sono in corso finalizzati all'incapsulazione di alcuni principi attivi veicolabili per via orale in nanoparticelle CSPIBCA allungate per valutarne le caratteristiche chimico-fisiche, di rilascio e di biodistribuzione in confronto con quelle sferiche.

## CAPITOLO 4

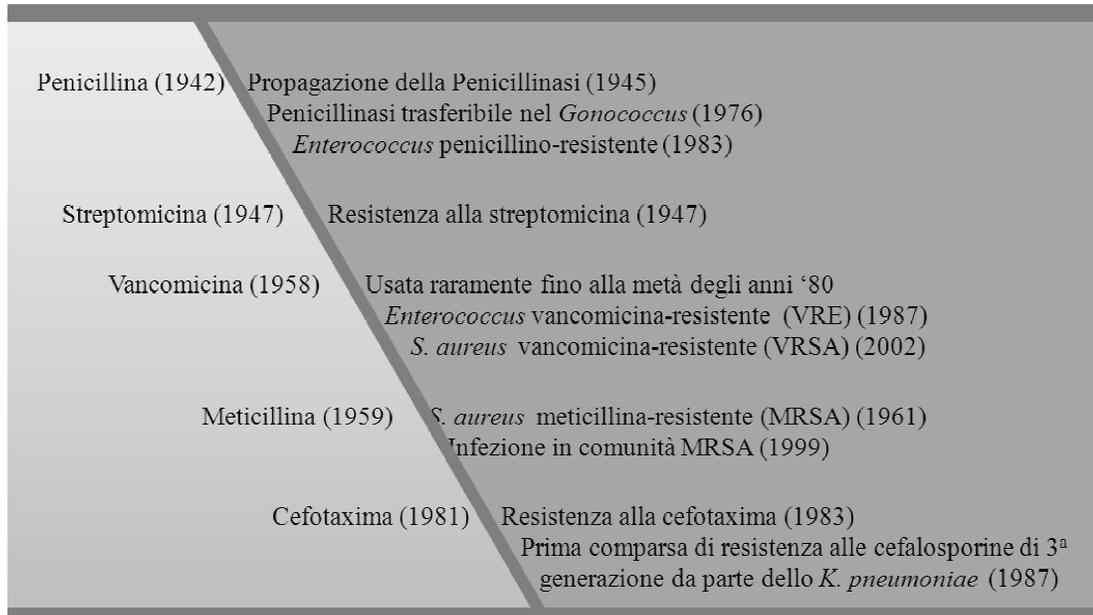
### 4.1. INTRODUZIONE

All'inizio del secolo scorso le infezioni microbiche erano la principale causa di mortalità per la popolazione mondiale.<sup>(66)</sup> È stato possibile osservare una significativa riduzione della mortalità legata alle patologie virali, batteriche e micotiche con l'identificazione di efficaci farmaci antimicrobici. La penicillina è stato il primo antibiotico caratterizzato da notevole attività ad essere individuato e sviluppato. A partire da quella importante scoperta lo sviluppo costante di nuovi agenti aventi attività antimicrobica ha portato alla introduzione nel mercato farmaceutico di un numero elevato di nuovi farmaci in grado di attaccare efficacemente gli organismi patogeni. Col passare del tempo, però, questa introduzione si è ridotta drasticamente in virtù delle sempre aumentate difficoltà incontrate nello sviluppo di questo tipo di molecole. Questo trend negativo è chiaramente visualizzato dall'istogramma in Figura 1 dove è riportato il numero di antibiotici approvati dalla FDA dal 1983 ad 2012.



**Figura 1. Numero di antibiotici approvati dalla FDA dal 1983 al 2012**

Queste maggiori difficoltà sono da porre in correlazione al costante e crescente sviluppo di ceppi resistenti agli antibiotici classici, i quali rendono inefficaci la maggior parte delle terapie cliniche comunemente utilizzate.<sup>(67, 68)</sup> La resistenza batterica agli antibiotici ha favorito la ricerca di nuove molecole aventi detta attività e nel contempo si è cercato di migliorare l'attività degli antibiotici già esistenti modificandoli chimicamente. Sfortunatamente la rapidità dell'insorgenza di resistenze e la frequenza con la quale esse si verificano (**Figura 2**) non garantiscono uno sviluppo tempestivo di agenti antimicrobici in grado di contrastare lo sviluppo di organismi patogeni.



**Figura 2. Date di introduzione sul mercato farmaceutico di alcuni antibiotici e quelle di acquisizione di resistenza da parte dei microorganismi**

Sono sempre più numerose le infezioni antibiotico-resistenti negli ospedali e nelle comunità, sostenute da ceppi patogeni sia di tipo Gram positivi che negativi<sup>(69)</sup> e che pertanto risultano difficili da trattare farmacologicamente. Il primo ceppo patogeno resistente agli antibiotici classici è stato l'enterococco resistente alla vancomicina (Vancomycin-Resistant *Enterococcus*, VRE). Questo ceppo non solo è in grado di resistere ad un elevato numero di antibiotici, ma mostra anche una buona capacità di sviluppare resistenza verso gli antibiotici di nuova generazione.<sup>(67)</sup>

Oltre il 40% degli *Staphylococcus aureus* che infettano i pazienti ospedalizzati sono resistenti alla meticillina (Methicillin-Resistant *S. Aureus*, MRSA)<sup>(66)</sup> ed alcuni di essi si sono dimostrati resistenti anche alla vancomicina. Quest'ultimo ceppo è uno dei più pericolosi, considerando che la vancomicina è l'antibiotico di ultima generazione più efficace per il trattamento delle infezioni da *S. aureus*.<sup>(70)</sup> Inoltre si osserva, soprattutto in ambito nosocomiale, lo sviluppo di ceppi Gram-negativi multi-resistenti, i quali presentano

più meccanismi biochimici di difesa contro diversi antibiotici.<sup>(67)</sup> Questi ceppi risultano resistenti anche alle cefalosporine di ultima generazione.<sup>(69)</sup>

Poiché molti microorganismi hanno sviluppato resistenza a numerosi antibiotici, l'individuazione di nuovi agenti antibatterici ed antifungini non convenzionali è diventato sempre più un campo di ricerca di considerevole competizione scientifica. Infatti, sono stati effettuati notevoli sforzi nella ricerca di nuovi antibiotici contro le infezioni da VRE, Vancomycin-Resistant *S. aureus*, (VRSA), MRSA, e altri microrganismi multiresistenti.

Un altro settore di competizione è il trattamento di patologie croniche quali la fibrosi cistica e altre malattie croniche polmonari ostruttive. Per il trattamento terapeutico di tali condizioni patologiche risulta necessario ricorrere a somministrazioni endovenose frequenti e in alte dosi di antibiotici, che possono provocare gravi effetti collaterali. Inoltre bisogna considerare che, in molti casi, nonostante un trattamento antibiotico aggressivo, si assiste ad una non completa eradicazione dell'infezione conseguente alla capacità dei batteri di formare una loro aggregazione in una matrice adesiva e protettiva nota come biofilm (biopellicola).

In anni recenti, un'importante risultato della ricerca rivolta al trattamento di patologie sostenute da microorganismi è stato quello di aver messo in evidenza l'utilità di alcune nanotecnologie farmaceutiche per la veicolazione di antibiotici e, in particolare per superare il fenomeno della antibiotico resistenza mostrato da alcuni agenti patogeni. A questo riguardo, è da notare che, per indicare questo tipo di nanovettori, è stato introdotto il termine di "Nanoantibiotici". Inoltre queste nanotecnologie hanno mostrato la loro utilità per la diagnosi di infezioni antimicrobiche. Tra i nanosistemi utilizzati quali nanoantibiotici, le nanoparticelle (NPs) sia polimeriche che a base metallica- sono state molto studiate in quanto forniscono nuove e interessanti opportunità. In particolare, NPs a base metallica costituiscono nanomateriali innovativi quando sono realizzate con metalli ad azione antimicrobica elevata, quali argento, rame o zinco.<sup>(71-73)</sup> Inoltre, NPs a base di materiale metallico sensibile a campi magnetici come ossido di ferro costituiscono una rapida e versatile strategia per rilevare le infezioni microbiche e quindi risultano molto utili anche dal punto di vista diagnostico. Così per esempio, NPs di ossido di ferro paramagnetico sono state utilizzate per l'identificazione del *Mycobacterium Tuberculosis*. In generale, le nanoparticelle metalliche ad attività antimicrobica mostrano un'attività

biologica e una durata d'azione significativamente più alte se confrontate al metallo non nanoparticellizzato di partenza.

In definitiva, si può affermare che le nanoparticelle metalliche mostrano caratteristiche importanti ed uniche che le rendono idonee per diverse applicazioni.

Negli ultimi anni le nanoparticelle di rame (CuNPs) hanno suscitato notevole interesse grazie alle loro potenziali applicazioni, in considerazione del fatto che il rame mostra una buona attività antimicrobica contro diversi ceppi batterici, ma anche contro miceti e virus.<sup>(67)</sup> L'attività antimicrobica del rame è conosciuta fin dall'antichità e questo metallo è stato infatti utilizzato da diverse popolazioni per il trattamento di svariate patologie e per la preparazione di prodotti disinfettanti.<sup>(74)</sup>

Il meccanismo d'azione del rame è stato studiato soltanto negli ultimi anni e non è ancora del tutto chiaro. Sembra che esso eserciti la sua azione microbica con l'attivazione di reazioni redox all'interno della cellula bersaglio. L'interazione del rame con i gruppi sulfidrilici degli enzimi è una delle più probabili vie di ossidazione delle proteine, legata alla formazione di radicali reattivi dell'ossigeno. I radicali sono a loro volta in grado di provocare danni irreparabili ai componenti cellulari come ossidazione delle proteine, sfaldamento delle molecole di DNA ed RNA e danni alle membrane biologiche in seguito a perossidazione lipidica.<sup>(75-78)</sup>

I nanomateriali in rame finemente dispersi mostrano un effetto antimicrobico elevato, in virtù delle dimensioni delle nanoparticelle che consentono un'interazione più efficace con le membrane batteriche. Ma le stesse proprietà possono provocare una maggiore azione tossica.

Una delle strategie utilizzabili per ridurre l'azione tossica delle nanoparticelle metalliche è quella di preparare nanomateriali impregnanti nanoparticelle metalliche stesse. Un'altra via perseguibile è quella di effettuare una co-polimerizzazione metallo-polimero o ancora includere le nanoparticelle metalliche in catene polimeriche mediante legami covalenti.

Infatti le nanoparticelle disperse in una matrice polimerica mostrano una tossicità ridotta. Se tali matrici polimeriche posseggono un'attività antimicrobica intrinseca, questa può essere sfruttata in sinergia con l'attività antibiotica del metallo utilizzato

Il chitosano (CS) è un polimero che mostra un ampio spettro di attività antimicrobica.<sup>(79)</sup> Il polimero e molti suoi derivati, formulati in forma di nanoparticelle hanno dimostrato una

buona attività antimicrobica contro batteri, virus e miceti.<sup>(79)</sup> Il CS si è mostrato attivo in particolare contro funghi e virus rispetto ai batteri. Comunque l'azione antibatterica del chitosano è più elevata nei confronti dei Gram-positivi piuttosto che dei Gram-negativi.<sup>(80, 81)</sup> L'attività del CS è legata al suo peso molecolare. Infatti, il CS a basso peso molecolare mostra un'attività antimicrobica più alta verso i Gram-negativi mentre il CS ad alto peso molecolare ha un'azione più efficace sui Gram-positivi.<sup>(82)</sup> Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che il CS ha evidenziato azione sinergica contro lo *P. aeruginosa* se utilizzato con il sulfametossazolo<sup>(83)</sup>

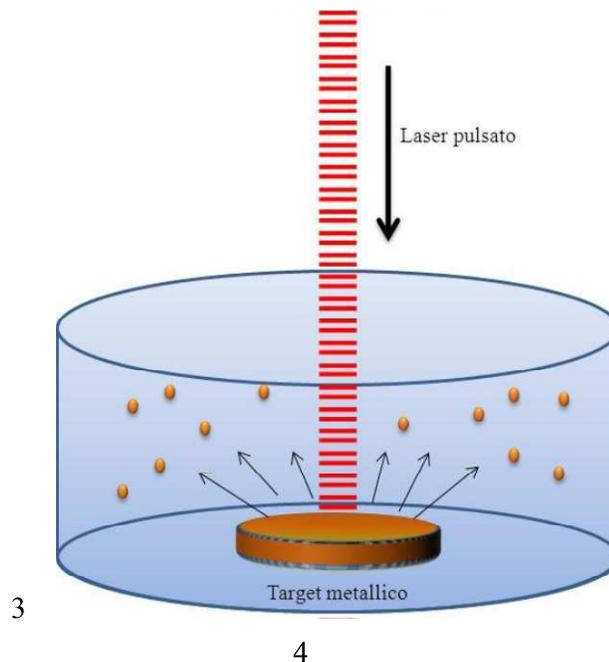
L'attività antimicrobica del CS può essere spiegata secondo diversi meccanismi. Il chitosano può infatti interagire con le cariche negative superficiali e provocare agglutinazione. Questo fenomeno provoca aumento della permeabilità della parete batterica e fuoriuscita dei componenti intracellulari.<sup>(83)</sup> Un altro meccanismo d'azione proposto vede la possibile chelazione, da parte del polimero, dei metalli necessari agli enzimi deputati alla crescita cellulare microbica.

Il CS è, come già prima riportato, scarsamente solubile a pH neutro, e l'utilizzo di soluzioni acide per la sua solubilizzazione complica lo studio del suo meccanismo d'azione.<sup>(79)</sup> I derivati idrosolubili mostrano una maggiore attività antimicrobica poiché sono in grado di distruggere la parte interna ed esterna della membrana batterica in maniera più efficace rispetto al CS stesso.

Tenendo conto delle caratteristiche descritte il CS può essere considerato un' ottimo rivestimento per le nanoparticelle metalliche.

## 4.2. SCOPO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA

Il lavoro descritto nel quarto capitolo della tesi di dottorato ha avuto come finalità la preparazione, caratterizzazione e valutazione dell'attività antimicrobica verso ceppi di *Escherichia coli* di NPs di rame rivestite da una matrice di chitosano (CuCS). Questi nano sistemi sono stati ritenuti interessanti in quanto potrebbe essere conseguita un'azione sinergica tra l'attività antimicrobica propria di NPs a base di rame e quella propria del policatione. A tale riguardo bisogna notare che, per realizzare questi nanosistemi, in principio possono essere utilizzati diversi metodi preparativi riportati in letteratura. In questo lavoro di tesi è stata studiata la potenzialità di una tecnica innovativa nota come “Ablazione con raggio laser” (*Laser Ablation*). La laser ablation consiste nel focalizzare impulsi laser su un target di metallo immerso in soluzione organica o acquosa. Per effetto di tali impulsi il target di metallo fornisce nanoparticelle dando luogo ad una dispersione colloidale<sup>(84)</sup> (**Figura 3**). Nel caso da noi studiato, il target Cu metallico è stato immerso in soluzioni a concentrazioni differenti di CS.



**Figura 3. Meccanismo d'azione della tecnica di “laser ablation” per la preparazione di nanoparticelle metalliche.**

La laser ablation ha diversi vantaggi rispetto ad altri metodi di preparazione di nanoparticelle metalliche: tempi di reazione brevi, temperatura di lavoro non elevate, nessun utilizzo di precursori chimici, nessuna impurità in seguito alla preparazione. Inoltre questa tecnica è molto versatile e permette la preparazione di diversi tipi di nanoparticelle, come nanoparticelle metalliche, nanostrutture semiconduttive e polimeriche. I parametri del laser, come lunghezza d'onda, frequenza di ripetizione dell'impulso, la sua ampiezza e la sua energia determinano la morfologia e le proprietà delle nanoparticelle risultanti, quali forma e indice di polidispersione. Inoltre il solvente utilizzato per la preparazione svolge un ruolo molto importante.

Bisogna notare che la sintesi di nanosistemi metallo-chitosano (Me-CS) sta suscitando un crescente interesse nella comunità scientifica, in quanto si stanno scoprendo molte interessanti loro applicazioni in diversi campi scientifici anche non biomedici-farmaceutici. Però, nonostante l'elevato numero di studi concernenti CS e metalli, l'inclusione di nanosistemi di rame (CuNPs) in una matrice di CS è stato poco studiata. Inoltre, per quanto a nostra conoscenza, l'utilizzo della Laser Ablation è stato investigato solo in un numero limitato di lavori scientifici in confronto ad altri metodi di sintesi di materiali Me-CS. Poiché le CuNPs si ossidano facilmente in condizioni ambientali, la maggior parte dei metodi di sintesi riportati usano CS come agente stabilizzante, aggiunto *in situ* durante la preparazione. Meno frequente è l'uso di CS come agente protettivo post-sintesi per la stabilizzazione del sistema colloidale. Dato un punto di vista farmaceutico, l'importanza di questa combinazione CuNPs-CS risiede nella possibile applicazione di questi materiali come agenti nano-antimicrobici, combinando la nota attività antimicrobica che da soli entrambi i costituenti posseggono. Nel presente studio è stata utilizzata una strategia in un'unica fase per la sintesi dei sistemi CuNPs-CS, utilizzando CS come agente stabilizzante *in situ*, in mezzo acquoso durante l'ablazione di un target solido di Cu .

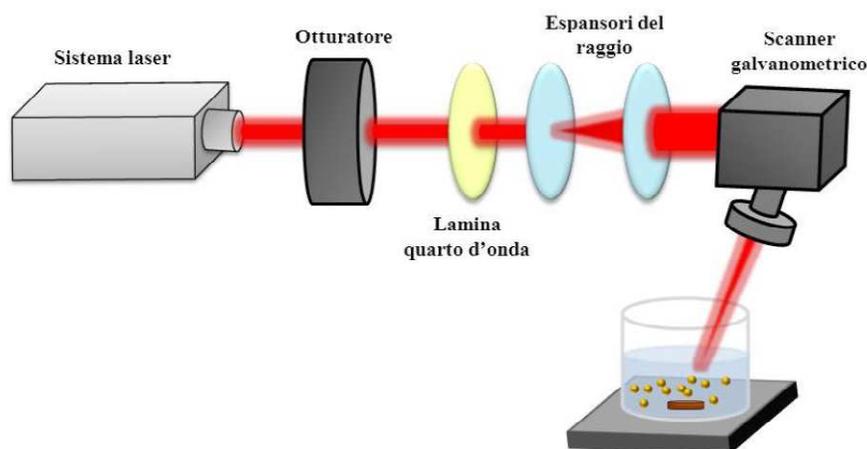
### 4.3. MATERIALI E METODI

I targets di rame (diametro 1 cm, spessore 1 mm, purezza 99,999%) sono stati acquistati da Good Fellow LTD. Il chitosano (CS, peso molecolare 50-190 kDa, grado di deacetilazione 75-85 %), l'ossido di alluminio ( $Al_2O_3$ , 95+%), l'acido acetico glaciale (purezza  $\geq 99,85\%$ ) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich e utilizzati come tali.

#### 4.3.1. Preparazione delle nanoparticelle di rame-chitosano (CuCS) a concentrazione di chitosano variabile

Il target di rame è stato lucidato con carta vetro e ossido di alluminio. Quindi è stato lavato immergendolo in acqua nel bagno ad ultrasuoni.

Allo stesso tempo sono state preparate tre soluzioni rispettivamente a 0,1 mg/ml (CuCS 0.1), 1,0 mg/ml (CuCS 1.0) e 3,0 mg/ml (CuCS 3.0) di chitosano in 10 ml di acido acetico 0,1% v/v e in ognuna di esse è stata inserita il target di rame. L'ablazione laser è stata effettuata usando un sistema laser a femtosecondi ( Active Fiber Systems GmbH ), il quale eroga impulsi laser (650 fs) alla lunghezza d'onda di 1030 nm , operando ad un tasso di ripetizione di 100 kHz e 70  $\mu$ J di energia di impulso, corrispondente a 7 W di potenza media. Il raggio laser è stato accoppiato ad uno scanner galvanometrico avente un'apertura di ingresso di 14 mm e poi messo a fuoco attraverso un obiettivo focale da 100 mm (lenti F- Theta) sulla superficie del target di rame (**Figura 4**).



**Figura 4. Schema di set-up utilizzato per la preparazione delle NPs CuCS mediante laser ablation.**

Durante il processo di ablazione laser, il fascio laser è stato scansionato su tutta la superficie del disco di rame attraverso schemi circolari concentrici utilizzando una distanza interlinea di 100  $\mu\text{m}$ . Sono stati effettuati 800 scansioni consecutive con una velocità di scansione di 300 mm/s.

La massa totale delle nanoparticelle preparate è stata determinata per differenza, pesando il target prima e dopo il processo sintetico e sottraendo il peso finale a quello iniziale del target di rame stesso.

#### **4.3.2 Size, potenziale Z e indice di polidispersione**

Le dimensioni e la carica superficiale delle nanoparticelle sono state valutate mediante Photon Correlation Spectroscopy (PCS) utilizzando uno strumento Zetasizer NanoZS (ZEN 3600, Malvern, Herrenberg, Germany).

#### 4.3.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

La morfologia delle NPs è stata valutata mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). La microscopia TEM è stata eseguita con uno microscopio FEI Tecnai 12 (120 kV; filamento: LaB6), depositando le dispersioni nanoparticellari colloidali su una griglia Cu Formvar ® rivestite (300 mesh, Agar Scientific).

#### 4.3.4. Analisi di superficie mediante spettroscopia elettronica a raggi X (XPS)

Sulle NPs preparate è stata effettuata un'analisi di superficie mediante X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) per valutare la composizione superficiale delle stesse e quindi stabilire i rapporti quali-quantitativi esistenti tra le molecole di chitosano e il rame. Per queste analisi è stato utilizzato uno spettrometro Thermo Fisher Scientific Theta Probe Spectrometer equipaggiato con una sorgente AlK $\alpha$  (spot=400  $\mu$ m) monocromatica e diametro dello spot del fascio di 300 micron. I campioni sono stati analizzati depositando una goccia delle dispersioni su una lamina di platino e allontanando l'acqua mediante riscaldamento. Gli spettri sono stati registrati con una modalità di analisi ad energia costante. Sono stati acquisiti spettri ad alta risoluzione con una energia di 150 e 100 eV, rispettivamente. Il tempo totale di acquisizione è stato inferiore a 30 min, che rappresenta un buon compromesso per ridurre al minimo il segnale dato dal rumore di fondo e allo stesso tempo esporre il meno possibile il campione alle radiazioni, in modo da non modificarne la composizione superficiale. Confrontando gli spettri del C1s e Cu2p all'inizio e alla fine di ogni analisi si è osservato che i cambiamenti degli spettrogrammi risultanti durante il tempo di analisi erano trascurabili.

Il trattamento dei dati ottenuti è stato condotto utilizzando il software commerciale Thermo Advantage (v. 4,75, © 1999-2010 Thermo Fisher Scientific) che si basa sui protocolli attualmente in uso nell'ambito dell'analisi di superficie mediante XPS.<sup>(70)</sup> Gli spettri risultanti sono stati corretti considerando gli effetti di spostamento del segnale in seguito all'effetto di carica elettronica esercitato dal fascio laser stesso sul campione analizzato, impostando l'energia di legame del componente alifatico del C1s a 284,8 eV.

Sono quindi state effettuate delle scansioni preliminari e delle scansioni ad alta risoluzione (C1s, O1s, N1s, Cu2p), acquisite con energia di analisi costante e con un'energia rispettivamente di 150 e 100 eV.

#### **4.3.5. Spettroscopia FT-IR**

Le nanoparticelle di CuCS a differenti concentrazioni sono state analizzate mediante spettroscopia FT-IR utilizzando uno spettrometro Perkin-Elmer 1600 FT-IR con scansione tra 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . In particolare, le nanoparticelle sono state liofilizzate e la polvere ottenuta è stata miscelata e pressata con potassio bromuro in modo da ottenere una compressa. Allo stesso modo è stato analizzato il CS in quanto tale e le nanoparticelle di solo rame entrambe utilizzate come confronto.

#### **4.3.6. Calorimetria differenziale a scansione (DSC)**

I termogrammi DSC sono stati ottenuti utilizzando un apparecchio Mettler Toledo DSC 822e Stare 202 System equipaggiato con un programma automatico di analisi termica. Circa 5 mg di ogni campione di nanoparticelle di CuCS sono stati analizzati mediante calorimetria differenziale a scansione, con un programma di riscaldamento di 5°C/minuto in presenza di un flusso di azoto.

#### **4.3.7. Spettrofotometria ultravioletta (UV)**

Gli spettri ultravioletti delle differenti nanoparticelle preparate sono stati registrati mediante uno strumento Perkin-Elmer Spectrometer Lambda Bio20, con acquisizione dello spettro tra 650 e 750 nm.

#### **4.3.8. Valutazione dell'attività antimicrobica delle nanoparticelle di CuCS su ceppi di *Escherichia Coli***

L'attività antimicrobica delle nanoparticelle è stata valutata utilizzando dei ceppi di *E.coli*. Sono state preparate delle brodo-culture primarie del batterio in Nutrient Broth. Quindi 1 ml di tale brodo-cultura è stato posto a contatto con i diversi campioni di CuCS. Sono state valutate anche le attività antimicrobiche di soluzioni a diversa concentrazione di CS come tale in modo tale da poterle utilizzare come riferimento.

L'attività di inibizione della crescita dell'*Escherichia Coli* da parte delle diverse miscele preparate è stata valutata dopo 4, 7 e 24 ore di incubazione a 42°C. Le nanoparticelle testate sono state quelle indicate come CuCS 0,1 mg/ml e CuCS 1,0 mg/ml. Le concentrazioni di nanoparticelle e di CS testate sono state di 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm e 10 ppm, rispettivamente .

Preliminarmente, sono state allestite diluizioni scalari della brodocoltura primaria in soluzione fisiologica (**Figura 5**), quindi 1 ml di ogni diluizione è stato inoculato in terreno nutritivo (Nutrient Agar Oxoid) seminando su piastra per il calcolo relativo della concentrazione del microrganismo.



**Figura 5. Diluizioni scalari della brodocoltura primaria in soluzione fisiologica**

Quindi la piastra è stata incubata a 42°C per 24 ore, e in seguito si è proceduto a stimare l'attività antimicrobica delle diverse formulazioni.

#### 4.4. RISULTATI E DISCUSSIONI

Le nanoparticelle di rame-chitosano sono state preparate mediante Laser Ablation nelle condizioni su riportate. L'efficienza di produzione mediante ablazione laser è risultata concentrazione di CS dipendente (**Tabella 1**). Infatti, è stato osservato che la massa di rame prodotta leggermente diminuiva con l'aumentare della concentrazione di CS.

**Tabella 1: Quantità di rame ablato in funzione della concentrazione di CS**

Soluzione	$\Delta m$ [mg]
HAc 0.1% v/v	$5.1 \pm 0.2$
HAc 0.1% v/v + CS 0.01mg/ml	$5.4 \pm 0.4$
HAc 0.1% v/v + CS 0.1mg/ml	$4.9 \pm 0.2$
HAc 0.1% v/v + CS 1mg/ml	$4.5 \pm 0.2$
HAc 0.1% v/v + CS 3mg/ml	$3.2 \pm 0.6$

Le caratteristiche chimico-fisiche delle CuNPs-CS prodotte sono state determinate mediante Photon Correlation Spectroscopy (PCS) e riportate in **Tabella 2**. I risultati ottenuti mostrano che le nanoparticelle preparate, utilizzando una soluzione di chitosano a concentrazione relativamente bassa (0,1 mg/ml e 1,0 mg/ml), sono caratterizzate da un diametro idrodinamico inferiore, compreso tra 95 e i 130 nm. Inoltre dal valore dell'indice di polidispersione (indice di polidispersione circa 0,2), si evince che la miscela è caratterizzata da una buona omogeneità in termini di grandezza nanoparticellare. (**Tabella 2**). Per quanto riguarda le nanoparticelle preparate ad una concentrazione di chitosano superiore (3 mg/ml), i risultati dell'analisi del raggio idrodinamico indicano che le nanoparticelle possiedono dimensioni più elevate (circa 400 nm) e un indice di polidispersione più ampio (0,52).

**Tabella 2. Size, indice di polidispersione e potenziale Z delle nanoparticelle di CuCS acquisiti mediante photon correlation spectroscopy (PCS).**

	<b>Size (nm)</b>	<b>Indice di polidispersione</b>	<b>Potenziale Z (mW)</b>
<b>CuCS 3,0</b>	402±195,23	0,52±0,09	15,35±4,10
<b>CuCS 1,0</b>	95±0,48	0,19±0,01	22,75±5,47
<b>CuCS 0,1</b>	128±12,49	0,20±0,04	7,53±1,81

L'elevato indice di polidispersione di quest'ultima formulazione può essere spiegato con la propensione del chitosano a formare agglomerati eterodispersi e disomogenei quando il polimero si trova a concentrazioni elevate.

Il potenziale zeta (**Figura 6**) presenta valori positivi, e ciò è in accordo con le caratteristiche chimiche del chitosano. Esso infatti è un polimero policationico, e quindi il potenziale Z aumenta all'aumentare della sua concentrazione.

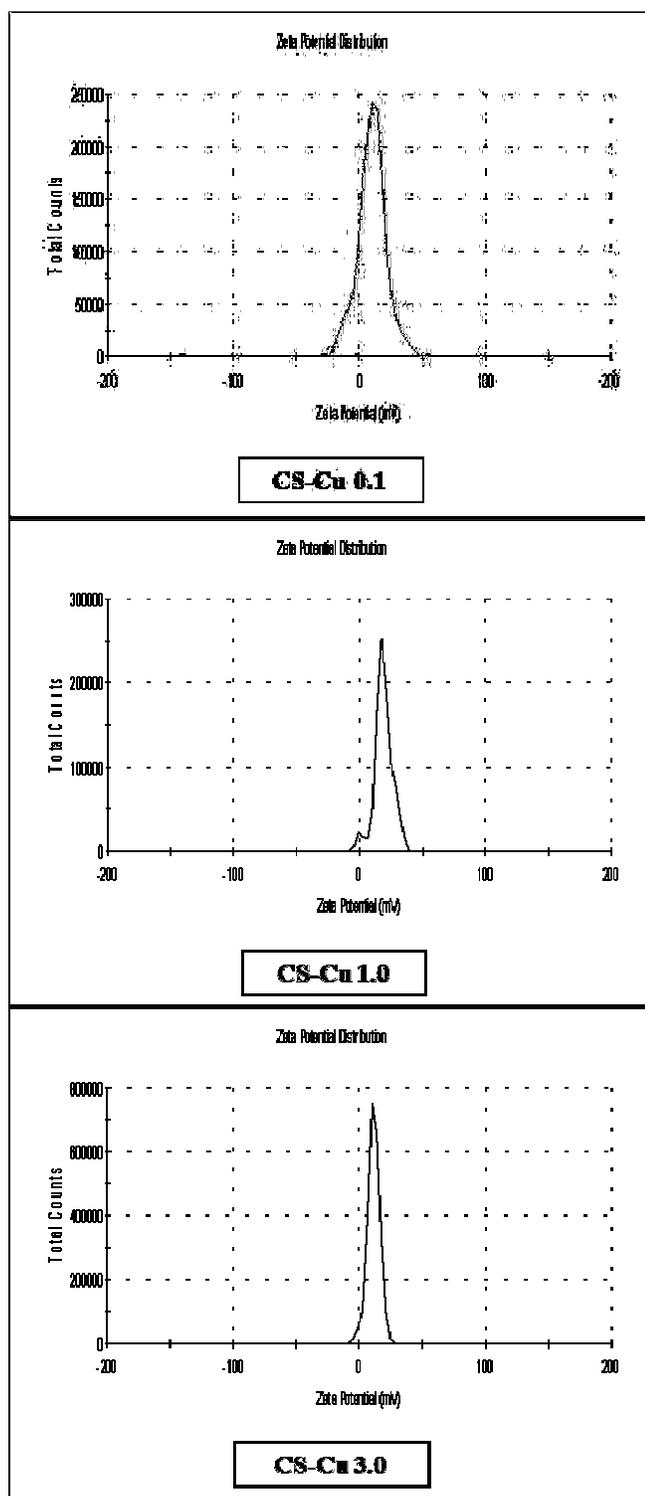
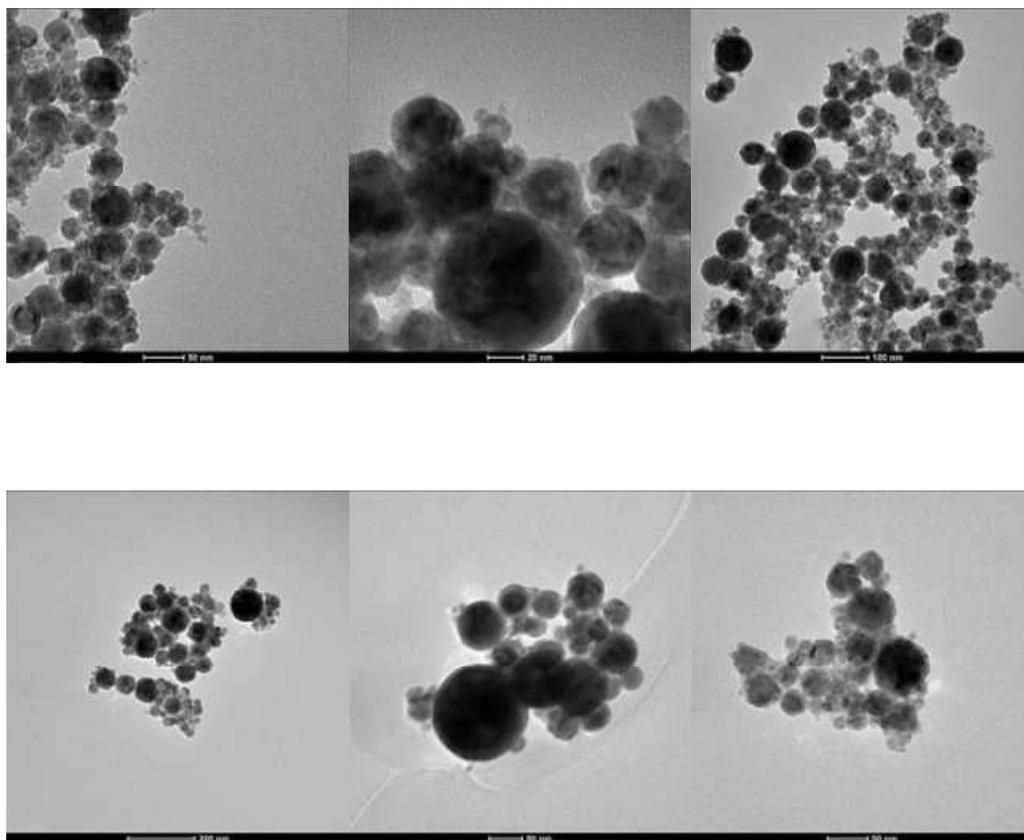


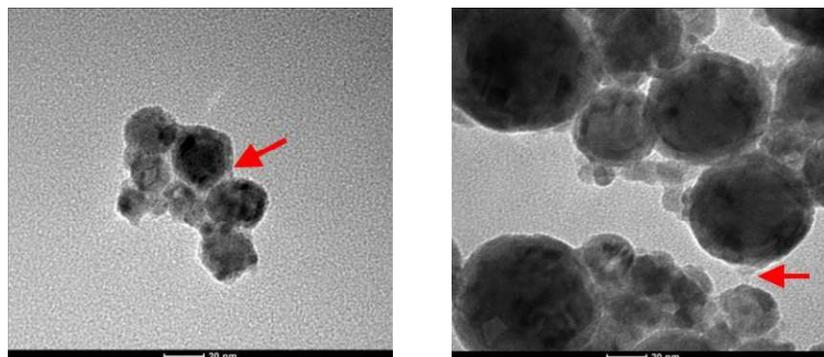
Figura 6. Potenziali Z delle nanoparticelle di CuCS 0,1; CuCS 1,0 e CuCS 3,0.

Dalle immagini TEM riportate in **Figura 7**, si deduce che le nanoparticelle di CuCS 0,1 posseggono una forma sferica con dimensioni comprese tra i 50 e i 150 nm, e questo è in totale accordo con i dati ricavati mediante PCS. In queste immagini è inoltre possibile osservare un core di rame circondato da uno shell di chitosano.



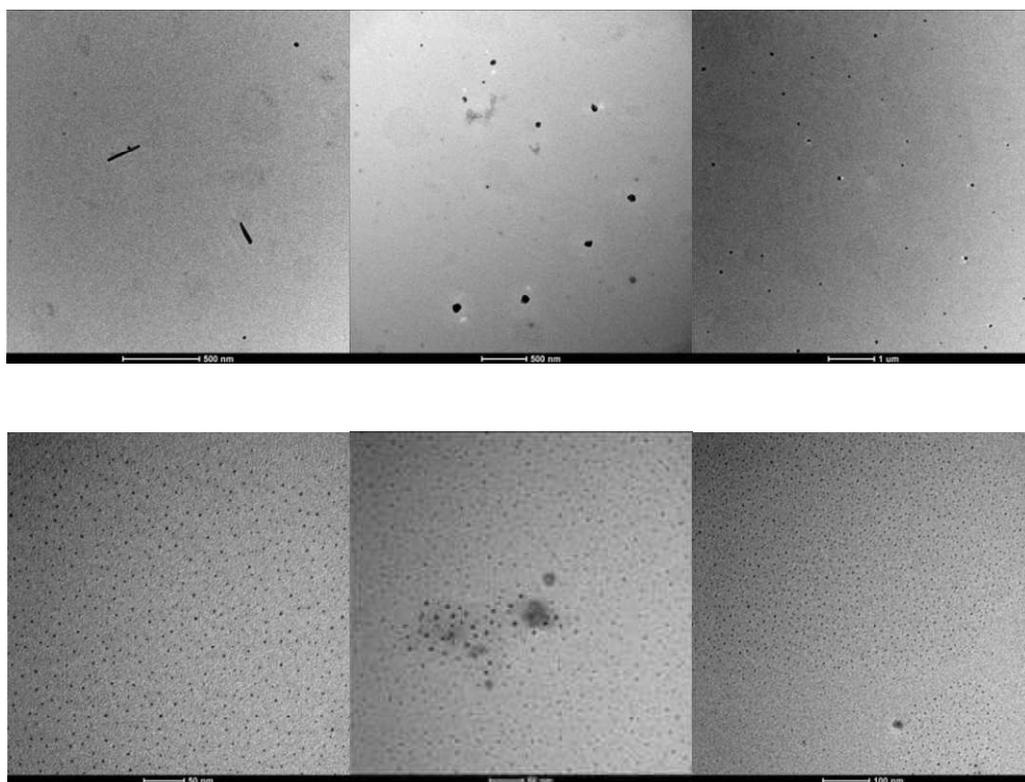
**Figura 7. Immagini di microscopia elettronica a trasmissione delle nanoparticelle di CuCS 0,1.**

In **Figura 8**, dove sono riportate altre immagini TEM si osserva che le nanoparticelle possono formare dei grappoli circondate dal chitosano, che crea quindi dei ponti di legame tra di esse.



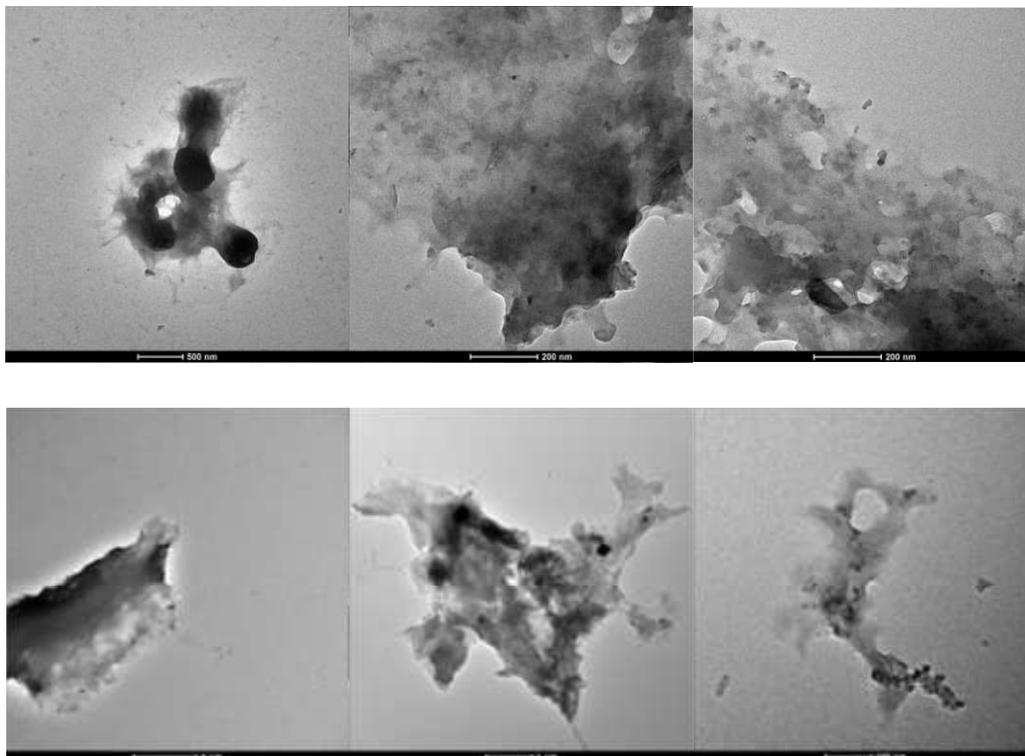
**Figura 8. Ponti di legame tra le nanoparticelle di rame effettuato dal chitosano**

Per quanto riguarda il CuCS 1.0, invece, altre immagini TEM (**Figura 9**) mostrano che il chitosano funge da matrice all'interno della quale le nanoparticelle di rame sono finemente disperse. Questa disposizione è ottimale per raggiungere gli obiettivi prefissati, in quanto il chitosano, circondando le nanoparticelle di rame, ne “maschera” l'attività tossica ed allo stesso tempo le protegge dalla degradazione.



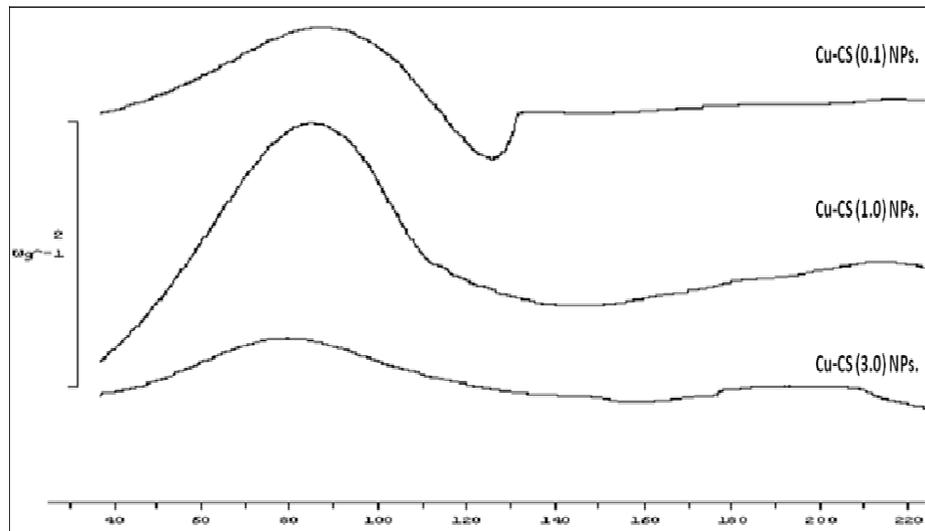
**Figura 9. Immagini di microscopia elettronica a trasmissione delle nanoparticelle di CuCS 1,0. Le nanoparticelle metalliche sono finemente disperse all'interno della matrice polimeriche di chitosano**

Dalle immagini TEM delle nanoparticelle di CuCS 3.0 (**Figura 10**) si osserva che, essendo la concentrazione di polimero in eccesso, ne consegue la formazione di agglomerati altamente eterodispersi.



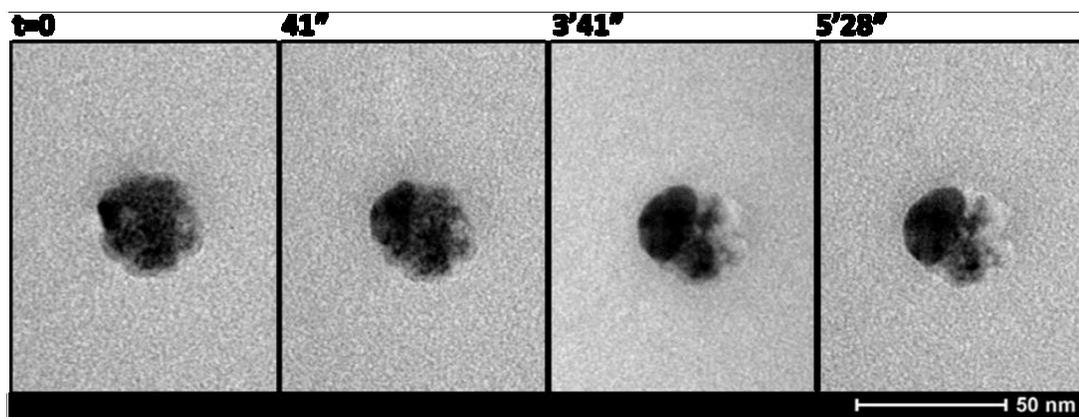
**Figura 10. Immagini di microscopia elettronica a trasmissione delle nanoparticelle di CuCS 3,0.**

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) delle NPs preparate mostra un picco esotermico largo tra 50°C e 100°C (**Figura 11**). Questo segnale può essere interpretato come un fenomeno di Ostwald ripening tra le nanoparticelle di CuCS.



**Figura 11. Calorimetria differenziale a scansione di CuCS 0.1; CuCS 1.0 e CuCS 3.0**

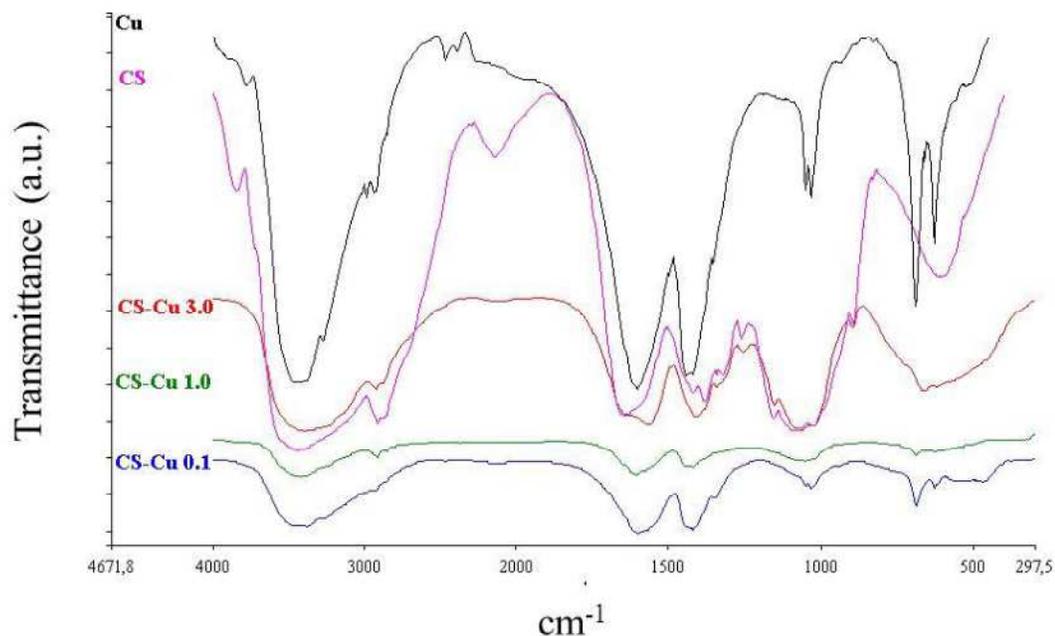
Tale teoria è confermata anche dalle immagini TEM di **Figura 12** ottenute con una acquisizione prolungata di un agglomerato nanoparticellare. Probabilmente il fenomeno è da correlarsi all'effetto del fascio elettronico sul campione.



**Figura 12. Artefatti del fascio elettronico (120 KV, 7.4  $\mu$ A) nella generazione di cluster di Cu in composti CuCS 1.0**

L'analisi FT-IR è stata condotta utilizzando come riferimento sia il chitosano in quanto tale che le NPs di solo rame. Gli spettri (**Figura 13**) mostrano le bande di assorbimento tipiche del polimero chitosano, fatta eccezione per la comparsa di due nuove bande

rispettivamente a  $628\text{ cm}^{-1}$  and  $690\text{ cm}^{-1}$ , attribuibili alla formazione del complesso rame-chitosano. Questa ipotesi è avvalorata dalla progressiva riduzione d'intensità dei suddetti segnali all'aumentare della concentrazione di chitosano.



**Figura 13. Spettri FT-IR di CS, Cu NPs, CuCS 0,1, CuCS 1,0 e CuCS 3,0.**

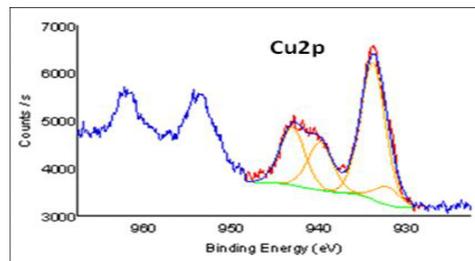
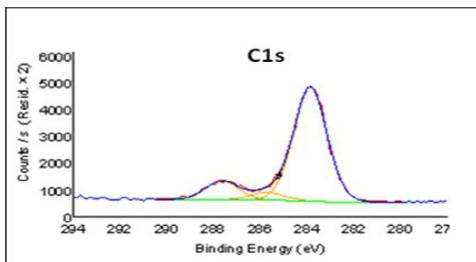
Dalle analisi elementare di superficie (**Tabella 3**) si osserva che la quantità di chitosano presente sulla superficie delle nanoparticelle aumenta con il crescere della concentrazione di polimero utilizzata.

**Tabella 3. Analisi elementare di superficie di CuCS 0,1, CuCS 1,0 e CuCS 3,0 acquisita mediante XPS.**

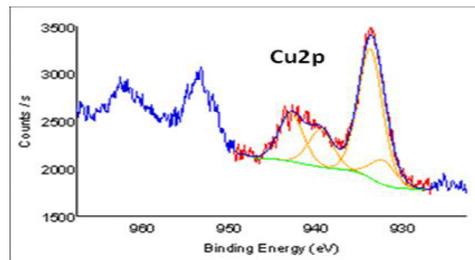
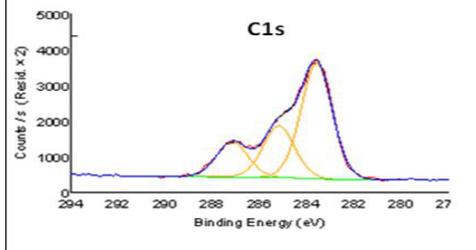
Element	CuCS 0.1At%	Element	CuCS 1.0At%	Element	CuCS 3.0At%
C	55,8±6,3	C	61,3±1,8	C	64,4±1,8
Cu	7,6±2,6	Cu	4,6±1,1	Cu	1,5±0,6
N	1,5±0,6	N	3,9±0,5	N	5,2±0,5
O	32,0±4,7	O	29,0±1,0	O	28,5±1,6
Si	1,8±2,8	Na	0,2±0,5	Cl	0,4±0,8
Cl	1,3±2,1	Cl	0,9±1,0		

Inoltre dagli spettri XPS ad alta risoluzione (**Figura 14**), nel range con energia di legame di 930-950 eV si evince la presenza di rame a stato di ossidazione 0, e del rame ad ossidazione 2+. Quest'ultimo risulta essere il responsabile dell'attività antimicrobica del metallo.

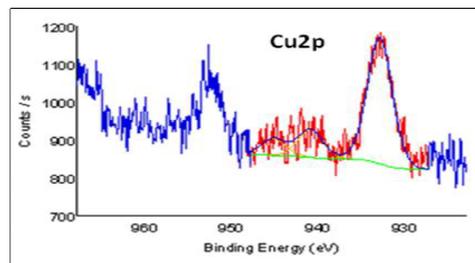
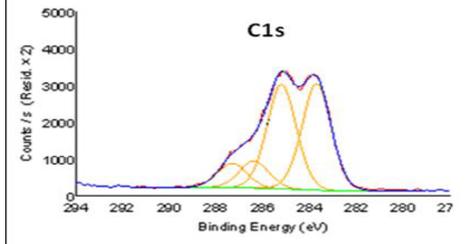
**NPs Cu-CS 0.1**



**NPs Cu-CS 1.0**

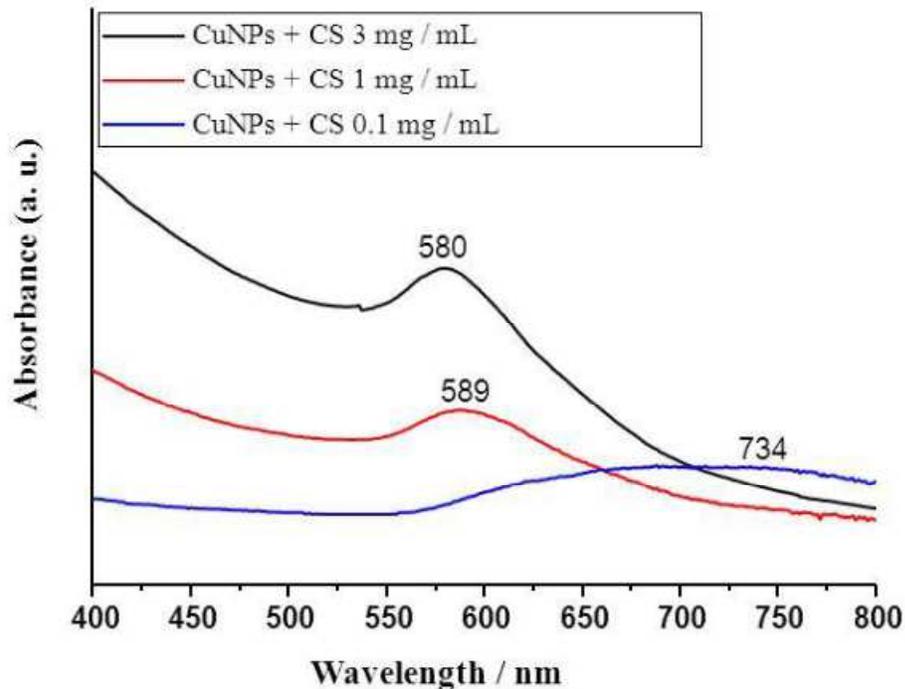


**NPs Cu-CS 3.0**



**Figura 14. Spettri XPS ad alta risoluzione di rame (Cu2p) e carbonio (C1s) di CuCS 0.1, CuCS 1.0 e CuCS 3.0.**

Gli spettri UV, (**Figura 15**) acquisiti tra 650 nm e 750 nm, mostrano la presenza di una banda di assorbimento attribuibile alla formazione dell'ossido metallico.



**Figura 15. Spettri ultravioletti delle nanoparticelle CuCS.**

Nei tests di inibizione della crescita dell' *E. coli* si è osservato che la concentrazione batterica che ha mostrato un risultato analitico soddisfacente è risultata pari a  $35 \times 10^3$  unità formanti colonia (ufc)/ml.

Inoltre la riduzione della crescita microbica dopo un'incubazione di 4 ore è risultata analoga a quella osservata a 7 e 24 ore di incubazione.

Dalla **Figura 16** si deduce che, utilizzando concentrazioni di CuCS 0.1 mg/ml pari a 1 e 2,5 ppm, non si osserva alcun effetto inibitorio nei riguardi dell'*E.coli.*, mentre con una concentrazione di CuCS 0.1 mg/ml di 5 ppm si è avuta una parziale inibizione della

crescita ( $E.c. = 2 \times 10^2$  ufc/ml). Alla concentrazione di 10 ppm la crescita microbica è stata totalmente inibita.



**Figura 16. Piastre di Petri inoculate con CuCS 0.1 mg/ml (1; 2,5; 5; 10 ppm) messe a contatto con la coltura batterica di *E.coli*  $35 \times 10^3$  ufc/ml.**

Il solo chitosano, a tutte le concentrazioni testate nelle nostre condizioni, invece, non ha mostrato alcun effetto sulla crescita di *E.coli* (**Figura 17**).



**Figura 17. Piastre di Petri inoculate con CS 0.1 mg/ml (1; 2,5; 5; 10 ppm) messe a contatto con la coltura batterica di *E.coli*  $35 \times 10^3$  ufc/ml.**

#### 4.5. CONCLUSIONI

Sono state preparate e completamente caratterizzate nuove nanoparticelle a base di rame rivestite con chitosano mediante l'utilizzo di una tecnica innovativa quale la laser ablation con la finalità di ottenere nanosistemi Metallo-CS da utilizzarsi come nanoantibiotici. La concentrazione della soluzione di chitosano utilizzata nella preparazione gioca un ruolo importante per quanto riguarda le caratteristiche dei nanosistemi che si ottengono. In particolar modo si è osservato che una concentrazione elevata di chitosano porta alla formazione di aggregati.

Concentrazioni più basse del polimero, invece, permettono la formazione di nanoparticelle presentanti un core di rame circondato da chitosano. La concentrazione ottimale risulta quella di 1 mg/ml, dove si osserva la formazione di una matrice compatta ed omogenea di polimero all'interno della quale sono disperse le nanoparticelle metalliche in maniera omogenea. Il sistema rame-chitosano, testato sul microorganismo *E.coli*, ha mostrato un promettente azione inibitoria della crescita microbica che merita di essere ulteriormente approfondita. Studi sono in corso per valutare l'azione antimicrobica di tale formulazione anche verso altri microorganismi di rilevanza clinica, nonché per valutare gli effetti chimico/fisici e biologici di soluzioni ancora più diluite del polimerazione CS.

## OSSERVAZIONI CONCLUSIVE GENERALI

In questo lavoro di tesi sono state individuate alcune nuove caratteristiche applicative in campo biomedico-farmaceutico dei polimeri mucoadesivi CS, GCS e corrispondenti derivati tiolati. Queste nuove caratteristiche possono essere così riassunte:

- 1) Sebbene tutti i polimeri valutati siano caratterizzati da caratteristiche mucoadesive ottimali, è possibile intravedere un ordine di rango fra di essi. Precisamente, il chitosano e i suoi derivati tiomerici presentano caratteristiche mucoadesive superiori rispetto ai corrispondenti del GCS e tiomeri del GCS. I risultati ottenuti indicano che le interazioni elettrostatiche giocano un ruolo decisivo nel determinare le caratteristiche mucoadesive di tali polimeri. In definitiva si può concludere che, a fronte di una migliore solubilità in acqua anche a pH neutri da parte del GCS e derivati, si osserva una apprezzabile diminuzione delle caratteristiche mucoadesive di quest'ultimi polimeri rispetto a CS e derivati;
- 2) Una applicazione di notevole potenzialità è quella che potrebbe derivare dalla individuazione del GCS e GCS-NAC di peso molecolare di circa 400 kDa quali sistemi macromolecolari in grado di invertire l'attività della pompa di efflusso P-gp. Questi sistemi possono costituire infatti promettenti biomateriali utili per migliorare la biodisponibilità dei substrati della P-gp. Pertanto possono essere utilizzati per la formulazione di forme farmaceutiche per la somministrazione di farmaci substrati della proteina P-gp attraverso vie transmucosali o attraverso la BEE dove la P-gp è sovra-espressa. Non bisogna dimenticare che GCS e GCS-NAC quali sostanze inibitrici della P-gp ad alto peso molecolare, a differenza da quanto osservato con quelle a basso peso molecolare, sono da considerarsi più sicure in quanto non dotate di rilevante attività farmacologica propria. Questo spiega il notevole interesse per l'individuazione di inibitori della P-gp a struttura macromolecolare;

- 3) Sono state individuate le condizioni per ottenere nanoparticelle di PIBCA rivestite da CS, GCS e corrispondenti tiomeri rendendole così di ottimale muco adesività. Non bisogna dimenticare che mediante nanoparticelle di PIBCA è possibile veicolare un'ampia gamma di sostanze biologicamente attive quali farmaci antivirali o farmaci di natura peptidica e proteica. Però, una grande limitazione di queste nanoparticelle di PIBCA come tali è che esse mostrano una carica superficiale negativa che limita l'efficienza di interazione con le mucose e quindi la loro veicolazione transmucosale. Le nanoparticelle di PIBCA rivestite con CS, GCS e corrispondenti tiomeri caratterizzate nel presente lavoro di tesi hanno mostrato buone caratteristiche mucoadesive e possono essere proposte come valida strategia per superare la limitazione evidenziata dalle PIBCA come tali.
- 4) Sono state individuate anche le condizioni sperimentali per ottenere nanoparticelle di CS-PIBCA di forma ovoidale le quali possono essere utilizzate come base di partenza per analizzare l'importanza dello shape factor nella biodistribuzione di sistemi nanoparticellari. Queste condizioni sperimentali, che prevedono l'uso del CS come tale, sono da utilizzarsi anche con gli altri polimeri qui studiati per individuare quello(i) che risulta(no) più conveniente(i) per questa caratteristica applicativa di modifica della forma geometrica di sistemi nanoparticellari.
- 5) Il CS può essere utilmente impiegato nella preparazione di nanoparticelle composite Cu-CS mediante Laser Ablation, sistemi con potenziale attività antimicrobica. La concentrazione di CS utilizzata gioca un ruolo critico nel determinare le caratteristiche del nanosistema così preparato. La concentrazione ottimale osservata è stata quella di 1 mg/ml, dove si osserva la presenza di nanoparticelle metalliche disperse in una matrice compatta ed omogenea di polimero.

L'attività antibatterica di questi nano sistemi, studiata su ceppi di *E.coli*, dovrà essere approfondita utilizzando anche altri microorganismi di rilevanza clinica. Inoltre, in prospettiva, appare anche interessante investigare l'utilizzo di soluzioni degli altri polimeri quali GCS e corrispondenti tiolati in sostituzione del CS.

## Bibliografia

1. Dmitriev BA, Knirel YA, Kochetkov NK. Selective cleavage of glycosidic linkages: studies with the O-specific polysaccharide from *Shigella dysenteriae* type 3. *Carbohydr. Res.* 1975;40(02):365-72.
2. Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2006;3(4):463-78.
3. Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009;61(2):140-57.
4. de la Fuente M, Ravina M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62(1):100-17.
5. Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials.* 2001;22(12):1653-8.
6. Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res.* 2004;21(2):344-53.
7. Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials.* 1997;18(7):567-75.
8. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004;56(10):1467-80..
9. Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials.* 2002;23(13):2761-6.
10. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62(1):3-11.
11. Muzzarelli RA. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol. Life Sci.* 1997;53(2):131-40.
12. Varum KM, Myhr MM, Hjerde RJ, Smidsrod O. In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr. Res.* 1997;299(1-2):99-101.
13. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J. Control. Release .* 2012;161(2):496-504.

14. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22(3):261-8.
15. Line BR, Weber PB, Lukaszewicz R, Dansereau RN. Reduction of background activity through radiolabeling of antifibrin Fab' with <sup>99m</sup>Tc-dextran. *J. Nucl. Med.* 2000;41(7):1264-70.
16. Xu G, Huang X, Qiu L, Wu J, Hu Y. Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2007;16 Suppl 1:313-7.
17. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001;52(2):117-26.
18. Jumaa M, Furkert FH, Muller BW. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002;53(1):115-23.
19. Pujals G, Sune-Negre JM, Perez P, Garcia E, Portus M, Tico JR, Minarro, M, Carrio J. In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 2008;102(6):1243-7.
20. Sawayanagi Y, Nambu N, Nagai T. Dissolution properties and bioavailability of phenytoin from ground mixtures with chitin or chitosan. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1983;31(6):2064-8.
21. Gallo JM, Hassan EE. Receptor-mediated magnetic carriers: basis for targeting. *Pharm. Res.* 1988;5(5):300-4.
22. Hassan EE, Parish RC, Gallo JM. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole. *Pharm. Res.* 1992;9(3):390-7.
23. Artursson P, Lindmark T, Davis SS, Illum L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 1994;11(9):1358-61.
24. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2010;58(11):1423-30.
25. Khutoryanskiy VV. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* 2011;11(6):748-64.
26. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005;57(11):1556-68.
27. Grabovac V, Guggi D, Bernkop-Schnurch A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005;57(11):1713-23.

28. De Giglio E, Trapani A, Cafagna D, Sabbatini L, Cometa S. Dopamine-loaded chitosan nanoparticles: formulation and analytical characterization. *Anal. Bioanal. Chem.*. 2011;400(7):1997-2002.
29. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*. 2008;9(7):1837-42.
30. Trapani A, Sitterberg J, Bakowsky U, Kissel T. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2009;375(1-2):97-106.
31. Trapani A, Di Gioia S, Ditaranto N, Cioffi N, Goycoolea FM, Carbone A, et al. Systemic heparin delivery by the pulmonary route using chitosan and glycol chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2013;447(1-2):115-23.
32. Schmitz T, Grabovac V, Palmberger TF, Hoffer MH, Bernkop-Schnurch A. Synthesis and characterization of a chitosan-N-acetyl cysteine conjugate. *Int. J. Pharm.* 2008;347(1-2):79-85.
33. Kafedjiiski K, Foger F, Werle M, Bernkop-Schnurch A. Synthesis and in vitro evaluation of a novel chitosan-glutathione conjugate. *Pharm. Res.* 2005;22(9):1480-8.
34. Makhlof A, Werle M, Tozuka Y, Takeuchi H. Nanoparticles of glycol chitosan and its thiolated derivative significantly improved the pulmonary delivery of calcitonin. *Int. J. Pharm.* 2010;397(1-2):92-5.
35. Sivasubramanian M, Kim YJ, Chae SY, Son S, Jo DG, Lee KC, et al. Thiolated Glycol Chitosan Bearing alpha-Cyclodextrin for Sustained Delivery of PEGylated Human Growth Hormone. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2011.
36. Lee SJ, Huh MS, Lee SY, Min S, Lee S, Koo H, Chu JU, Lee K E, Jeon H, Choi Y, Choi K, Byun Y, Jeong SY, Park K, Kim K, Kwon IC. Tumor-homing poly-siRNA/glycol chitosan self-cross-linked nanoparticles for systemic siRNA delivery in cancer treatment. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012;51(29):7203-7.
37. Schmitz T, Hombach J, Bernkop-Schnurch A. Chitosan-N-acetyl cysteine conjugates: in vitro evaluation of permeation enhancing and P-glycoprotein inhibiting properties. *Drug Deliv.* 2008;15(4):245-52..
38. Werle M, Hoffer M. Glutathione and thiolated chitosan inhibit multidrug resistance P-glycoprotein activity in excised small intestine. *J. Control. Release* .2006;111(1-2):41-6.
39. Foger F, Schmitz T, Bernkop-Schnurch A. In vivo evaluation of an oral delivery system for P-gp substrates based on thiolated chitosan. *Biomaterials*. 2006;27(23):4250-5.

40. Mazzaferro S, Bouchemal K, Ponchel G. Oral delivery of anticancer drugs II: the prodrug strategy. *Drug Discov. Today* 2013;18(1-2):93-8.
41. Mazzaferro S, Bouchemal K, Ponchel G. Oral delivery of anticancer drugs III: formulation using drug delivery systems. *Drug Discov. Today* 2013;18(1-2):99-104.
42. Kabanov AV, Batrakova EV, Miller DW. Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003;55(1):151-64.
43. Bernkop-Schnurch A, Schwarz V, Steininger S. Polymers with thiol groups: a new generation of mucoadhesive polymers? *Pharm. Res.* 1999;16(6):876-81.
44. Takeuchi H, Thongborisute J, Matsui Y, Sugihara H, Yamamoto H, Kawashima Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005;57(11):1583-94.
45. Feng B, Mills JB, Davidson RE, Mireles RJ, Janiszewski JS, Troutman MD, et al. In vitro P-glycoprotein assays to predict the in vivo interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system. *Drug Metab. Dispos.* 2008;36(2):268-75.
46. Kangas L, Gronroos M, Nieminen AL. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *Med. Biol.* 1984;62(6):338-43.
47. Leopoldo M, Lacivita E, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R. Synthesis and binding profile of constrained analogues of N-[4-(4-arylpiperazin-1-yl)butyl]-3-methoxybenzamides, a class of potent dopamine D3 receptor ligands. *J.Pharm. Pharmacol.* 2006;58(2):209-18.
48. Colabufo NA, Berardi F, Perrone MG, Capparelli E, Cantore M, Inglese C, et al. Substrates, inhibitors and activators of P-glycoprotein: candidates for radiolabeling and imaging perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* 2010;10(17):1703-14.
49. Colabufo NA, Berardi F, Cantore M, Contino M, Inglese C, Niso M, et al. Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *J. Med. Chem.* 2010;53(5):1883-97.
50. Werle M. Polymeric and low molecular mass efflux pump inhibitors for oral drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 2008;97(1):60-70.
51. He P, Davis SS, Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int. J. Pharm.* 1999;187(1):53-65.

52. Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Caramella C. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000;10(4):251-7.
53. Geresh S, Gdalevsky GY, Gilboa I, Voorspoels J, Remon JP, Kost J. Bioadhesive grafted starch copolymers as platforms for peroral drug delivery: a study of theophylline release. *J. Control. Release* 2004;94(2-3):391-9.
54. Salman HH, Gamazo C, Campanero MA, Irache JM. Salmonella-like bioadhesive nanoparticles. *J. Control. Release* 2005;106(1-2):1-13.
55. Huang Y, Leobandung W, Foss A, Peppas NA. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. *J. Control. Release* 2000;65(1-2):63-71.
56. Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004;57(1):1-8.
57. Iqbal M, Lin W, Jabbal-Gill I, Davis SS, Steward MW, Illum L. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine.* 2003;21(13-14):1478-85.
58. Chattaraj SC, Rathinavelu A, Das SK. Biodegradable microparticles of influenza viral vaccine: comparison of the effects of routes of administration on the in vivo immune response in mice. *J. Control. Release* 1999;58(2):223-32.
59. Dembri A, Montisci MJ, Gantier JC, Chacun H, Ponchel G. Targeting of 3'-azido 3'-deoxythymidine (AZT)-loaded poly(isohexylcyanoacrylate) nanospheres to the gastrointestinal mucosa and associated lymphoid tissues. *Pharm. Res.* 2001;18(4):467-73.
60. Kuo SC, Lauffenburger DA. Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength. *Biophys. J.* 1993;65(5):2191-200.
61. Kuo SC, Hammer DA, Lauffenburger DA. Simulation of detachment of specifically bound particles from surfaces by shear flow. *Biophys. J.* 1997;73(1):517-31.
62. Zhang Y, Akilesh S, Wilcox DE. Isothermal titration calorimetry measurements of Ni(II) and Cu(II) binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and bovine serum albumin: a critical evaluation. *Inorg. Chem.* 2000;39(14):3057-64.
63. Knight DK, Shapka SN, Amsden BG. Structure, depolymerization, and cytocompatibility evaluation of glycol chitosan. *J. Biomed. Mater. Res. A Part A.* 2007;83(3):787-98.

64. Bravo-Osuna I, Vauthier C, Chacun H, Ponchel G. Specific permeability modulation of intestinal paracellular pathway by chitosan-poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008;69(2):436-44.
65. Bravo-Osuna I, Teutonico D, Arpicco S, Vauthier C, Ponchel G. Characterization of chitosan thiolation and application to thiol quantification onto nanoparticle surface. *Int. J. Pharm.* 2007;340(1-2):173-81.
66. Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature* 2000;406(6797):762-7.
67. Gold HS, Moellering RC, Jr. Antimicrobial-drug resistance. *N. Engl. J. Med.* 1996;335(19):1445-53.
68. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 2000;406(6797):775-81.
69. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* :2009;48(1):1-12.
70. Longano D, Ditaranto N, Cioffi N, Di Niso F, Sibillano T, Ancona A, Conte A, Del Nobile MA, Sabbatini L, Torsi L. Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;403(4):1179-86.
71. Sambhy V, MacBride MM, Peterson BR, Sen A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. *J. Am. Chem. Soc.* 2006;128(30):9798-808.
72. Holt KB, Bard AJ. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag<sup>+</sup>. *Biochemistry.* 2005;44(39):13214-23.
73. Kawashita M, Tsuneyama S, Miyaji F, Kokubo T, Kozuka H, Yamamoto K. Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials.* 2000;21(4):393-8.
74. Faundez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* 2004;4:19.
75. Pena MM, Koch KA, Thiele DJ. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998;18(5):2514-23.

76. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984;219(1):1-14.
77. Ramadan AM. Structural and biological aspects of copper (II) complexes with 2-methyl-3-amino-(3H)-quinazolin-4-one. *J. Inorg. Biochem.* 1997;65(3):183-9.
78. Eide DJ. Metal ion transport in eukaryotic microorganisms: insights from *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Microb. Physiol.* 2000;43:1-38.
79. Chung YC, Wang HL, Chen YM, Li SL. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresour. Technol.* 2003;88(3):179-84.
80. Don TM, Chen CC, Lee CK, Cheng WY, Cheng LP. Preparation and antibacterial test of chitosan/PAA/PEGDA bi-layer composite membranes. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed* 2005;16(12):1503-19.
81. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Res.* 2004;339(16):2693-700.
82. Fernandes JC, Tavaría FK, Fonseca SC, Ramos OS, Pintado ME, Malcata FX. In vitro screening for anti-microbial activity of chitosans and chitooligosaccharides, aiming at potential uses in functional textiles. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010;20(2):311-8.
83. Tin S, Sakharkar KR, Lim CS, Sakharkar MK. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Biol. Sci.* 2009;5(2):153-60.
84. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 2009;27(1):76-83.