



Facoltà di Ingegneria Civile e Industriale

Dottorato di ricerca in Ingegneria Elettrica, dei Materiali e delle Nanotecnologie (EMNE)

Dottorato di Ricerca in Ingegneria Elettrica, dei Materiali e delle Nanotecnologie

Relazione annuale A.A.: 2021 - 2022	
Ciclo di Dottorato: XXXVII	Curriculum: B
Dottorando: Gianluca Ciarleglio	Supervisore: Mariagabriella Santonicola

TITOLO DELLA RICERCA:

Sviluppo di sistemi ingegnerizzati stimuli-responsive a base di polimeri biocompatibili per applicazioni di rilascio controllato di principi attivi medicali

1. Sintesi dell'attività di ricerca svolta

1.1 Breve introduzione al progetto di ricerca

Negli ultimi decenni si è assistito a una forte espansione dello sviluppo di biomateriali per il rilascio controllato di macromolecole che sfruttano meccanismi di diffusione, chimici e di rigonfiamento per controllare i tassi di rilascio del farmaco. Più recentemente, sono stati progettati biomateriali "smart" che rispondono a una gamma di stimoli quali: temperatura, pH e segnali biologici per attivare il rilascio di farmaci. In quest'ottica, gli hydrogel, reti tridimensionali di catene polimeriche reticolate ad alto contenuto d'acqua, sono oggi ampiamente utilizzati per la somministrazione di farmaci e nell'ingegneria tissutale grazie alle loro proprietà fisiche, chimiche e biologiche regolabili.

Il presente progetto di dottorato si pone come obiettivo lo studio, la sintesi e la caratterizzazione di sistemi ingegnerizzati stimuli-responsive a base di hydrogel per la veicolazione di principi attivi. In particolare, nel corso del primo anno di dottorato, sono state sviluppate microsferi termo e pH-responsive a base di alginato, poli(N-isopropilacrilammide) (NIPAM) ed Ozoile (olio ozonizzato). Le microsferi sono state caratterizzate dal punto di vista chimico mediante spettroscopia FTIR, per verificare la

presenza dei gruppi funzionali caratteristici, dal punto di vista termico mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC), per valutare la risposta nel range di temperatura fisiologico, ed è stato inoltre effettuato un test di degradazione al fine di verificare la risposta al pH.

1.2 Attività di ricerca

- a) Sintesi di microsfere a base di alginato per il rilascio controllato di Ozoile
- b) Caratterizzazione proprietà delle microsfere:
 - Determinazione tasso di swelling e contenuto d'acqua.
 - Analisi chimica mediante spettroscopia ad infrarossi (FT-IR),
 - Analisi termica mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC),
 - Analisi morfologica mediante microscopia ottica
 - Prove di rilascio a differenti pH

Sintesi di microsfere a base di alginato per il rilascio controllato di Ozoile

L'alginato di sodio e il NIPAM sono stati miscelati in acqua deionizzata in rapporto 1:8 (w/w). La soluzione è stata miscelata per 30 minuti in un bagno di acqua fredda utilizzando un agitatore magnetico (C-MAG HS7, IKA, Staufen, Germania). L'Ozoile (20 wt%), il tensioattivo Tween 80 (5 w/v%), l'emulsionante gomma di xantano (0.25 w/v%) e il catalizzatore TEMED (0.15 v/v%) per la polimerizzazione di acrilammide e bis-acrilammide sono stati incorporati in soluzione ottenendo un'emulsione con il metodo degli ultrasuoni ad alta intensità (HIU). Il processo è stato eseguito con un omogeneizzatore a ultrasuoni (UP200Ht, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germania) per 5 minuti al 50% della potenza. L'emulsione è stata estrusa, utilizzando una siringa di calibro 0.26 mm collegata a una pompa peristaltica, in una soluzione fredda ($T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$) a base di CaCl_2 (10% w/v)/APS (2% w/v) in cui precedentemente è stato fatto gorgogliare azoto per 15 minuti, in modo da rimuovere completamente l'ossigeno presente. La distanza tra il punto di estrusione e la soluzione reticolante è stata ottimizzata e fissata a 10 cm per ottenere microsfere sferiche. La soluzione CaCl_2 /APS è stata mescolata delicatamente per evitare il collasso delle microsfere. In Fig. 1 è rappresentato schematicamente il processo di sintesi. Il tempo di crosslinking delle microsfere multi-responsive è stato fissato a 18 ore. Le microsfere sono state lavate tre volte con acqua deionizzata per estrarre il monomero non reagito, il reticolante, l'iniziatore e gli ioni calcio liberi. Le microsfere sono state rivestite con una soluzione di chitosano (0.5 wt%) per migliorare la risposta al pH. In particolare, il rivestimento è stato realizzato utilizzando un agitatore con velocità pari a 600 rpm.

Determinazione tasso di swelling e contenuto d'acqua

La Fig. 2 mostra il rapporto di rigonfiamento (Fig. a) e il contenuto d'acqua (%) (Fig. b) delle microsfele di hydrogel a temperatura ambiente. Tutte le microsfele mostrano un contenuto d'acqua superiore all'80%, in particolare le microsfele di alginato/PNIPAM mostrano un contenuto d'acqua più elevato (>90%) rispetto a quelle contenenti Ozoile (contenuto d'acqua 80-85%). Infatti, la natura idrofobica dell'Ozoile agisce come repellente all'acqua, abbassando il grado di rigonfiamento. Le microsfele rivestite con chitosano presentano un contenuto d'acqua più elevato, e ciò può essere attribuito a un aumento della densità di reticolazione delle catene polimeriche dovuto al coating di chitosano.

Analisi chimica mediante spettroscopia ad infrarossi (FTIR)

L'analisi mediante spettroscopia infrarossa (FTIR) (Fig. 3) delle microsfele è stata effettuata utilizzando lo spettrometro Nicolet Summit (Thermo Fisher Scientific, USA) in modalità ATR. Gli spettri IR sono stati acquisiti nella regione $4000 - 800 \text{ cm}^{-1}$, con una risoluzione di 4 cm^{-1} , e ogni spettro è stato ottenuto mediando 32 scansioni. La presenza di PNIPAM nelle microsfele è stata confermata dalle bande caratteristiche tra 1650 e 1500 cm^{-1} , che possono essere attribuite rispettivamente alla banda amidica I (stretching C=O) e alla banda amidica II (vibrazione di flessione N-H in piano).

Analisi termica mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La tecnica di calorimetria a scansione differenziale (DSC) è stata utilizzata per analizzare la temperatura di transizione volumetrica di fase (VPT), tipica del NIPAM, e la frazione di acqua legata (X_{BW}) delle microsfele.

In Fig. 4 è possibile osservare i fenomeni endotermici nell'intervallo fisiologico $35 - 40 \text{ °C}$ solo per le microsfele contenenti NIPAM dovuti alla transizione volumetrica di fase (VPT). La VPT è correlata al collasso idrofobico, in particolare quando la temperatura aumenta, si verifica uno squilibrio tra le interazioni idrofile e idrofobiche polimero-acqua, che porta al collasso della rete polimerica e alla rapida espulsione di Ozoile [51].

La Fig. 5 mostra il termogramma DSC delle microsfele completamente rigonfie. Il picco endotermico appare nell'intervallo tra 5 e 20 °C e può essere attribuito alla presenza di acqua libera negli hydrogel. I valori dell'entalpia di fusione (ΔH_f) e della frazione di acqua legata (X_{BW}) sono stati calcolati ed elencati nella Tabella 1. Le microsfele a base di alginato e PNIPAM mostrano una frazione X_{BW} più bassa (13.9%), associata a una VPT più elevata, rispetto a quanto osservato per i campioni contenenti Ozoile (23.4%).

Analisi morfologica mediante microscopia ottica

L'analisi morfologica (Figura 6) ha rivelato la forma sferica con struttura compatta delle microsfele, mentre l'analisi eseguita con il software ImageJ ha evidenziato che il diametro è inferiore a 650 μm e più basso in presenza del rivestimento di chitosano (450 μm).

Prove di rilascio a differenti pH

I test di degradazione sono stati eseguiti in PBS (pH = 7.4) e in acqua deionizzata alla temperatura di 37 °C, monitorando le microsfele ogni ora per 4 ore e dopo 18 ore.

In PBS, gli ioni Na^+ avviano un processo di scambio ionico con i cationi Ca^{2+} , legati principalmente ai gruppi -COO- dei blocchi di alginato. Nella fase iniziale di questo processo, il rilascio di cationi calcio è guidato dalla diffusione. Pertanto, si verifica un aumento degli anioni -COO- nella matrice polimerica con una repulsione elettrostatica tra di essi, che induce il rilassamento delle catene polimeriche e il rigonfiamento. La Fig. 7a mostra il processo di degradazione valutato ogni ora per 4 ore e dopo 18 ore in PBS. Nel caso delle microsfele rivestite di chitosano (Fig. 7b), il processo di degradazione appare ritardato nel tempo. In acqua deionizzata il processo di degradazione non ha avuto luogo (Fig. 8).

2. Seminari, Webinar, Corsi

Seminari/Webinar:

- Seminario STITCH – BIG DATA E MEDICINA “Prove di dialogo tra medicina e big data: vecchie incomprensioni e nuove alleanze” – 14 Febbraio 2022
- Seminario STITCH – Drug discovery “I prodotti naturali come risorsa nella scoperta di nuovi farmaci: dalla ricerca di base alla fase clinica di sperimentazione” – 6 Aprile 2022
- Springer Nature Experiments Training Webinar Spring 2022 – 7 Aprile 2022
- Webinar "Guida all'utilizzo di Funding Institutional, tool per individuare opportunità di finanziamento per la ricerca" – 6 Luglio 2022

Corsi:

- Corso di scrittura tecnico-scientifica, Prof. Emilio Matriccioni (8-9-15-16

Febbraio 2022) – 4 CFU

- Processi di polimerizzazione, Prof.ssa Maria Laura Santarelli – 6 CFU
- Processi industriali per la produzione di micro e nano particelle Prof. Marco Stoller – 6 CFU

3. Partecipazione a Congressi Nazionali e Internazionali

- Polymers 2022 - New Trends in Polymer Science: Health of the Planet, Health of the People (25 – 27 Maggio 2022, Torino), presentazione Poster
- School of Nanomedicine 2022 (8 – 10 Giugno 2022 Roma), presentazione Poster
- CIMTEC 2022 – 9th Forum on New Materials (25 – 29 Giugno 2022, Perugia), presentazione Poster
- NanoInnovation 2022 (19 – 23 Settembre 2022)
- BIOMAH – Biomaterials and novel technologies for healthcare, 3 rd international biennial conference (18 – 21 Ottobre 2022, Roma), presentazione Poster

4. Pubblicazioni su atti di convegno (prodotte o in corso di pubblicazione)

- G. Ciarleglio, E. Toto, M.G. Santonicola "N-Isopropylacrylamide-based Composite Hydrogels Containing Carbon Nanotubes: Synthesis by Two-Step Photopolymerization and Characterization", Conference Book – Polymers 2022
- G. Ciarleglio, S. Vella, E. Toto, M.G. Santonicola “Stimuli Responsive Emulsion-based Micro/Nanospheres for the Delivery of Lipophilic Therapeutics” Conference Book – School of Nanomedicine 2022
- G. Ciarleglio, S. Vella, E. Toto, M.G. Santonicola “Multi-Responsive Hydrogel Microspheres for the Controlled Release of Ozoile” Conference Book – CIMTEC 2022

5. Pubblicazioni su riviste (prodotte o in corso di pubblicazione)

G. Ciarleglio, S. Vella, E. Toto, M.G. Santonicola “Multi-Responsive Hydrogel Microspheres for the Controlled Release of Ozoile”, *Ceramics International*, under review

Allegati (Figure e tabelle)

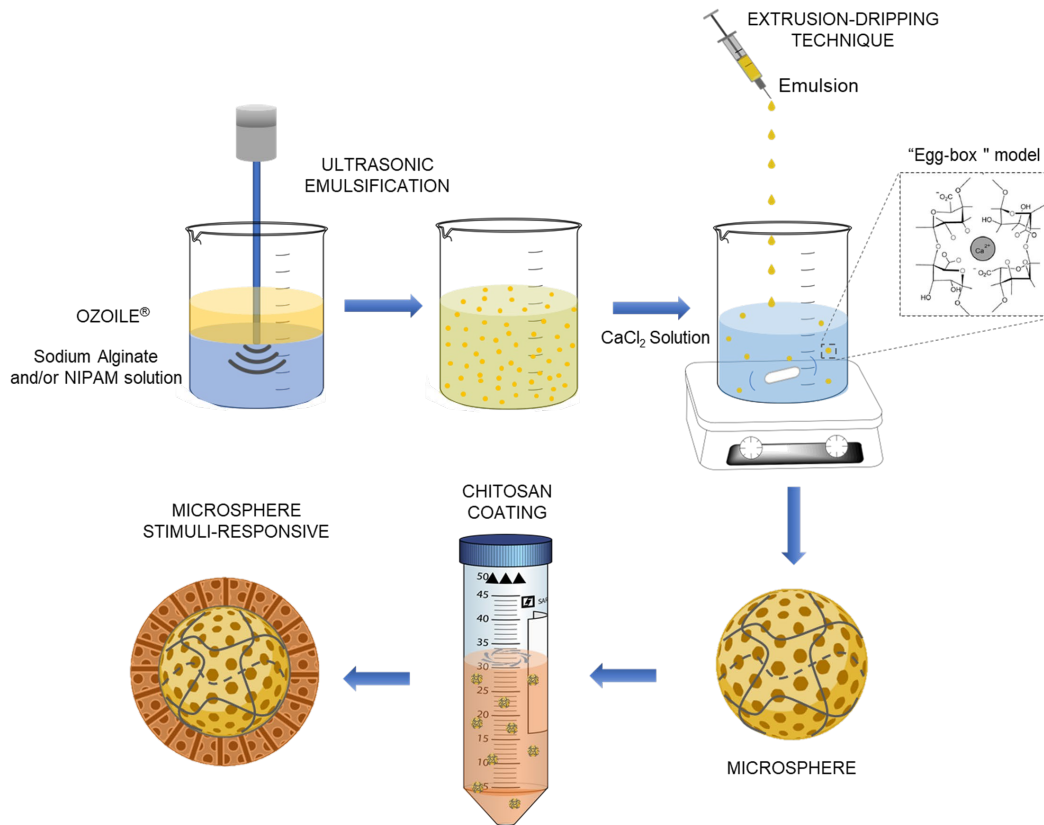


Figura 1. Rappresentazione schematica del processo di fabbricazione delle microsfe.

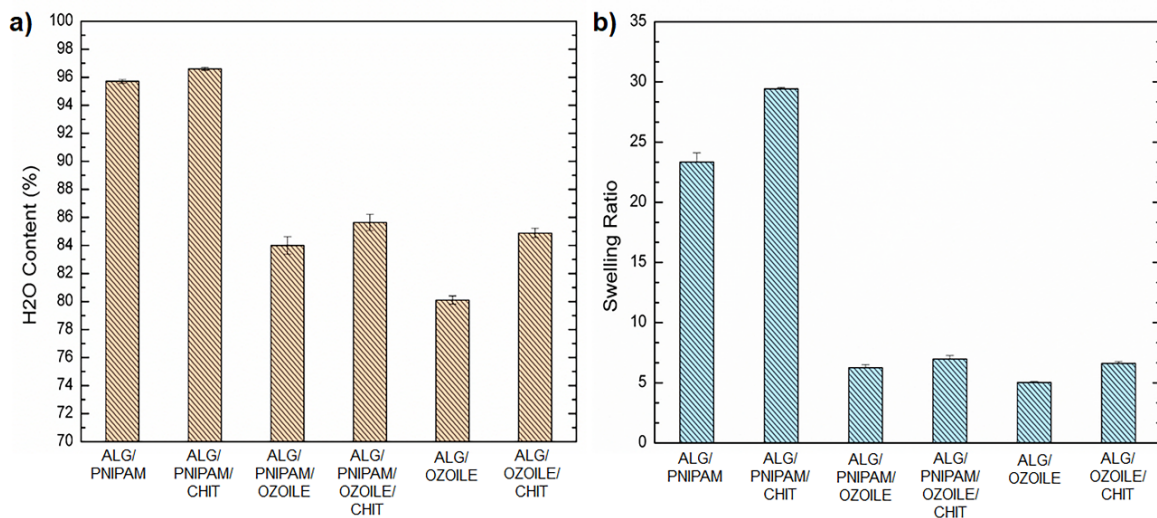


Figura 2. Rapporto di rigonfiamento e contenuto di H₂O di diversi tipi di microsfe.

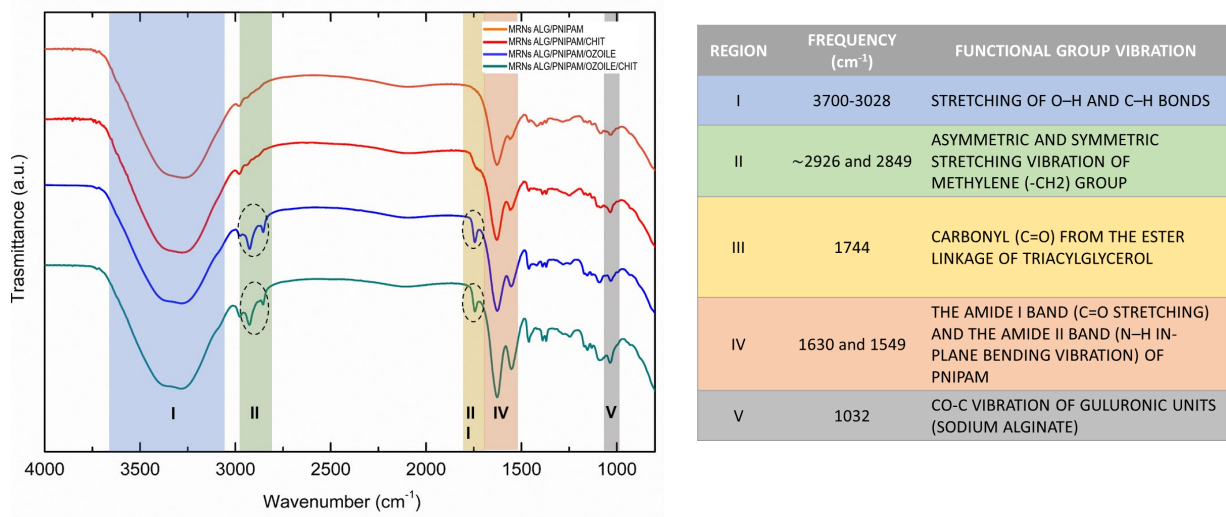


Figura 3. Spettri FTIR di diverse tipologie di microsfere. Le curve sono state traslate per chiarezza.

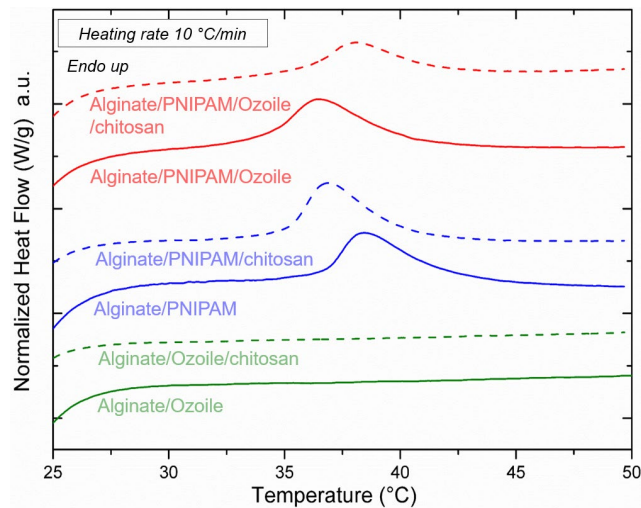


Figura 4. Termogrammi DSC per la valutazione VPT di diversi tipi di microsfere con velocità di riscaldamento pari a 10 °C/min. Le curve sono state traslate per chiarezza.

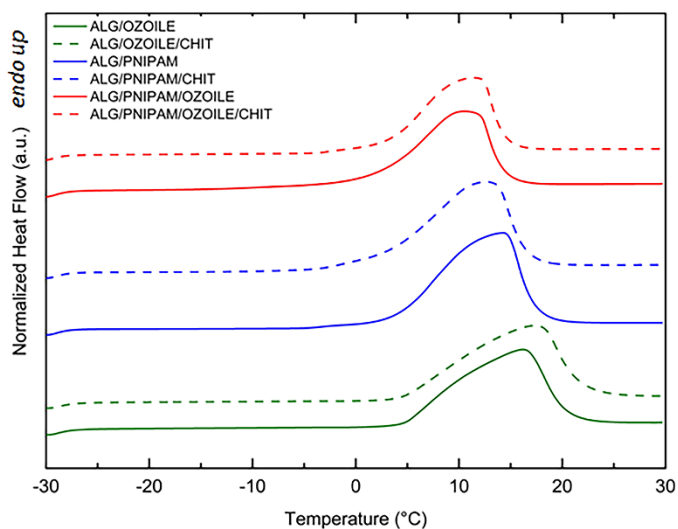


Figura 5. Curve DSC per la valutazione della frazione di acqua legata (X_{BW}) di diversi tipi di microsfere con velocità di riscaldamento pari a 10 °C/min. Le curve sono state traslate per chiarezza.

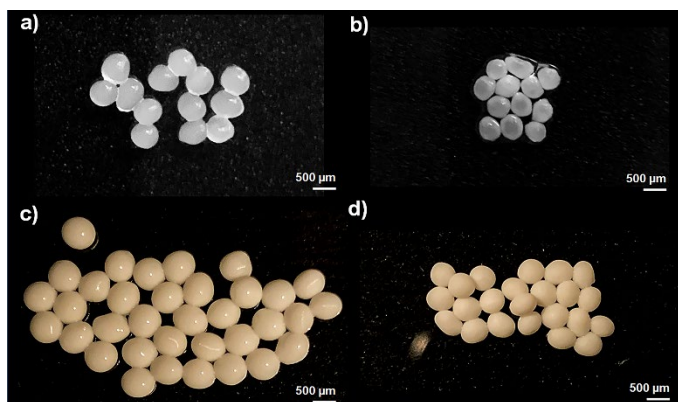


Figura 6. Immagini di microscopia ottica di microsfere a base di PNIPAM e alginato a) idratate, b) rivestite di chitosano, c) contenenti Ozoile e d) contenenti Ozoile e rivestite di chitosano.

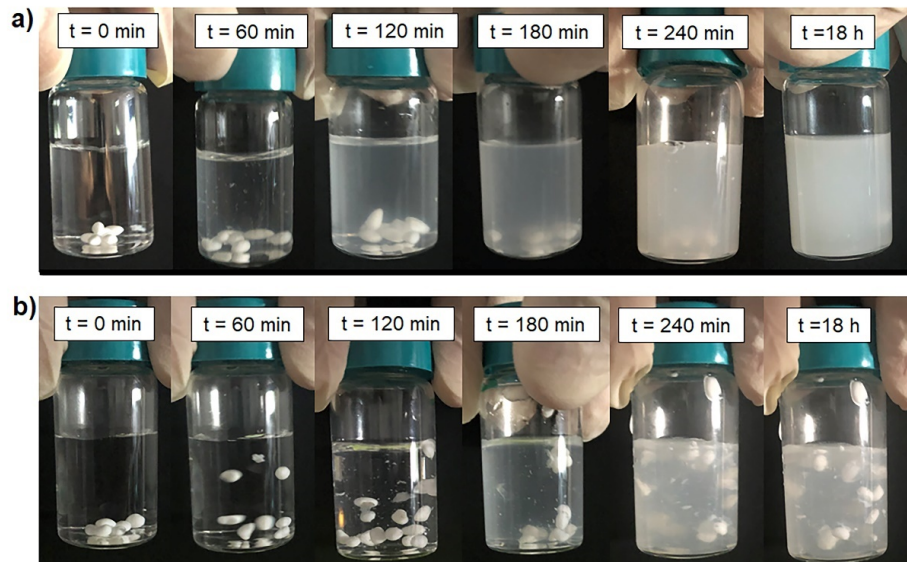


Figura 7. Test di degradazione eseguito in PBS (pH = 7.4) su a) microsferi contenenti Ozoile e b) microsferi contenenti Ozoile e rivestite di chitosano.



Figura 8. Test di degradazione eseguito in acqua deionizzata su a) microsferi contenenti Ozoile e b) microsferi contenenti Ozoile e rivestite di chitosano.

Tabella 1. Valori della frazione di acqua legata (X_{BW}) e delle entalpie di fusione (ΔH_f) delle microsfele ottenute dall'analisi DSC.

SAMPLE	ΔH (J/g)	X_{BW} (%)
ALGINATE/PNIPAM	272.2 ± 1.3	13.9 ± 0.6
ALGINATE/PNIPAM/CHITOSAN	269.4 ± 1.1	15.7 ± 0.3
ALGINATE/PNIPAM/OZOILE	201.7 ± 0.4	23.4 ± 0.5
ALGINATE/PNIPAM/OZOILE/ CHITOSAN	192.4 ± 1.4	27.8 ± 0.9
ALGINATE/OZOILE	241.43 ± 1.9	7.8 ± 0.6
ALGINATE/OZOILE/CHITOSAN	252.2 ± 1.7	9.1 ± 0.5