

Università degli Studi di Genova

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE E TECNOLOGIE DELLA
CHIMICA E DEI MATERIALI**

CURRICULUM IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE

XXXI CICLO

**Sistemi a base di chitosano per applicazioni
farmacologiche**

Dottorando: **Daniele Urso**

Indice

Capitolo 1: Introduzione.....	4
Capitolo 2: Stato dell'arte.....	7
2.1 Il chitosano.....	7
2.2 <i>I Drug Delivery System</i>	8
2.3 La malattia parodontale.....	10
Capitolo 3: Materiali e Metodi.....	13
3.1 Materiali.....	13
3.2 Strumentazioni.....	14
3.3 Modelli di elaborazione dei dati sperimentali.....	14
Capitolo 4: Risultati.....	16
4.1 Studio delle proprietà spettroscopiche di Doxiciolina cloridrato (DC) e Triamcinolone acetone (TC) in soluzione.....	16
4.1.1 Studio di soluzioni acquose di DC.....	16
4.1.2 Studio di soluzioni alcoliche e idroalcoliche di TC.....	20
4.2 Preparazione e caratterizzazione di idrogeli di chitosano come dispositivi per il rilascio controllato di DC e TC.....	24
4.2.1 Preparazione di idrogeli di chitosano.....	24
4.2.2 <i>Uptake</i> e rilascio di DC da parte di idrogeli di chitosano.....	26
4.2.3 <i>Uptake</i> e rilascio di TC da parte di idrogeli di chitosano.....	43
4.3 Preparazione e caratterizzazione di film di chitosano come dispositivi per il rilascio controllato di DC e TC.....	48
4.3.1 Preparazione di film di chitosano.....	48
4.3.2 <i>Uptake</i> e rilascio di DC da parte di film di chitosano.....	50
4.3.3 <i>Uptake</i> e rilascio di TC da parte di film di chitosano.....	57
4.4 Preparazione e caratterizzazione di membrane elettrospinnate di chitosano come dispositivi per il rilascio controllato di DC.....	60
4.4.1 Studio delle proprietà reologiche di soluzioni acquose di chitosano e di chitosano/poli(ossietilene).....	60
4.4.2 Preparazione di membrane elettrofilate di chitosano e poli(ossietilene).....	62

4.4.3 Uptake di DC da parte di membrane elettrofilate di chitosano e poli(ossietilene)	66
4.5 Funzionalizzazione di film di chitosano con il tripeptide Arginina-Glicina-Aspartato (RGD).....	68
Capitolo 5: Discussione dei risultati.....	70
Capitolo 6: Conclusioni.....	74
Capitolo 7: Appendice.....	78
Bibliografia	107
Pubblicazioni.....	118
Ringraziamenti.....	119

Capitolo 1

Introduzione

I polimeri rappresentano la classe più versatile tra i materiali studiati: tra questi i biopolimeri di origine naturale o sintetica sono quelli che nel corso degli ultimi decenni hanno maggiormente attratto l'interesse sia della comunità scientifica sia della realtà industriale. Solo per fare alcuni esempi, trovano applicazione nel *packaging*, nel tessile, nel campo dei collanti o delle resine per compositi, nel settore delle applicazioni biomediche come l'ingegneria tissutale o la somministrazione di specie farmacologicamente attive [1]. In particolare, l'impiego dei biopolimeri per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato dei farmaci (*drug delivery systems*, DDS) nasce dal connubio della scienza dei polimeri con la farmacologia.

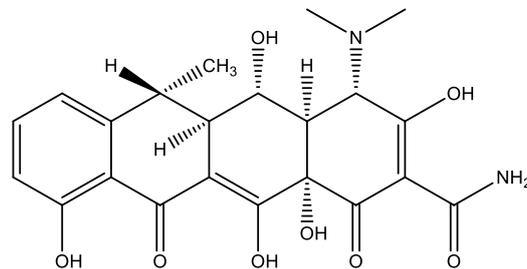
La capacità di assorbimento e rilascio controllato dei farmaci nel tempo, la facilità di veicolazione nell'organismo, l'interazione specifica con cellule e tessuti e l'eventuale biodegradabilità sono le proprietà che un biopolimero deve avere per poter essere usato nei DDS [2]. I biomateriali che soddisfano tutte queste caratteristiche non sono molti, ma tra questi il chitosano, un polisaccaride di origine naturale derivante dalla deacetilazione parziale della chitina, è un esempio eccellente e per questo è stato testato per il rilascio sottocutaneo, orale, oculare e transdermico di farmaci sotto diverse forme (capsule, microsfere, film, gel, nanoparticelle) [3]. Tuttavia, pochi sono gli studi condotti finora che riguardano l'impiego del chitosano nella cura farmacologica della malattia parodontale, una complessa patologia cronica che affligge l'osso alveolare [4]. Gli esempi pubblicati sono principalmente concentrati sull'utilizzo del chitosano come *scaffold* per la rigenerazione dei tessuti danneggiati dalla malattia suddetta [5].

Partendo da tali presupposti, il mio progetto di dottorato è stato incentrato sulla prospettiva di impiego del chitosano nella realizzazione di *Drug Delivery Systems* (DDS) per la cura della malattia parodontale. L'intero progetto è stato svolto in collaborazione con il Dr. Carlo Becce, dentista titolare di uno studio odontoiatrico a Savona.

L'attività di ricerca, svolta nel Laboratorio di Biopolimeri del Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale e nel Laboratorio di Biofisica del Dipartimento di Fisica, è stata dedicata alla preparazione e alla caratterizzazione chimico-fisica di diversi sistemi a base di chitosano (idrogeli, film e membrane), di cui è stata testata la capacità di assorbimento (*uptake*) e rilascio controllato di due farmaci, l'antibiotico Doxiciolina cloridrato (DC) e l'antinfiammatorio cortisonico

Triamcinolone acetone (TC) (Figura 1.1), ampiamente utilizzati per la cura della patologia parodontale.

a)



b)

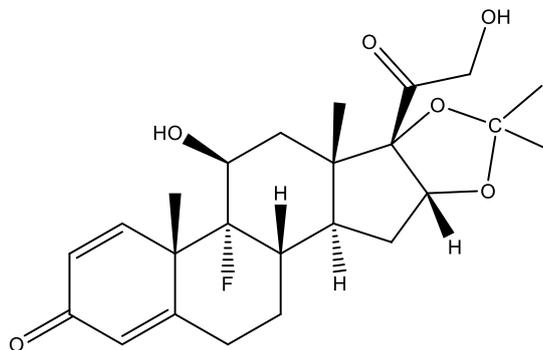


Figura 1.1: Formule di struttura dell'antibiotico DC (a) e dell'antinfiammatorio TC (b).

Gli idrogeli sono stati ottenuti per sgocciolamento di una soluzione acquosa del polisaccaride in un mezzo coagulante basico, mentre i film sono stati preparati per *casting* sempre da una soluzione acquosa del polisaccaride. Le membrane sono state invece realizzate tramite elettrofilatura (*electrospinning*) di una miscela polimerica composta da chitosano e poli(ossietilene) (PEO) in acqua.

Nell'intento di individuare il sistema più promettente per il rilascio dei farmaci nelle dosi farmacologicamente attive, il programma di lavoro sperimentale è stato articolato nei seguenti punti:

- studio a temperatura ambiente dell'equilibrio e della cinetica di *uptake* di DC e TC nei diversi sistemi a base di chitosano preparati;
- studio della cinetica di rilascio di DC e TC da parte dei sistemi saturati di farmaco in condizioni atte a simulare l'ambiente fisiologico.

Le cinetiche di *uptake* e rilascio dei due farmaci sono state ricavate da misure di assorbimento UV-Vis condotte ad intervalli di tempo definiti per elaborazione dei dati con modelli teorici di pseudo-2° ordine.

L'ultima parte dell'attività sperimentale ha riguardato lo studio preliminare della derivatizzazione di film di chitosano con il tripeptide Arginina-Glicina-Aspartato (RGD), comunemente definito “colla biologica”, allo scopo di dotare il DDS di gruppi superficiali per l'ancoraggio nella tasca parodontale del tessuto danneggiato, potenziando di conseguenza il rilascio dei farmaci “in situ”.

Capitolo 2

Stato dell'arte

2.1 Il chitosano

Il presente lavoro di dottorato riguarda lo studio delle potenzialità del chitosano (Figura 2.1) nella veicolazione controllata di farmaci antibiotici e cortisonici. Il chitosano è un copolimero costituito da residui di N-acetil-2-D-glucosammina e 2-D-glucosammina, che deriva dalla parziale deacetilazione della chitina. La chitina è il biopolimero più abbondante in natura dopo la cellulosa e si trova principalmente nell'esoscheletro degli artropodi e nella parete cellulare dei funghi.

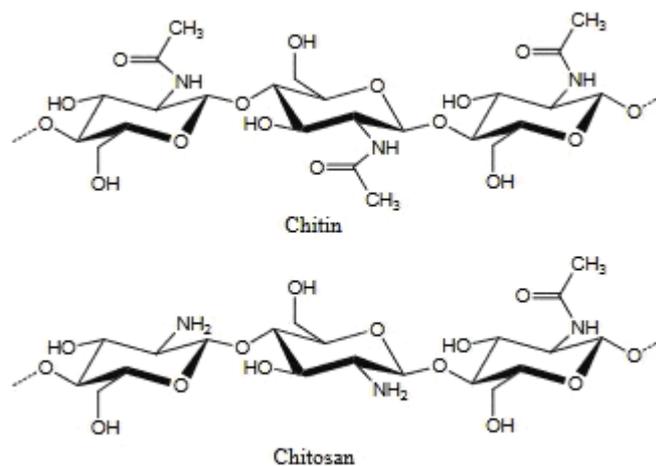


Figura 2.1: Formule di struttura della chitina e del chitosano.

Le proprietà chimico-fisiche del chitosano, quali la solubilità in acqua, la biodegradabilità e la reattività, dipendono dalla percentuale di gruppi amminici liberi in catena e quindi dal grado di acetilazione del polisaccaride. Diverse sono le tecniche analitiche riportate in letteratura per la valutazione del grado di acetilazione: tra queste, le più utilizzate sono la spettroscopia IR e la titolazione acido-base, dal momento che i gruppi amminici in catena sono completamente protonati in soluzione acquosa per $\text{pH} \leq 6,2$ [6].

Il chitosano è un polimero biocompatibile e a basso costo, in quanto ricavabile da materiale di scarto, per cui è stato diffusamente testato a fini applicativi. Dal punto di vista biomedico, è stata dimostrata la sua azione antiacido e antiulcera [7], ipocolesterolemica [8] e di coadiuvante nel processo di guarigione delle ferite [9]. Di conseguenza, sono state indagate le sue potenzialità per il

rilascio controllato di farmaci a livello oftalmico, nasale, orale, intestinale, vaginale, transdermico nonché per la veicolazione di vaccini [10].

In aggiunta, il chitosano può essere impiegato come *scaffold* per la rigenerazione dei tessuti biologici da solo o in combinazione con altri polimeri biocompatibili, ad esempio nell'ingegneria tissutale della cartilagine sotto forma di nanofibre disperse in una matrice di collagene con ottimo responso meccanico [11]; recentemente nanofibre di acido ialuronico e chitosano sono state prese in considerazione come *scaffold* per la rigenerazione dell'osso [12]. Non sono pochi neppure gli esempi in letteratura di compositi '*chitosan-based*', in cui le proprietà meccaniche, reologiche o funzionali del materiale finale risultano ottimizzate dalla presenza del chitosano [13].

Il polisaccaride presenta inoltre proprietà gelificanti una volta solubilizzato in acqua in ambiente acetico, e può pertanto essere usato come *hydrogel* o, in alternativa, come *alcogel* per scambio in etanolo, come *aerogel* per essiccamento con CO₂ supercritica, oppure come *xerogel* per evaporazione del solvente [14].

2.2 I Drug Delivery Systems

Con il termine di *Drug Delivery Systems* (DDS) si indicano i dispositivi in grado di somministrare in modalità controllata la specie farmacologicamente attiva in essi contenuta e trasportata.

Il primo dispositivo noto di somministrazione di un farmaco è stato la pillola, di cui è stata trovata evidenza già nei papiri dell'antico Egitto. Si tratta di un formulato che contiene, insieme al principio attivo, degli eccipienti che proteggono e stabilizzano il farmaco fino al momento della somministrazione [15]. La principale controindicazione concernente l'utilizzo della pillola come DDS risiede nel passaggio obbligato attraverso lo stomaco che è un ambiente acido.

Altri sistemi di somministrazione dei farmaci di tipo sistemico sono stati sviluppati nel corso del tempo (intramuscolo ed endovena), aventi però tutti gli stessi fattori limitanti come la necessità della somministrazione periodica e il limitato tempo di permanenza in circolo. In questa panoramica si inseriscono i dispositivi a rilascio controllato del farmaco (*drug delivery systems*, DDS) [16]. Si tratta di sistemi organici, inorganici o ibridi, biocompatibili e capaci di veicolare il farmaco in un organismo vivente e rilasciarlo in maniera controllata nel tempo oltrepassando, almeno teoricamente, le difficoltà della terapia farmacologica tradizionale [17]. Tra i materiali utilizzati per la realizzazione di tali dispositivi, i biopolimeri sono i più promettenti in termini di biocompatibilità e biodegradabilità, costi di produzione e lavorabilità su grande scala. Tra i biopolimeri, il chitosano è molto usato per la realizzazione di DDS [10, 18, 19] per le sue eccellenti proprietà, che sono state a lungo testate con vari tipi di farmaci, restituendo solitamente buoni profili farmacocinetici [19].

Molte delle applicazioni dei materiali, inclusi i biopolimeri, sono possibili non solo in relazione alla chimica del sistema, ma anche in funzione della geometria [20]. Negli ultimi tempi, grazie all'aiuto delle nuove tecnologie, si sono resi possibili la preparazione e l'impiego di sistemi di dimensioni micrometriche e nanometriche [21], principalmente sotto forma di particelle. Le microparticelle o nanoparticelle hanno peculiari proprietà che le rendono utili in diversi campi di applicazione: l'elevata area superficiale, la controllabilità delle dimensioni e la possibilità di funzionalizzare *ad hoc* la superficie, che ne hanno suggerito il proficuo impiego nella veicolazione dei farmaci [22].

Le tecniche di preparazione di microsfele polimeriche naturali sono state sviluppate a partire dagli anni '60, permettendo di realizzare i primi prodotti commerciali a base di destrano, agarosio e cellulosa (coacervazione, emulsione acqua/olio) [23]. In letteratura sono presenti numerosi lavori su applicazioni di microsfele di chitosano nel *drug delivery* (ad esempio per la veicolazione di docetaxel, curcumina e prodigiosina) [24].

Un'altra forma particolarmente interessante ed applicativa di tali polimeri nel rilascio di farmaci è quella dei film, ovvero la deposizione controllata del polimero su opportuno supporto [25]. La duttilità del chitosano permette di preparare film per il rilascio controllato di farmaci.

Le principali tecniche di deposizione sono due, lo *spin coating* e il *drop casting* [26]. Entrambe le tecniche consistono nel depositare una certa quantità di soluzione polimerica sul supporto; la successiva fase di rimozione del solvente consente di ottenere un film omogeneo e di spessore uniforme. Nella tecnica dello *spin coating* una goccia della soluzione polimerica è deposta su di un supporto, che viene poi fatto ruotare attorno ad un asse perpendicolare al piano di deposizione. La forza centrifuga stende la goccia sul supporto mentre nel frattempo il solvente evapora. Nel *drop casting*, il film si forma per semplice evaporazione del solvente a temperatura controllata da un fissato volume di soluzione depositato sul supporto. Numerosi sono gli esempi di film di chitosano testati come DDS (ad esempio per la veicolazione di ondansetron) [27].

Come ultima tipologia di sistemi per la veicolazione di farmaci si riportano le membrane polimeriche che possono essere preparate tramite diverse tecnologie, tra le quali l'elettrofilatura (*electrospinning*), che consente di ottenere "non-tessuti" nanostrutturati tramite un procedimento versatile e relativamente economico [28]. L'*electrospinning* consiste nell'applicazione di un campo elettrico ad una soluzione polimerica, contenuta all'interno di una siringa e spinta da una pompa volumetrica. La goccia in uscita dall'ago viene deformata per effetto del campo elettrico generando un getto stirato e assottigliato fino a formare una fibra, che va a depositarsi su di un collettore posto a distanza opportuna, mentre il solvente evapora nel tragitto dall'ago al collettore. Sfortunatamente elettrofilare biopolimeri, e soprattutto polisaccaridi, è talvolta difficoltoso, principalmente a causa della viscosità delle loro soluzioni e della loro tendenza a formare legami ad idrogeno intercatena.

Tuttavia, esistono in letteratura esempi di biopolimeri elettrofilati con successo grazie all'impiego di opportuni solventi o per miscelamento con polimeri quali poli(etilene ossido) (PEO), poli(vinilalcol) (PVA) o poli(vinilpirrolidone) (PVP) [29].

2.3 La malattia parodontale

Tra gli ambiti di applicazione dei biopolimeri nel *drug delivery*, un campo particolarmente promettente è quello relativo alla cura della malattia parodontale [30]. La parodontologia è quella branca della odontostomatologia che si occupa della diagnosi e della cura delle patologie che coinvolgono denti e tessuti di supporto. La malattia parodontale è una patologia, o meglio una famiglia di malattie dei tessuti parodontali, tutte caratterizzate da distruzione dell'osso alveolare e spesso associata alla perdita dei denti. La definizione generale della malattia parodontale è pertanto molto complessa, ma ad essa possono essere ricondotte le gengiviti e le parodontiti.

È una patologia ad eziologia batterica ma strettamente correlata all'interazione di tre cofattori ambientali ed individuali: la suscettibilità dell'ospite, le situazioni ambientali e i fattori comportamentali. La placca batterica, pur essendo condizione necessaria per l'insorgenza della malattia, riveste un ruolo più o meno rilevante a seconda del tipo di interazione che si viene ad instaurare con l'ospite. È stato infatti dimostrato che numerosi fattori locali e sistemici, come la presenza di patologie croniche come il diabete, influenzano significativamente il decorso clinico della malattia. La malattia parodontale determina uno stato flogistico cronico che danneggia i tessuti circostanti. Di conseguenza, la cura di tale patologia è basata essenzialmente sull'applicazione topica di antibiotici ed antinfiammatori nelle tasche parodontali. In particolare, il Dr. Becce (dentista, la cui consulenza è alla base del lavoro di tesi), nella pratica clinica quotidiana somministra antibiotici ed antinfiammatori in concerto per curare le parodontiti, nel corso di sedute ripetute ad intervalli di tempo regolari. Nello specifico, sono stati scelti l'antibiotico Doxiciclina cloridrato (DC), appartenente alla famiglia delle tetracicline, e il cortisonico Triamcinolone acetone (TC). L'antibiotico serve a debellare l'agente eziologico responsabile dello stato infettivo mentre il cortisonico attenua per quanto possibile la risposta immunitaria in modo da evitare che l'infiammazione danneggi troppo il tessuto sede dell'infezione.

Le tetracicline hanno un'attività antibiotica molto estesa che comprende batteri Gram-positivi e Gram-negativi, aerobi ed anaerobi. In generale, si tratta di farmaci batteriostatici. I microrganismi che sono resistenti ad una tetraciclina spesso manifestano resistenza anche alle altre. Tale resistenza si manifesta attraverso i seguenti meccanismi principali:

- diminuzione dell'accumulo di tetraciclina per ridotto ingresso dell'antibiotico o per acquisizione di una nuova via di eliminazione;
- riduzione dell'accesso della tetraciclina al ribosoma (meccanismo d'azione), per la presenza di proteine che proteggono i ribosomi;
- inattivazione enzimatica delle tetracicline.

Tutte le tetracicline presentano la stessa struttura tetraciclica rappresentata da un nucleo naftacen-carbossiamidico e formano chelati metallici insolubili in acqua i quali sembrano avere un ruolo ben specifico nel meccanismo d'azione di questi antibiotici [31]. I siti chelanti includono il sistema β -dichetone, il sistema enolico e quello carbossiamidico. Un'altra caratteristica comune a tutte le tetracicline è quella di imbrunire alla luce e di degradarsi in ambiente acquoso [32].

I cortisonici [33] sono invece farmaci antinfiammatori e immunosoppressori aventi struttura analoga a quella dei corticosteroidi endogeni che sono sintetizzati naturalmente nei surreni a partire dal colesterolo. Sono caratterizzati dalla presenza dell'anello ciclopentanoperidrofenantrenico. I cortisonici sintetici si ottengono per derivatizzazione chimica di steroidi naturali allo scopo di esaltarne la potenza antinfiammatoria e ridurre gli effetti collaterali.

Poiché il tessuto parodontale, una volta danneggiato, presenta limitate capacità di rigenerazione, la cura tempestiva ed efficace delle malattie parodontali risulta di primaria importanza. La somministrazione di antibiotici ed antinfiammatori per via sistemica si è rivelata inadeguata. Questi farmaci risultano più efficaci quando somministrati localmente, ma il loro effetto è ridotto dalla rapida dispersione in bocca. La realizzazione di un dispositivo per il rilascio controllato in grado di mantenere i farmaci nelle tasche parodontali per qualche settimana, in modo da prolungarne l'effetto nel tempo senza dover ricorrere a somministrazioni ripetute, porterebbe ad un miglioramento sostanziale del protocollo di cura delle parodontiti, riducendo i costi della terapia e il tempo ad essa dedicato.

Partendo da tali presupposti, nel corso di questo lavoro di dottorato si è intrapreso lo studio esplorativo delle potenzialità del chitosano sotto diverse forme per la produzione di un dispositivo capace di rilasciare in maniera spazialmente e temporalmente controllata DC e TC nelle tasche parodontali per la cura delle parodontiti. In dettaglio, il programma di lavoro portato avanti si è

articolato nello studio delle cinetiche di carico (*uptake*) e di rilascio di DC e TC da parte di idrogeli, film e membrane di chitosano al variare delle proprietà molecolari del polisaccaride e delle condizioni sperimentali.

Capitolo 3

Materiali e Metodi

3.1 Materiali

I reagenti impiegati in questo lavoro di tesi sono di seguito riportati insieme alle loro specifiche e alla casa di produzione:

Doxiciclina cloridrato, DC (Alfa Aesar)

Triamcinolone acetone, TC (98%, Alfa Aesar)

Chitosano ad alta massa molecolare, Chit HMW ($1,6 \cdot 10^6$ g/mol, Fluka)

Chitosano a media massa molecolare, Chit MMW ($1,4 \cdot 10^6$ g/mol, Fluka)

Chitosano a bassa massa molecolare, Chit LMW ($1,2 \cdot 10^6$ g/mol, Fluka)

Etilenglicoldiglicidil etere, EGDE (Sigma Aldrich)

Tripeptide Arginina-Glicina-Aspartato, RGD (Alfa Aesar)

1-(3-dimetilamminopropil)-3-etilcarbodiimmide idrocloruro, EDC (98%, Alfa Aesar)

Poli(ossietilene), PEO ($9 \cdot 10^5$ g/mol, Aldrich Chemistry)

Idrogenofosfato di disodio, Na_2HPO_4 (99%, Riedel-De Haen AG Seelze-Hannover)

Diidrogenofosfato di sodio, NaH_2PO_4 (> 99%, Fluka BioChemika)

Idrogenocarbonato di sodio, NaHCO_3 (99,5%, Merck)

Cloruro di calcio, CaCl_2 (Sigma Cell Culture Reagents)

Cloruro di sodio, NaCl (> 99,5%, Fluka BioChemika)

Idrossido di sodio, NaOH (97%, Aldrich)

Acido cloridrico fumante, HCl (37% v/v, Honeywell Fluka)

Acido acetico glaciale, CH_3COOH (> 99,7% v/v, Sigma Aldrich)

I solventi elencati di seguito sono tutti di grado spettroscopico e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione:

Etanolo (96% v/v, Fluka)

Ammoniaca (25% v/v, Merck)

Per le soluzioni acquose è stata utilizzata acqua bidistillata fornitaci dalla Sezione di Chimica Organica del DCCI.

3.2 Strumentazioni usate

Spettrofotometro UV-Vis-NIR JASCO, Mod. V-530

Spettrofotometro UV-Vis-NIR Perkin-Elmer, Mod. Lambda 9

Spettrofotometro UV-Vis-NIR Shimadzu, Mod. UV-1800

Spettrofotometro Infrarosso a Trasformata di Fourier (FT-IR) Bruker, Mod. Vertex70, operante sia in trasmissione che in modalità ATR

Microscopio elettronico a emissione di campo FE-SEM Zeiss, Mod. Supra 40 VP

Microscopio a forza atomica AFM Digital Instruments Nanoscope

Microscopio ottico Optech Optical Technology Germany

Reometro Physica Anton Paar, Mod. MCR 301

Dispositivo per elettrofilatura home-made

Centrifuga Heraeus Sepatech

Stufa da laboratorio Savatec, Mod. NSV 9035

Bilancia Mettler, Mod. AE200

Piastra magnetica Falc

Piastra basculante Stuart Scientific Mini Orbital, Mod. Shaker SO5

3.3 Modelli di elaborazione dei dati sperimentali

Le capacità di *uptake* e rilascio di DC e TC da parte dei sistemi a base di chitosano investigati sono state determinate a partire da misure di assorbimento UV-Vis.

Le capacità assorbenti dei sistemi sono state testate per incubazione a temperatura ambiente con soluzioni dei farmaci a concentrazione definita fino al raggiungimento delle condizioni di equilibrio. Ad intervalli di tempo predefiniti, la concentrazione della soluzione di farmaco è stata monitorata spettroscopicamente al massimo di assorbimento delle specie in esame (rispettivamente 345 nm per DC e 235 nm per TC). La massa di specie chimica assorbita per unità di chitosano, q_t (g/Kg), è definita dalla relazione:

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)}{W} V \quad [1]$$

dove C_0 e C_t sono la concentrazione iniziale e al tempo t della specie assorbita (g/m^3), V è il volume (m^3) di soluzione a contatto con il chitosano e W è il peso del polimero secco (Kg).

Gli studi di rilascio di DC e TC sono stati condotti a partire dai sistemi saturati con i farmaci per incubazione con un volume noto di tampone fosfato (PBS) di concentrazione pari a $0,025 \text{ mol/L}$ e forza ionica pari a $0,15 \text{ mol/L}$ nel tentativo di simulare le condizioni fisiologiche. Anche in questo caso la concentrazione della soluzione di farmaco nella soluzione fisiologica surnatante è stata misurata per via spettroscopica ad intervalli di tempo costanti al massimo di assorbimento di DC e TC. La quantità di specie chimica rilasciata per unità di chitosano, anche in questo caso definita con il parametro q_t (g/Kg), è stata calcolata dalla relazione:

$$q_t = \frac{(C_t)}{W} V \quad [2]$$

I valori di q_t ottenuti sia in fase di assorbimento sia di rilascio sono stati successivamente elaborati secondo il modello cinetico di pseudo-2° ordine, la cui espressione analitica è riportata di seguito:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad [3]$$

da cui è possibile ricavare la quantità di farmaco assorbita o rilasciata all'equilibrio q_e (g/Kg) e la costante cinetica k_2 (Kg/g min) associata al processo.

Le espressioni analitiche riportate sono state selezionate in un precedente lavoro di dottorato di ricerca basato sullo studio dell'interazione tra idrogeli di chitosano e sonde coloranti di diversa struttura chimica [34].

Capitolo 4

Risultati

4.1 Studio delle proprietà spettroscopiche di Doxyciclina cloridrato (DC) e Triamcinolone acetone (TC) in soluzione

La prima parte dell'attività sperimentale svolta nel corso del mio dottorato ha riguardato lo studio delle soluzioni di DC e TC. Nei paragrafi seguenti sono riportati i risultati ottenuti dall'indagine condotta tramite spettroscopia UV-Vis dei due farmaci in differenti condizioni sperimentali e nel tempo.

4.1.1 Studio di soluzioni acquose di DC

La Doxyciclina (DC) è una polvere di colore giallo, dotata di buona solubilità in acqua (630 g/L), ma che in ambiente acquoso va incontro a fotossidazione con conseguente formazione di anidroderivati, privi di attività antibiotica e più tossici degli antibiotici di partenza [32]. L'ossidazione di DC risulta accelerata in soluzioni acide e/o ad elevata forza ionica.

Partendo da tale presupposto, in questo lavoro di dottorato sono state studiate soluzioni di DC in diversi solventi quali saliva artificiale, acqua BD e tampone fosfato (PBS) al fine di testare la stabilità delle soluzioni acquose di DC in diverse condizioni sperimentali. La **saliva artificiale**, selezionata nell'intento di riprodurre il più possibile l'intorno chimico della cavità orale, è così costituita [35]: Na_2HPO_4 ($3,7 \cdot 10^{-3}$ mol/L), NaHCO_3 ($2,5 \cdot 10^{-2}$ mol/L), CaCl_2 ($1,6 \cdot 10^{-3}$ mol/L), HCl ($3,1 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Il tampone **PBS** è stato invece preparato per dissoluzione in acqua bidistillata di Na_2HPO_4 ($1,3 \cdot 10^{-2}$ mol/L), NaH_2PO_4 ($1,3 \cdot 10^{-2}$ mol/L) e NaCl ($1,5 \cdot 10^{-1}$ mol/L).

Tutti i solventi sono stati testati ad una concentrazione massima di DC pari a 1 mmol/L.

DC in saliva forma una sospensione che, se esposta alla luce, imbrunisce nel giro di poche ore. Il cambio di colorazione, associato a variazioni delle proprietà spettroscopiche del sistema, è stato monitorato tramite spettroscopia UV-Vis. In Figura 4.1 sono riportati due spettri di assorbimento di una sospensione colloidale di DC in saliva artificiale di concentrazione pari a 1 mmol/L, registrati per la miscela appena preparata (linea nera) e invecchiata 4 giorni al riparo dalla luce (linea rossa).

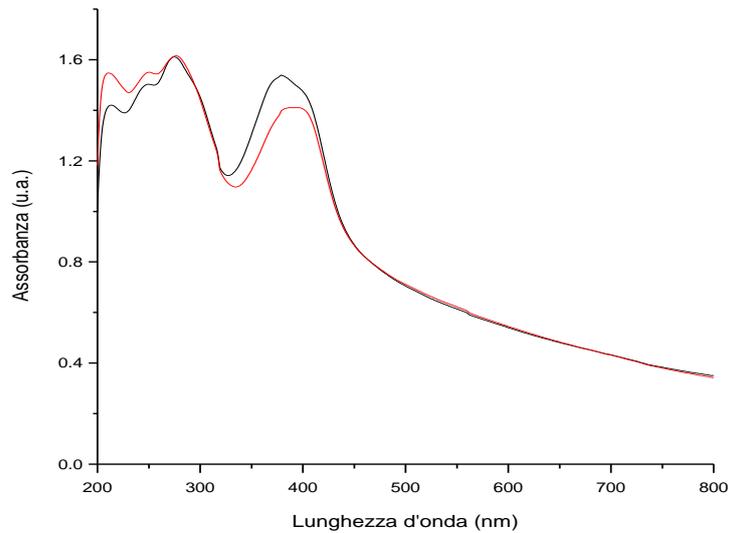


Figura 4.1: Spettri di assorbimento di una sospensione colloidale di DC in saliva artificiale di concentrazione pari a 1 mmol/L, registrati per la miscela appena preparata (linea nera) e invecchiata 4 giorni (linea rossa).

Entrambi gli spettri sono caratterizzati da elevata intensità di *scattering* nella regione vicina al NIR, a sottolineare la natura colloidale delle dispersioni di DC in saliva artificiale. Nell'intervallo di assorbimento al di sotto di 400 nm, il profilo spettrale della sospensione fresca è caratterizzato dalla presenza di una banda nel visibile con massimo intorno a 380 nm e spalla intorno a 400 nm, più una serie di bande non perfettamente risolte nella regione dell'UV. Dopo quattro giorni di invecchiamento il profilo spettrale risulta modificato, evidenziando un abbassamento di intensità per la banda nel visibile e un incremento di assorbanza al di sotto di 250 nm. Tali cambiamenti sono associati alla fotossidazione di DC, visibile ad occhio nudo dal cambiamento di colore da giallo a marrone della sospensione acquosa (Figura 4.2).

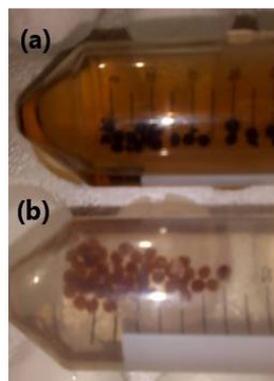


Figura 4.2: Sospensioni di DC in concentrazione pari a 1 mmol/L in saliva artificiale (a) e in acqua bidistillata (b) invecchiate una settimana.

In Figura 4.3 sono invece riportati gli spettri di assorbimento registrati a diversi tempi di invecchiamento (soluzione fresca, soluzione invecchiata 24 ore e soluzione invecchiata una settimana) per soluzioni di concentrazione pari a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L di DC solubilizzate rispettivamente in acqua bidistillata (a) e tampone PBS (b) e tenute al riparo dalla luce.

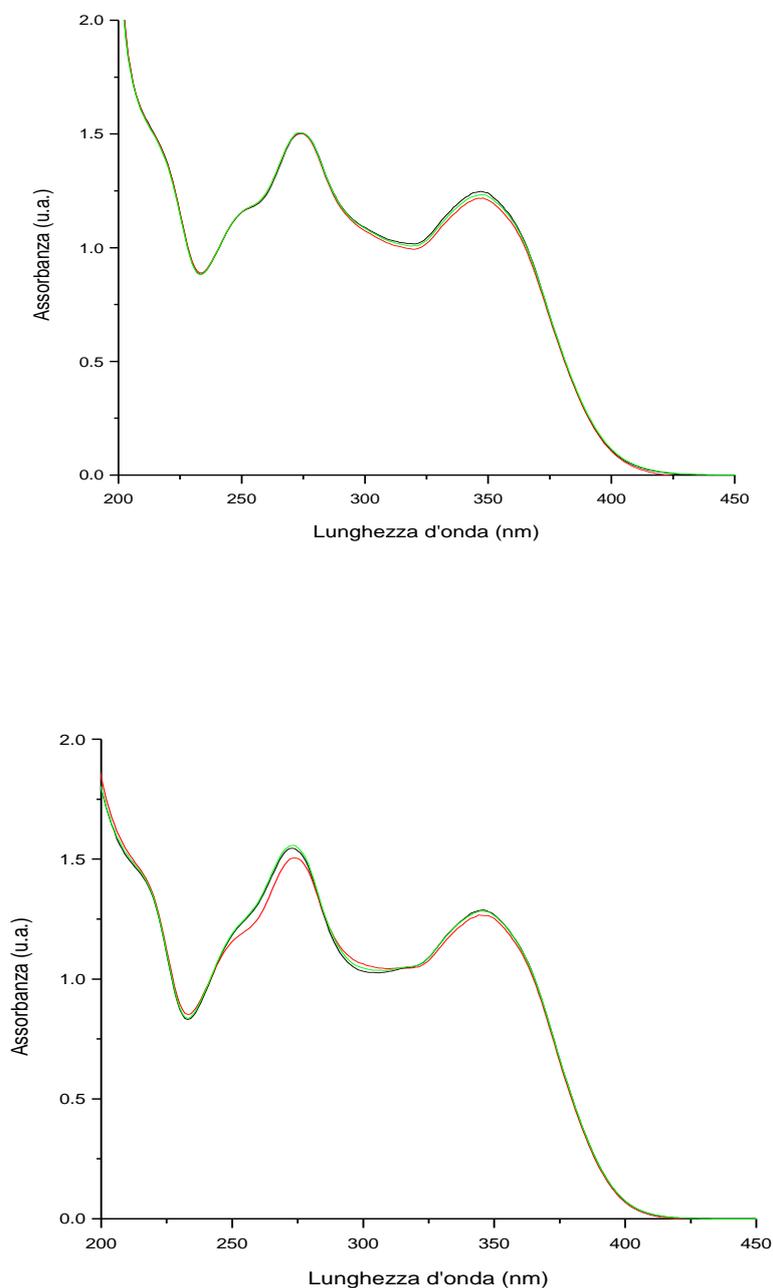


Figura 4.3: Spettri di assorbimento di soluzioni di DC di concentrazione $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L in acqua bidistillata (a) e tampone PBS (b) registrati a diversi tempi di invecchiamento: soluzione fresca (linea nera), soluzione invecchiata un giorno (linea rossa), soluzione invecchiata una settimana (linea verde).

A differenza di quanto osservato in Figura 4.1, i profili spettrali registrati in entrambi i solventi si presentano privi di scattering e pressochè invariati nel tempo, a sottolineare il fatto che DC forma soluzioni più stabili sia in acqua bidistillata sia in tampone PBS.

Tutti gli spettri sono caratterizzati da due bande di assorbimento ben definite, centrate rispettivamente a 345 nm e 275 nm con una spalla intorno a 250 nm, osservando minime variazioni di posizione al variare dell'ambiente circostante. In base a tali risultati, si è scelto di procedere con lo studio di *uptake* di DC da parte dei DDS a base di chitosano a partire da soluzioni di DC in acqua bidistillata, mentre per lo studio del rilascio del farmaco è stato preferito il tampone PBS in modo da mimare, almeno in parte, le condizioni fisiologiche.

Inoltre, anche la retta di calibrazione dell'assorbimento di DC in soluzione, necessaria per determinare per via spettroscopica la quantità di farmaco assorbita e/o rilasciata nel tempo dai DDS, è stata ricavata da soluzioni dell'antibiotico in acqua bidistillata.

In Figura 4.4 è riportata la retta di calibrazione ricavata da soluzioni acquose di DC di concentrazione variabile da $1,0 \cdot 10^{-5}$ a $2,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L e relativa ai valori di assorbanza registrati in corrispondenza del massimo a 345 nm. Gli spettri ottenuti dalle diverse soluzioni sono riportati in Appendice. Dalla pendenza della retta estrapolata dai punti sperimentali è stato ricavato il valore del coefficiente di estinzione molare (ϵ) di DC in acqua a 345 nm, risultato pari a $11000 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

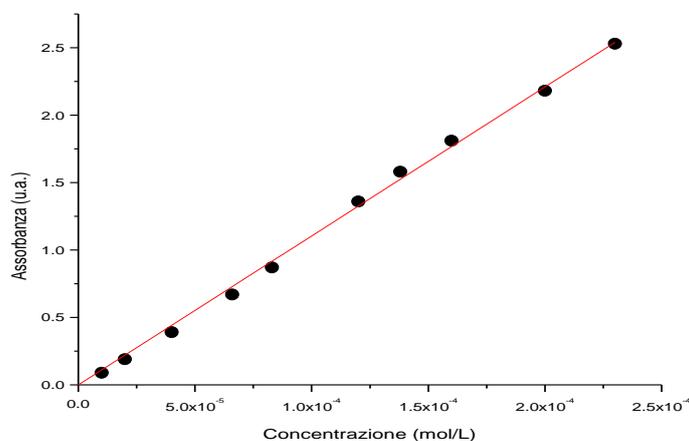


Figura 4.4: Retta di calibrazione dell'assorbanza a 345 nm di DC in acqua BD, ottenuta da soluzioni di concentrazione variabile ($1,0 \cdot 10^{-5} \div 2,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L).

4.1.2 Studio di soluzioni alcoliche e idroalcoliche di TC

Il Triamcinolone acetone (TC) è un derivato cortisonico commercializzato sotto forma di polvere bianca. E' dotato di scarsa solubilità in acqua, ma di buona solubilità negli alcoli. In Figura 4.5 è riportato lo spettro di assorbimento di TC in etanolo, caratterizzato dalla presenza di una banda ben risolta nella regione dell'UV e centrata a 235 nm.

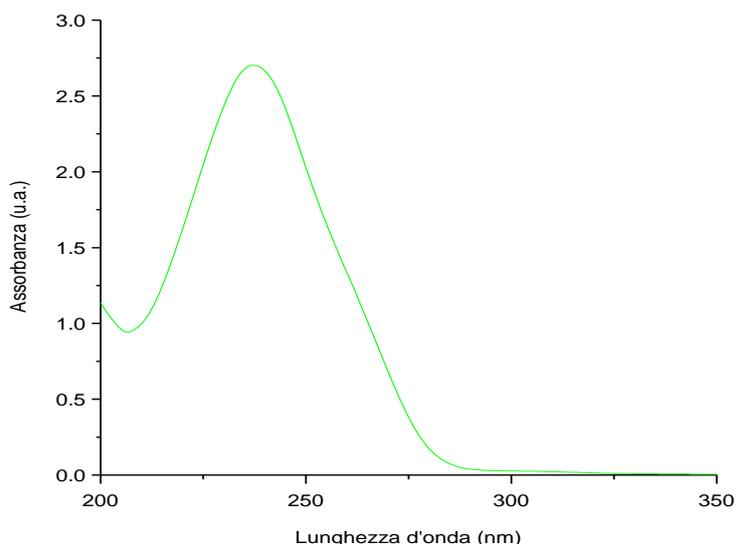


Figura 4.5: Spettro di assorbimento di TC in etanolo alla concentrazione 1 mmol/L.

Le proprietà in soluzione di TC sono state testate in soluzioni idroalcoliche allo scopo di individuare le condizioni sperimentali ottimali per valutare il rilascio del farmaco da parte dei DDS presi in esame in condizioni il più possibile approssimabili a quelle fisiologiche. A tale scopo sono state preparate 10 soluzioni di TC a concentrazione nota ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/L) in miscele di acqua ed etanolo a contenuto alcolico variabile da 0 a 90%, che sono state successivamente caratterizzate tramite spettroscopia UV-Vis. L'andamento del coefficiente di assorbimento molare ϵ , misurato al massimo di assorbimento di TC per tutti i campioni esaminati, è riportato in Figura 4.6 in funzione della percentuale d'acqua presente nella miscela.

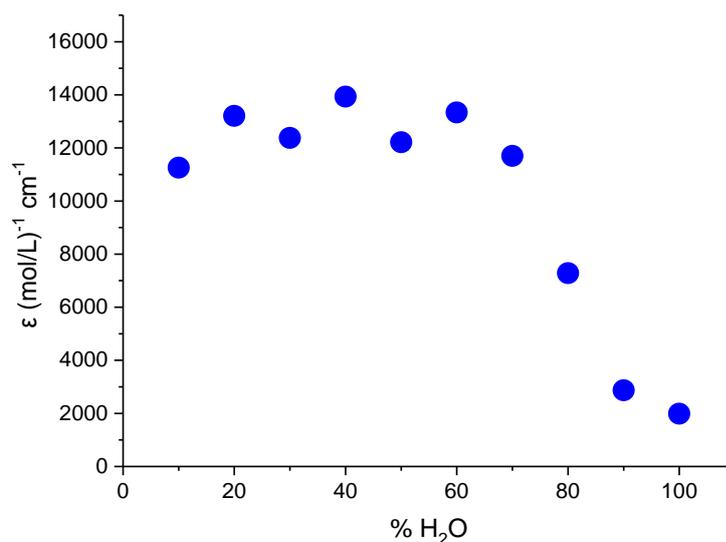


Figura 4.6: Andamento del coefficiente di assorbimento molare (ϵ) di TC in miscele H₂O:EtOH di contenuto variabile.

E' evidente come il valore di ϵ si mantenga pressoché costante per percentuali di acqua inferiori a circa il 60% per poi diminuire bruscamente a causa della drastica riduzione di solubilità di TC nel mezzo solvente. In base a tale risultato, le prove di *uptake* di TC da parte dei DDS testati sono state condotte a partire da soluzioni di TC in etanolo, mentre le prove di rilascio sono state effettuate in una miscela di tampone PBS ed etanolo al 50% v/v.

Dati di letteratura riportano che TC in soluzione va incontro a decomposizione, molto probabilmente causata dall'assorbimento di radiazioni UV, che portano alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come nel caso di un altro cortisonico ampiamente utilizzato, il Prednisolone [36]. E' stato dimostrato che la reazione di decomposizione dipende da pH e forza ionica della soluzione, nonché dalla concentrazione di eventuali sistemi tampone [37]. Di conseguenza, è stato necessario valutare la stabilità delle soluzioni idroalcoliche di TC in presenza o meno del tampone PBS. In Figura 4.7 sono mostrati gli spettri registrati nel tempo per soluzioni di TC alla concentrazione di $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L rispettivamente in EtOH, in miscela di H₂O:EtOH al 50% v/v ed in miscela di tampone PBS:EtOH al 50% v/v (al riparo dalla luce).

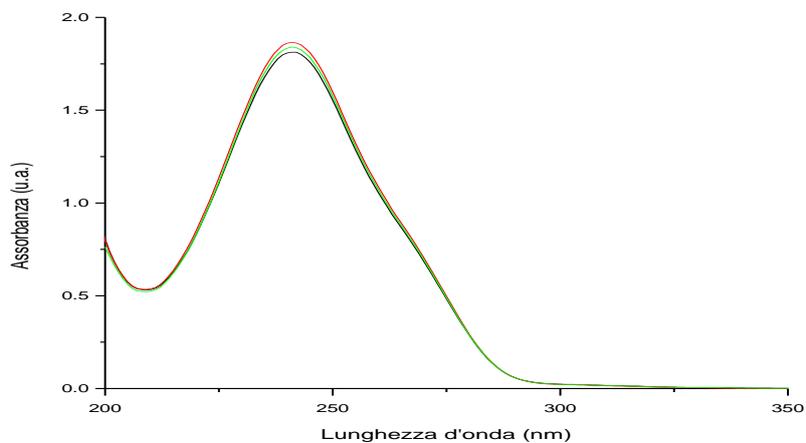
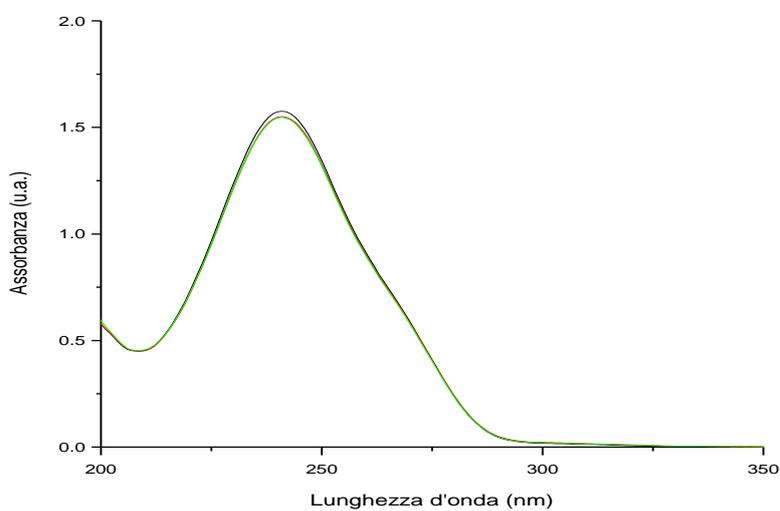
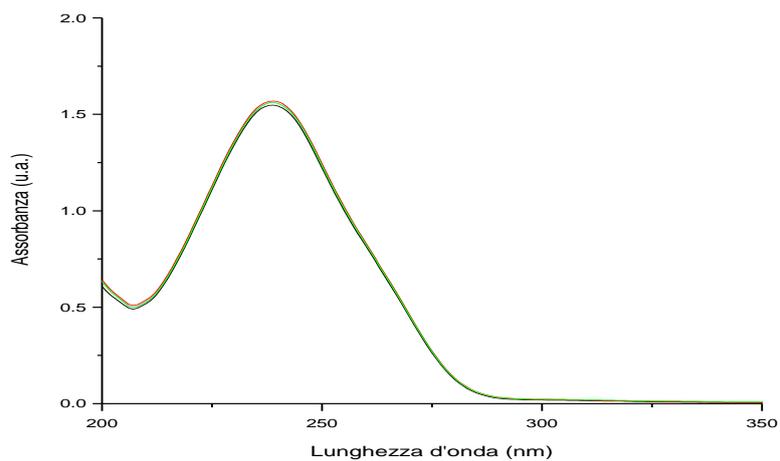


Figura 4.7: Spettri di assorbimento di soluzioni di TC di concentrazione $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L in EtOH (a), acqua:etanolo (50% v/v, b) e tampone PBS:etanolo (50% v/v, c) registrati a diversi tempi di invecchiamento: soluzione fresca (linea nera), soluzione invecchiata un giorno (linea rossa), soluzione invecchiata una settimana (linea verde).

In tutti i casi i profili spettrali risultano invariati, a sottolineare la buona stabilità delle soluzioni di TC nei mezzi solvente selezionati per gli studi di *uptake* e rilascio del farmaco.

Al pari di quanto fatto per DC, anche per TC è stata determinata la retta di calibrazione dell'assorbimento del cortisonico in soluzione, necessaria per determinare per via spettroscopica la quantità di farmaco assorbita e/o rilasciata nel tempo dai DDS. Avendo dimostrato che le proprietà spettroscopiche delle soluzioni di TC non variano significativamente in miscele idroalcoliche con contenuto d'acqua inferiore al 50%, la retta di calibrazione è stata ricavata da soluzioni di TC in etanolo di concentrazione variabile da $2,1 \cdot 10^{-5}$ a $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L, ed è relativa ai valori assorbanza registrati in corrispondenza del massimo a 235 nm (Figura 4.8). Gli spettri ottenuti dalle diverse soluzioni sono riportati in Appendice. Dalla pendenza della retta estrapolata dai punti sperimentali è stato ricavato il valore del coefficiente di ϵ del Trimcinolone in etanolo a 235 nm, che è risultato pari a $13000 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

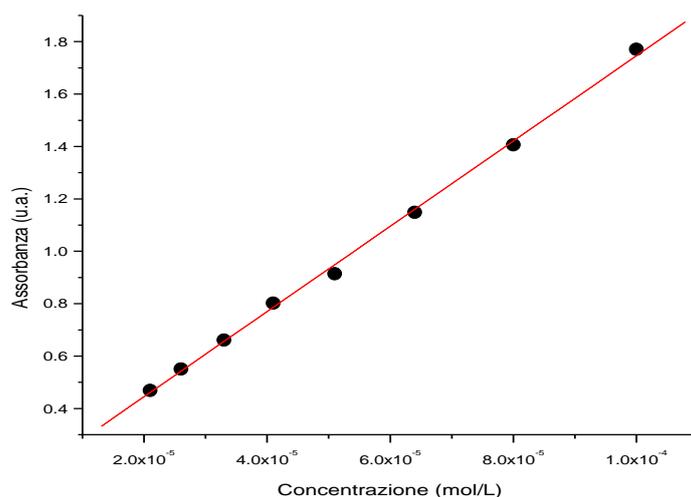


Figura 4.8: Retta di calibrazione dell'assorbanza a 235 nm di TC in etanolo, ottenuta da soluzioni di concentrazione variabile ($2,1 \cdot 10^{-5} \div 1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L).

4.2 Preparazione e caratterizzazione di idrogeli di chitosano come dispositivi per il rilascio controllato di DC e TC

Il primo DDS realizzato per il rilascio controllato di DC e TC sono stati idrogeli di chitosano di porosità adatta all'incorporazione di sostanze farmacologicamente attive.

Al fine di valutare la dipendenza delle capacità di *uptake* e rilascio del DDS dalle proprietà molecolari del polisaccaride, gli idrogeli sono stati preparati utilizzando chitosani a diversa massa molecolare e diverso grado di acetilazione. Sono stati valutati anche gli effetti esercitati dall'invecchiamento degli idrogeli e dal congelamento. I risultati ottenuti sono riportati nei paragrafi seguenti.

4.2.1 Preparazione di idrogeli di chitosano

Idrogeli di chitosano di dimensioni millimetriche sono stati preparati attraverso una metodica semplice, economica e riproducibile, messa a punto in un lavoro di tesi precedente [34]. Tale procedura, schematizzata in Figura 4.9, consiste nello sgocciolamento controllato di una soluzione al 2% w/v del polisaccaride in ambiente acetico (soluzione acquosa di CH_3COOH di concentrazione pari a 0,9 mol/L) in una soluzione coagulante basica, costituita da una miscela di EtOH/ NH_3 / H_2O 7:2:1 v/v. La velocità di sgocciolamento è stata opportunamente calibrata in modo da ottenere una goccia al secondo per avere un controllo accurato delle dimensioni finali degli idrogeli. Una volta ottenuti, gli idrogeli sono stati lavati accuratamente con acqua deionizzata fino a neutralità e quindi conservati per l'uso in acqua bidistillata a temperatura ambiente.

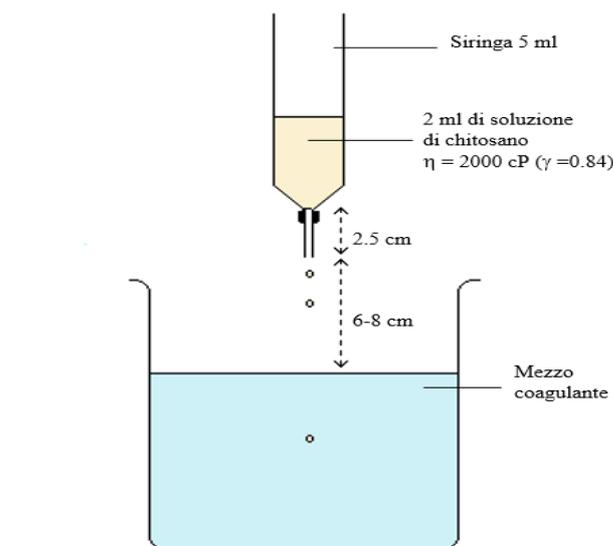


Figura 4.9: Schema di preparazione per sgocciolamento degli idrogeli di chitosano.

Gli idrogeli sono stati caratterizzati al microscopio ottico. A titolo di esempio, in Figura 4.10 sono mostrati gli idrogeli ottenuti dal chitosano Chit HMW, che sono risultati pressoché sferici (rapporto assiale = $1,04 \pm 0,03$) ed uniformi (diametro medio = $1,97 \pm 0,06 \text{ mm}$).

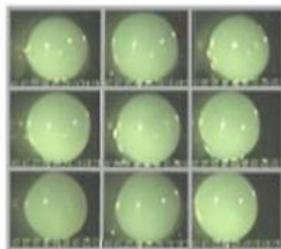


Figura 4.10: Tipiche immagini registrate al microscopio ottico degli idrogeli sferici di chitosano ottenuti per sgocciolamento.

Per completarne lo studio morfologico, gli idrogeli sono stati liofilizzati, ricoperti con uno strato d'oro di 20 nm per renderli conduttivi e quindi caratterizzati al microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo (FE-SEM). In Figura 4.11 sono riportate alcune immagini ottenute al FE-SEM con diversi ingrandimenti.

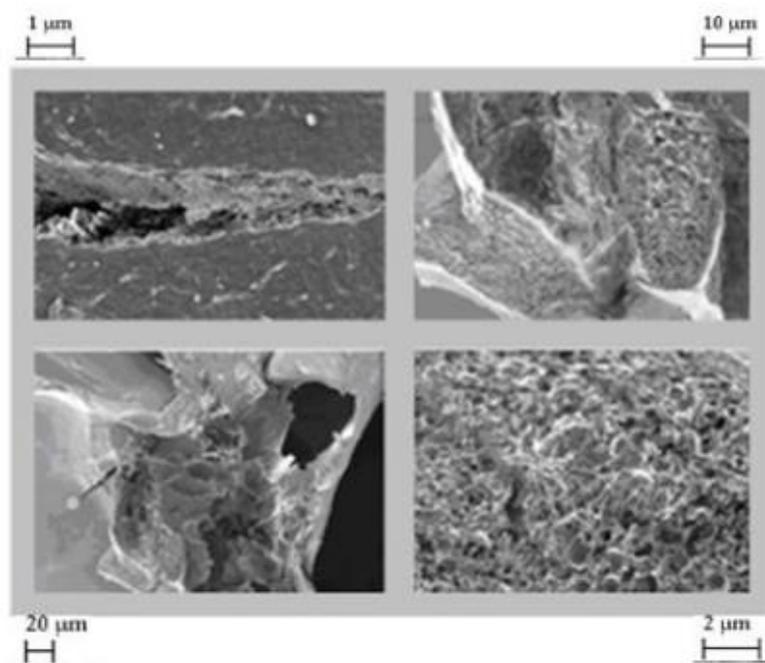


Figura 4.11: Immagini di idrogeli di chitosano ottenute al FE-SEM con diversi ingrandimenti.

Le immagini evidenziano una struttura eterogenea degli idrogeli, costituita da uno strato esterno denso di spessore compreso tra 2 e 10 μm , e da un nucleo interno caratterizzato dalla presenza di pori interconnessi di dimensioni variabili tra 0,3 e 25 μm e quindi potenzialmente adatti ad includere molecole farmacologicamente attive anche relativamente grandi.

4.2.2 Uptake e rilascio di DC da parte di idrogeli di chitosano

Gli esperimenti di *uptake* sono stati condotti sugli idrogeli di chitosano seguendo il seguente protocollo:

25 idrogeli sono stati messi a contatto a temperatura ambiente con 5 mL di una soluzione di DC in acqua BD di concentrazione variabile da $4 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L;

ad intervalli di tempo predefiniti, la concentrazione di DC del surnatante è stata determinata spettroscopicamente misurando l'intensità al massimo di assorbimento dell'antibiotico (345 nm) e ricavandone il valore dalla retta di calibrazione di DC in acqua riportata in Figura 4.4.

La quantità di DC assorbita dagli idrogeli al variare del tempo è stata ricavata dalla concentrazione del surnatante per differenza rispetto alla concentrazione iniziale ed espressa in termini di specie chimica assorbita per unità di massa di assorbente, q_t , secondo la relazione [1], riportata nel capitolo 3;

una volta ricavati, i valori di q_t sono stati elaborati secondo il modello di pseudo-2° ordine (equazione [3] del capitolo 3) per ricavare i parametri q_e e k_2 .

Sugli idrogeli preparati da Chit HMW sono stati condotti esperimenti con otto soluzioni a diversa concentrazione di DC (da $4 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L). A titolo di esempio, in Figura 4.12 sono mostrati gli andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t ricavati dagli idrogeli messi ad equilibrare con una soluzione di DC di concentrazione pari a $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L. I grafici relativi alle altre soluzioni sono riportati in Appendice.

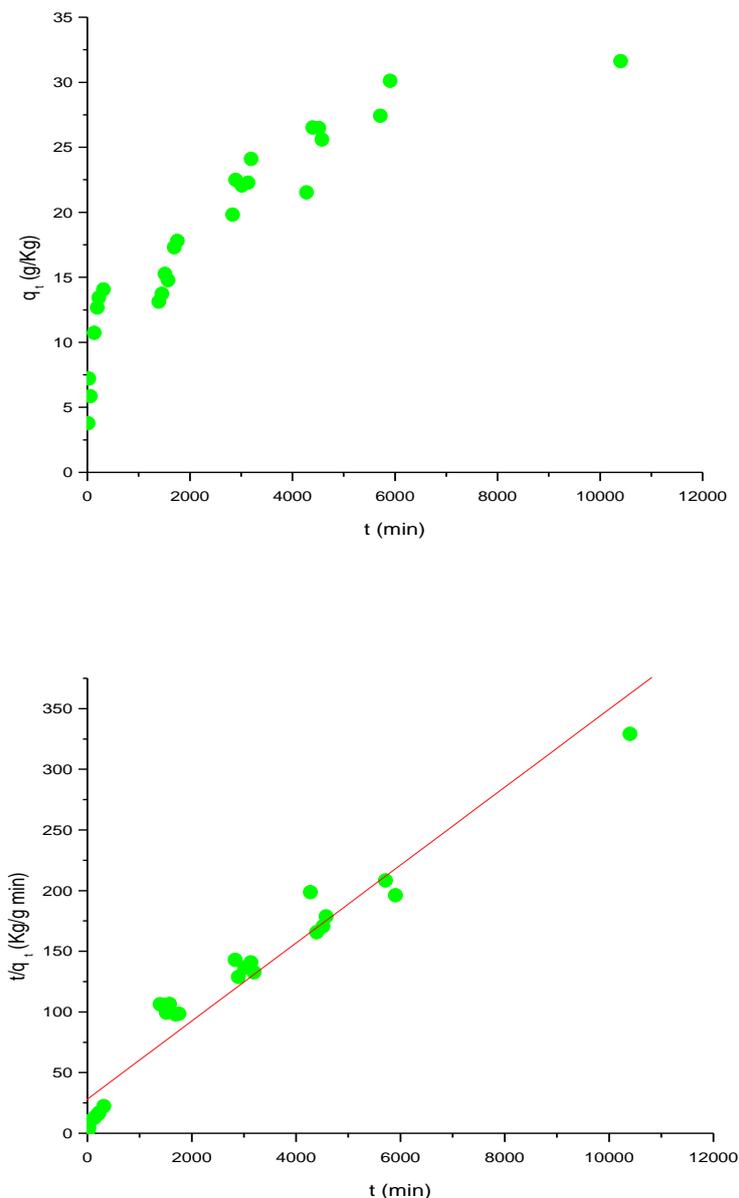


Figura 4.12: Andamenti di q_t (a) e t/q_t (b) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano posti ad equilibrare con una soluzione acquosa di DC di concentrazione pari a $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

Dal *best-fitting* lineare dell'andamento di t/q_t nel tempo si ricavano i parametri q_e (g/Kg) corrispondente alla quantità di DC caricata dagli idrogeli all'equilibrio, e k_2 (Kg/g min) corrispondente alla costante cinetica del processo di *uptake*, rispettivamente dalla pendenza e dall'intercetta sull'asse delle ordinate.

I valori ottenuti per tutto l'intervallo di concentrazioni di DC esplorato sono riportati in Tabella 4.1.

Tabella 4.1: Tabella relativa all '*uptake*' di DC da parte di idrogeli ottenuti da Chit HMW.

Concentrazione di DC (mol/L)	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)
$4 \cdot 10^{-5}$	$8,6 \pm 1,0$	$(1,0 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$
$6 \cdot 10^{-5}$	$11,4 \pm 1,3$	$(6 \pm 3) \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^{-4}$	$17,0 \pm 1,6$	$(3,6 \pm 1,5) \cdot 10^{-5}$
$2 \cdot 10^{-4}$	$31,1 \pm 1,7$	$(3,7 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-4}$	55 ± 7	$(5 \pm 3) \cdot 10^{-6}$
$7 \cdot 10^{-4}$	72 ± 9	$(8 \pm 4) \cdot 10^{-6}$
$9 \cdot 10^{-4}$	79 ± 12	$(6 \pm 4) \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-3}$	76 ± 8	$(1,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$

Dai dati riportati in Tabella 4.1 si evince che il valore di q_e aumenta con l'aumentare della concentrazione della soluzione di farmaco in cui gli idrogeli sono stati posti ad assorbire DC.

L'errore sul q_e è stato calcolato moltiplicando il valore di q_e stesso per l'errore relativo del coefficiente angolare dell'equazione della retta (relazione di pseudo-2°-ordine).

Invece l'errore sulla costante cinetica k_2 è stato calcolato usando la seguente formula:

$$\Delta k_2 = \frac{\Delta A}{A} k_2 + 2k_2 \frac{\Delta q_e}{q_e} \quad [4]$$

dove A rappresenta l'intercetta dell'equazione della retta (relazione di pseudo-2°-ordine).

Riportando in grafico i valori di q_e (g/Kg) in funzione delle concentrazioni in soluzione all'equilibrio C_e (g/m³), si ottiene l'andamento descritto in Figura 4.13 sia su scala lineare (a) sia su scala logaritmica (b).

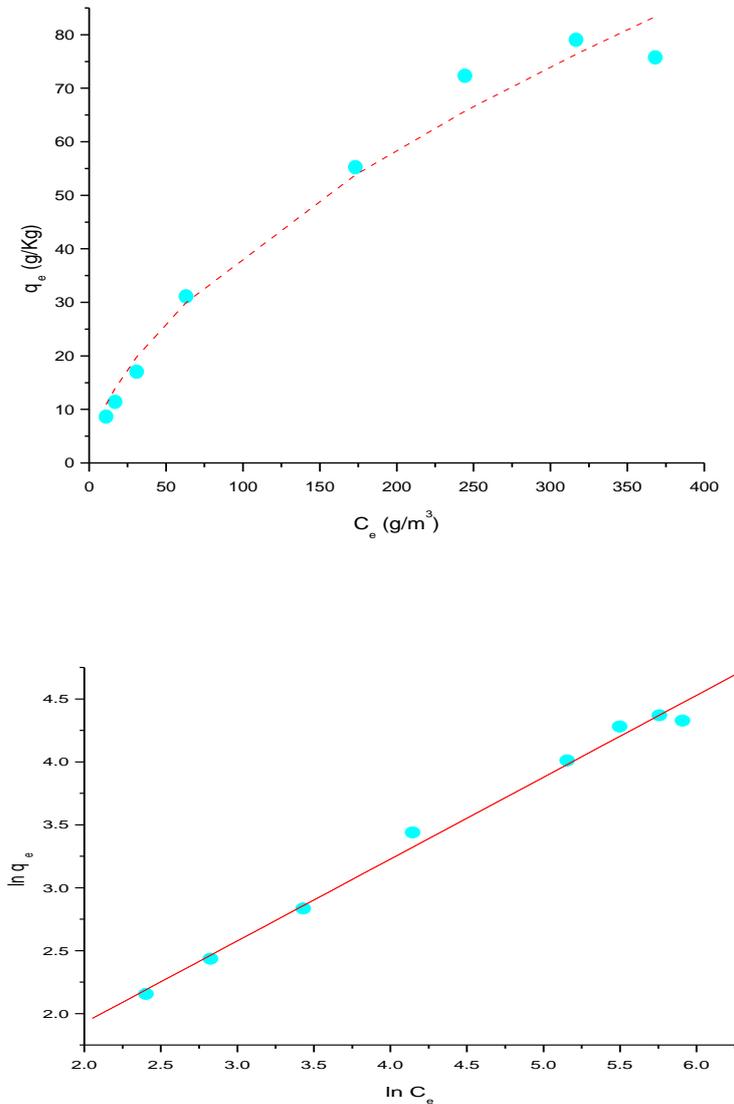


Figura 4.13 Grafico relativo all'isoterma di Freundlich e il suo grafico lineare per l'assorbimento di DC.

L'andamento lineare evidenziato in scala analitica indica che il processo di *uptake* può essere descritto attraverso l'isoterma di Freundlich, la cui espressione è riportata di seguito:

$$\ln q_e = \ln Q_f + \frac{1}{n} \ln C_e$$

[5]

dove Q_f è la costante di Freundlich in $(\text{m}^3/\text{g})^{1/n}(\text{g}/\text{Kg})$ e $1/n$ è un parametro associato all'intensità di assorbimento del sistema in esame.

I valori di Q_f e $1/n$ estrapolati rispettivamente dall'intercetta e dalla pendenza della retta di Figura 4.13b, corrispondono rispettivamente a $1,9 \pm 0,3 (\text{m}^3/\text{g})^{1/n}(\text{g}/\text{Kg})$ e $0,60 \pm 0,02$. L'errore su Q_f è stato calcolato moltiplicando il valore di Q_f stesso per l'errore relativo dell'intercetta dell'equazione della retta (relazione [5]).

Gli studi di rilascio di DC sono stati condotti sugli idrogeli saturati per incubazione con 20 mL di tampone fosfato (PBS) di concentrazione pari a 0,025 mol/L e forza ionica pari a 0,15 mol/L nel tentativo di simulare le condizioni fisiologiche. Anche in questo caso la concentrazione della soluzione di farmaco nella soluzione fisiologica surnatante è stata misurata per via spettroscopica ad intervalli di tempo costanti al massimo di assorbimento di DC. La quantità di antibiotico rilasciata per unità di chitosano (anche in questo caso definita con il parametro q_t) è stata calcolata dalla relazione [2] riportata nel capitolo 3.

In Figura 4.14 sono mostrati gli andamenti di q_t e t/q_t in funzione del tempo registrati per gli idrogeli saturati da soluzioni di DC di concentrazione pari a $5 \cdot 10^{-4}$ e $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

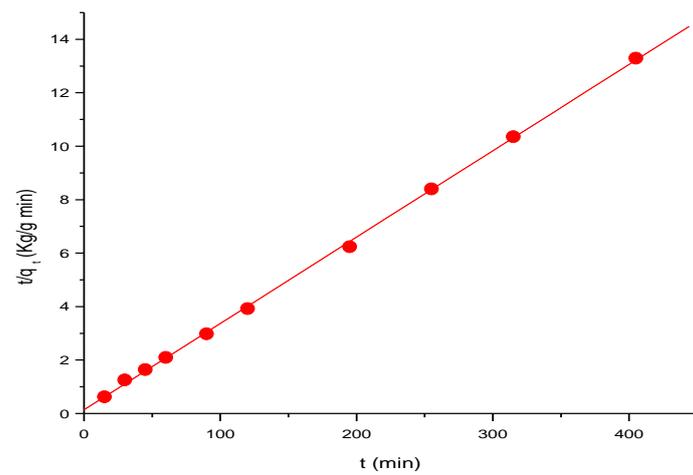
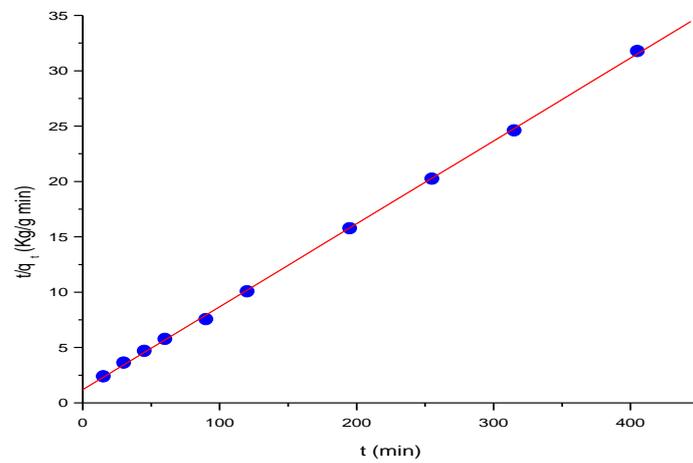
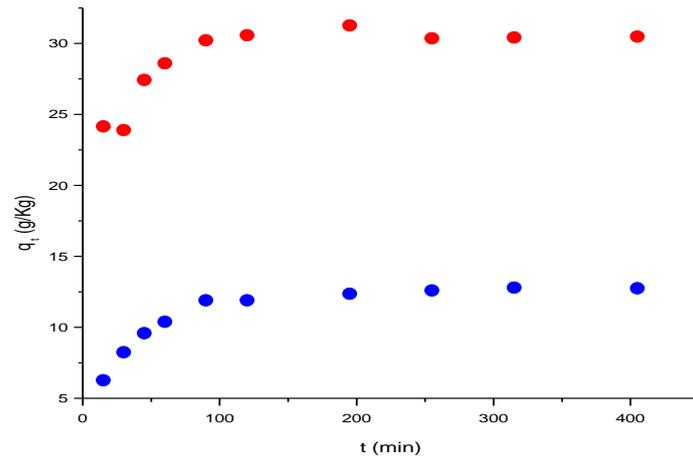


Figura 4.14: Andamenti di q_e (a) e t/q_e (b, c) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano saturati con soluzioni acquose di DC di concentrazione pari a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L (simboli blu) e $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L (simboli rossi) e messi ad equilibrare in tampone PBS.

I valori dei parametri q_e e k_2 per il rilascio di DC, estratti dagli andamenti di Figura 4.14 (b, c) come descritto in precedenza, sono elencati in Tabella 4.2, insieme alla percentuale di rilascio del farmaco, valutata rispetto al valore di q_e di assorbimento, e al tempo di rilascio, espresso in ore.

Tabella 4.2: Parametri di rilascio ottenuti da idrogeli saturati con DC da soluzioni a diversa concentrazione ($5 \cdot 10^{-4}$ e $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L).

Concentrazione (mol/L)	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)	rilascio (%)	tempo di rilascio (h)
$5 \cdot 10^{-4}$	$13,3 \pm 0,1$	$(4,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$	24	1,5
$9 \cdot 10^{-4}$	$31,0 \pm 0,2$	$(8 \pm 3) \cdot 10^{-3}$	39	1,5

Gli idrogeli che hanno assorbito l'antibiotico nella soluzione a concentrazione maggiore ($9 \cdot 10^{-4}$ mol/L) mostrano un valore di q_e di rilascio maggiore rispetto a quelli che hanno assorbito il farmaco nella soluzione a concentrazione minore ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Le costanti cinetiche non presentano differenze significative nei due casi, ma risultano superiori di circa due ordini di grandezza rispetto a quelle di *uptake*. Una percentuale significativa di DC assorbita non viene rilasciata dagli idrogeli.

Partendo da questi risultati, è stato intrapreso lo studio dei fattori influenzanti le potenzialità di questi sistemi come DDS. Ipotizzando che tali fattori siano rappresentati principalmente dalla stabilità alla degradazione degli idrogeli in soluzione acquosa e dalle proprietà molecolari del chitosano, gli esperimenti di *uptake* e rilascio di DC sono stati ripetuti variando i seguenti parametri operativi:

- modalità di conservazione degli idrogeli e tempo di invecchiamento;
- grado di acetilazione del chitosano;
- massa molecolare del polimero.

In relazione al primo punto di indagine, sono stati presi in considerazione due tipi di campioni:

- idrogeli congelati per 15 giorni dopo essere stati saturati con DC per incubazione con soluzioni di antibiotico di concentrazione pari a $5 \cdot 10^{-4}$ e $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L;
- idrogeli invecchiati 3 mesi in acqua a temperatura ambiente.

I grafici relativi alle cinetiche di rilascio dell'antibiotico degli idrogeli congelati sono mostrati in Figura 4.15, mentre i valori dei parametri q_e e k_2 estratti da essi sono elencati in Tabella 4.3.

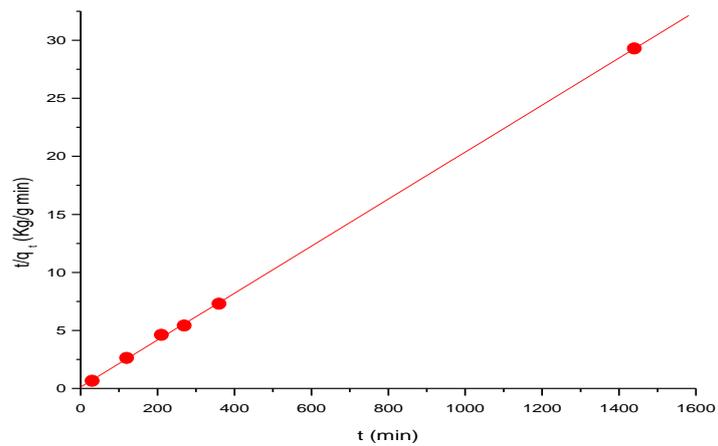
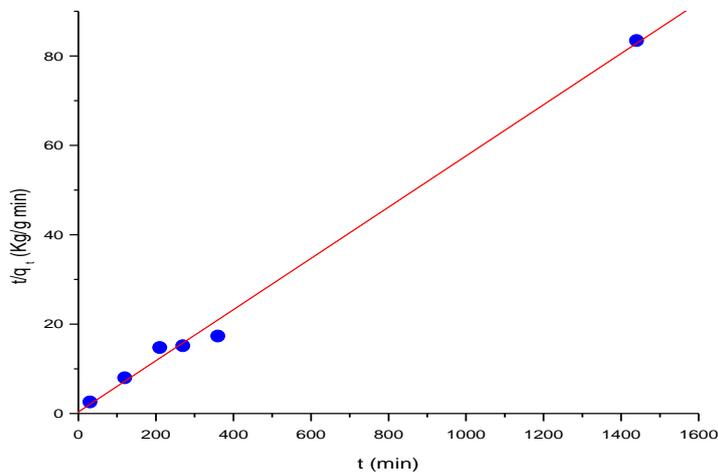
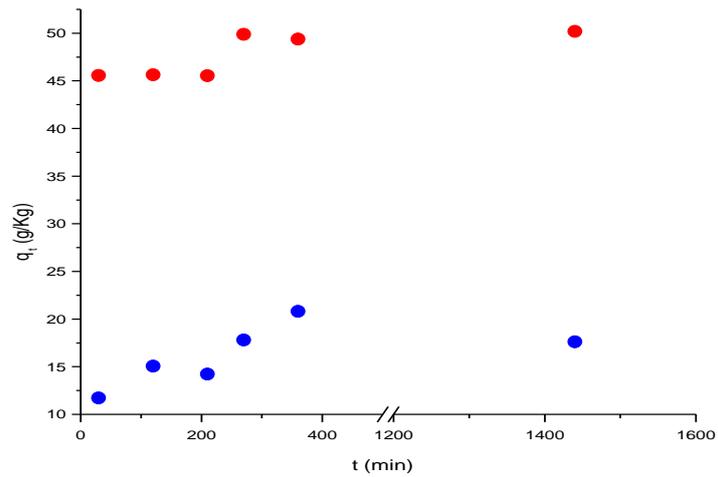


Figura 4.15: Andamenti di q_t (a) e t/q_t (b, c) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano saturati con soluzioni acquose di DC di concentrazione pari a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L (simboli blu) e $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L (simboli rossi) e messi ad equilibrare in tampone PBS dopo essere stati congelati per 15 giorni

Tabella 4.3: Parametri di rilascio ottenuti da idrogeli saturati con DC da soluzioni a diversa concentrazione ($5 \cdot 10^{-4}$ e $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L) e congelati per 15 giorni.

Concentrazione (mol/L)	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)	rilascio (%)	tempo di rilascio (h)
$5 \cdot 10^{-4}$	$17,4 \pm 0,6$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	32	5
$9 \cdot 10^{-4}$	$49,4 \pm 0,3$	$(3,5 \pm 2,8) \cdot 10^{-3}$	62	5

E' evidente che gli idrogeli congelati sono grado di rilasciare maggiori quantità di farmaco e anche in modo più graduale, come testimonia il dato sul tempo di rilascio che triplica il suo valore. L'aumento della quantità di DC rilasciata in termini percentuali è particolarmente significativo per il campione saturato con la soluzione di farmaco più concentrata. Questi risultati possono essere correlati alle modificazioni della morfologia degli idrogeli indotte sia dall'invecchiamento che dal congelamento.

Con l'intento di verificare se anche le proprietà di assorbimento siano influenzate dal grado di invecchiamento di questi sistemi, sono state studiate cinetiche di *uptake* di DC da parte di idrogeli preparati a partire da Chit HMW e conservati per tre mesi in acqua a temperatura ambiente e quindi invecchiati.

Successivamente sono state quindi studiate cinetiche di assorbimento di DC a partire da soluzioni di concentrazione pari a $2 \cdot 10^{-4}$ e $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L da parte di idrogeli preparati a partire da Chit HMW ed invecchiati tre mesi in acqua. I grafici delle cinetiche di assorbimento e i parametri da essi estratti sono riportati in Figura 4.16 e Tabella 4.4, rispettivamente.

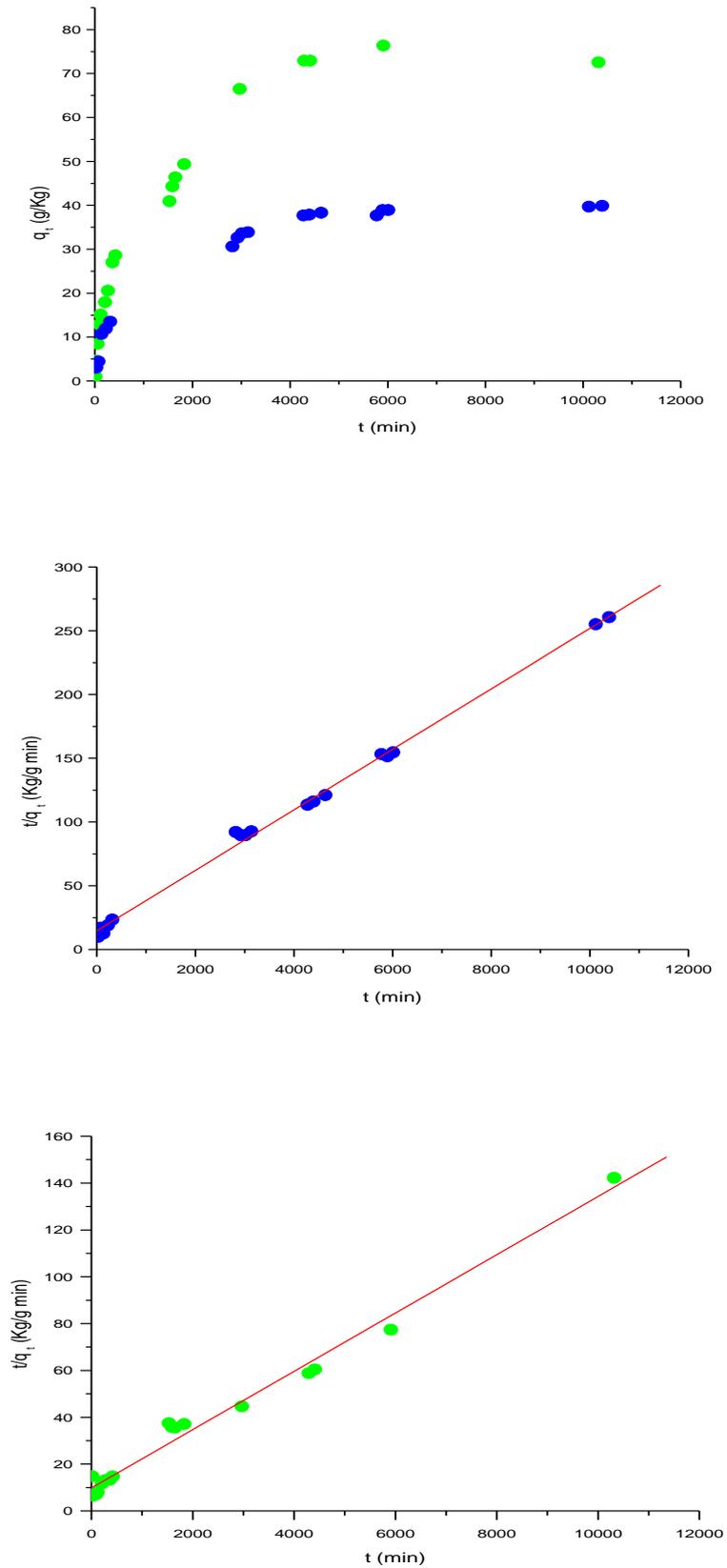


Figura 4.16: Andamenti di q_t (a) e t/q_t (b, c) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano invecchiati 3 mesi in acqua e posti ad equilibrare con soluzioni acquose di DC di concentrazione pari a $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L (simboli blu) e $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L (simboli verdi).

Tabella 4.4: Parametri di *uptake* ottenuti da idrogeli invecchiati in acqua per tre mesi e saturati con DC da soluzioni a diversa concentrazione ($2 \cdot 10^{-4}$ e $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L).

Concentrazione (mol/L)	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)
$2 \cdot 10^{-4}$	$42,2 \pm 0,6$	$(3,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-4}$	80 ± 3	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$

A parità di concentrazione della soluzione in cui gli idrogeli sono stati posti ad assorbire il farmaco, si osserva, rispetto agli idrogeli freschi, un aumento del valore di q_e che risulta più significativo per il campione messo ad equilibrare con la soluzione di DC più concentrata. Questo esperimento, che si basa sulla variabile del tempo di invecchiamento, fornisce risultati in linea con quelli derivanti dagli idrogeli congelati.

Per quel che riguarda invece lo studio dell'influenza esercitata dalle proprietà molecolari del chitosano, il lavoro sperimentale è proseguito con la produzione di chitosani a diverso grado di acetilazione, che sono stati successivamente utilizzati per la realizzazione di una nuova serie di idrogeli. Per la deacetilazione progressiva del chitosano da prodotto commerciale è stato seguito il seguente protocollo [38]:

- *primo ciclo:* 0,9 g di chitosano MMW (Fluka, $1,4 \cdot 10^6$ g/mol, grado di acetilazione: 44,91%) sono stati aggiunti a 300 mL di NaOH 47% w/v in acqua bidistillata; la miscela è stata posta in stufa ad 80 °C per un'ora e posta a decantare a temperatura ambiente. Una volta eliminato il surnatante, il precipitato è stato lavato con acqua bidistillata calda fino a neutralità delle acque di lavaggio. In questo modo è stato ottenuto il primo campione di chitosano deacetilato (**deac1**).
- *Secondo ciclo:* circa 0,6 g di **deac1** sono stati sottoposti ad un secondo ciclo di trattamento secondo le modalità descritte in precedenza. In questo modo è stato ottenuto il secondo campione di chitosano deacetilato (**deac2**).
- *Terzo ciclo:* circa 0,3 g di **deac2** sono stati sottoposti ad un terzo ciclo di trattamento secondo le modalità descritte in precedenza. In questo modo è stato ottenuto il terzo campione di chitosano deacetilato (**deac3**).

Una volta preparati, i tre campioni di chitosano deacetilato sono stati caratterizzati come polveri tramite spettroscopia FTIR, utilizzando uno spettrofotometro Bruker Vertex 70, operante in

modalità DRIFT, insieme al prodotto MMW commerciale. A titolo di esempio, in Figura 4.17 è riportato lo spettro ricavato dal campione MMW, in cui sono stati evidenziati 3 segnali caratteristici corrispondenti a [6, 39]:

- 3450 cm^{-1} : vibrazione di stretching del legame O-H;
- 1655 cm^{-1} : vibrazione di stretching del carbonile dell'ammide del residuo di 2-acetil-D-glucosammina;
- 1542 cm^{-1} : vibrazione di bending dell'ammina primaria del residuo di 2-D-glucosammina.

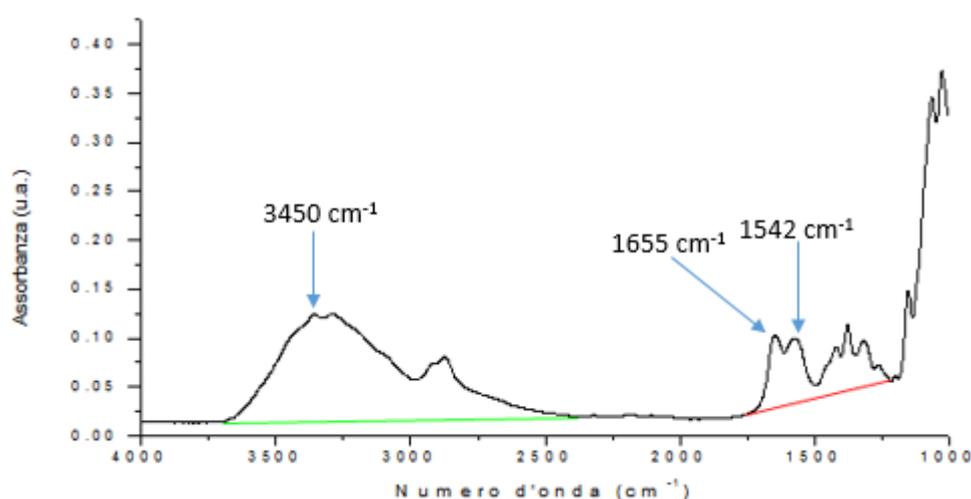


Figura 4.17: Spettro FTIR del campione di chitosano MMW in polvere con indicazione delle linee di base (in rosso ed in verde) utilizzate per la determinazione delle intensità dei segnali.

In Figura 4.18 sono invece riportati gli spettri FTIR (acquisiti in modalità DRIFT) relativi ai quattro campioni di chitosano (controllo e i tre deacetilati).

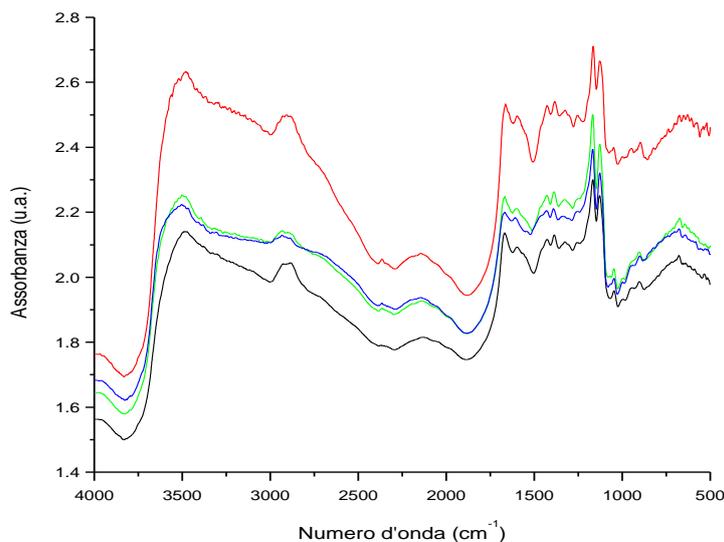


Figura 4.18 Spettri FTIR, acquisiti in modalità DRIFT, relativi ai quattro campioni di chitosano esaminati: MMW commerciale (nero), deac1 (rosso), deac2 (verde) e deac3(blu).

Dal confronto dei profili spettrali è stato osservato che l'intensità relativa dei segnali a 1655 cm^{-1} e 1542 cm^{-1} variava per i diversi campioni in funzione del numero di cicli di trattamenti subiti. Partendo da tale osservazione e utilizzando l'intensità del segnale a 3450 cm^{-1} come standard interno, è stato determinato il rapporto tra l'intensità del segnale dell'ammide e quella del segnale dell'ammina primaria rispetto alla linea di base rossa indicata nello spettro. I valori calcolati, riportati in Tabella 4.5, evidenziano un andamento decrescente di questo parametro passando dal campione commerciale ai campioni **deac1**, **deac2** e **deac3**, sottoposti ad un numero crescente di cicli di deacetilazione. Tali decrementi possono essere correlati ad un graduale aumento del numero di residui di 2-D-glucosammina in catena derivanti dall'idrolisi di residui di 2-acetil-D-glucosammina, confermando così indirettamente l'avvenuta progressiva deacetilazione del polisaccaride di partenza.

Tabella 4.5: Andamento del rapporto di intensità dei segnali a 1655 cm^{-1} e 1542 cm^{-1} per campioni di chitosano a diverso grado di deacetilazione.

campione di chitosano	$I(1655\text{ cm}^{-1})/ I(1542\text{ cm}^{-1})$
MMW	1,22
Deac1	1,17
Deac2	1,15
Deac3	1,11

Una volta ottenuti, i campioni deac1 e deac3 sono stati solubilizzati in soluzione acetica (2% w/v) e impiegati per la preparazione di idrogeli per classico sgocciolamento in miscela di EtOH:NH₃:H₂O 7:2:1 v/v. Su tali idrogeli sono state effettuate prove di *uptake* e di rilascio di DC nelle stesse condizioni sperimentali adottate per gli idrogeli derivanti da chitosano commerciale. Le prove di *uptake* sono state effettuate in soluzioni di DC di concentrazione $1\ 10^{-3}\text{ mol/L}$.

I grafici delle cinetiche di assorbimento e di rilascio sono riportati in Figura 4.19 e Figura 4.20, rispettivamente. In Tabella 4.6 sono riportati i valori dei parametri q_e e k_2 ottenuti per entrambi i DDS.

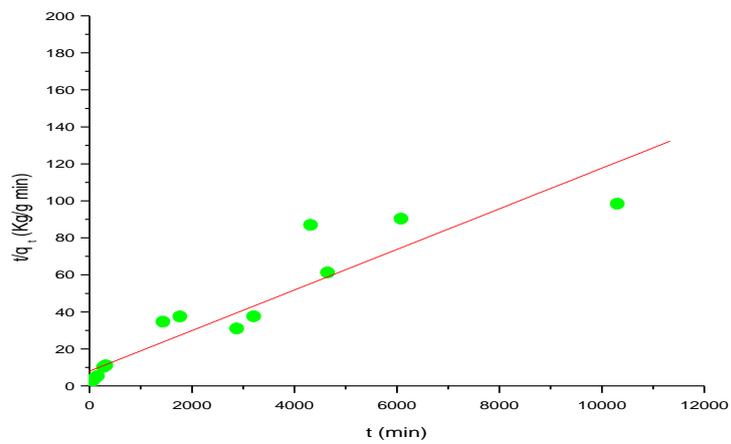
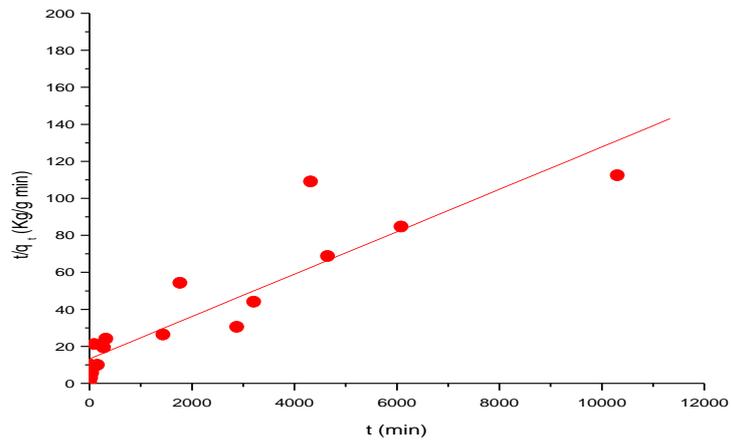
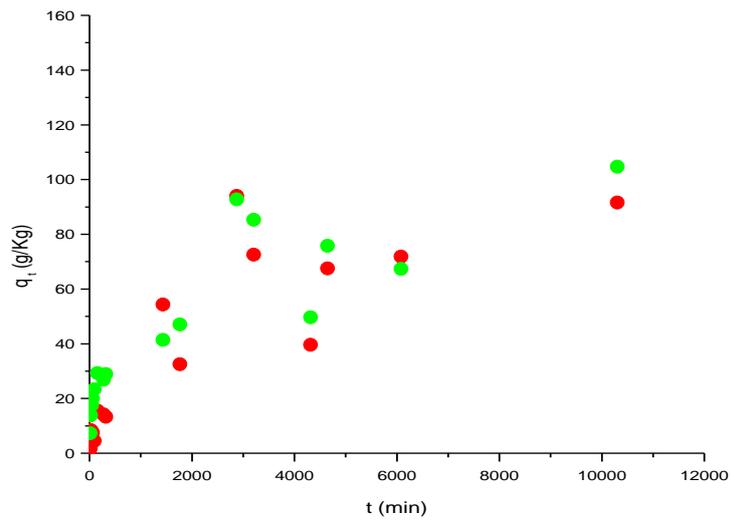


Figura 4.19: Andamenti di q_t (a) e t/q_t (b, c) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano deacetilato posti ad equilibrare con soluzioni acquose di DC di concentrazione pari a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L; deac1 (simboli rossi) e deac3 (simboli verdi).

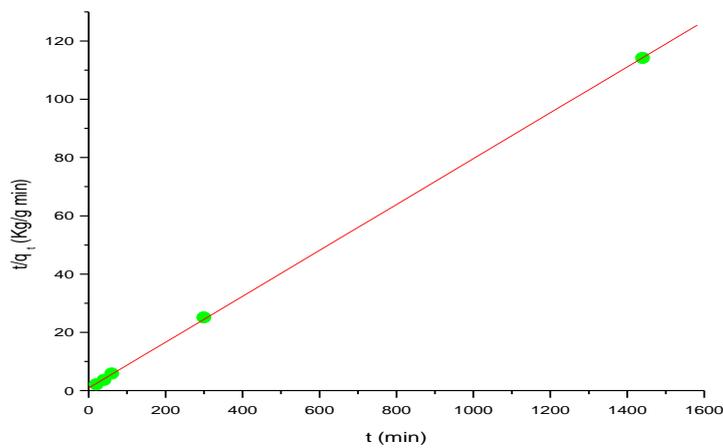
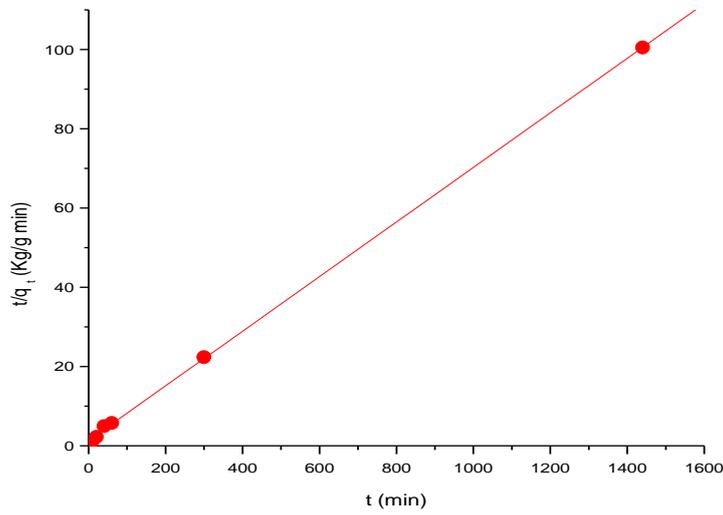
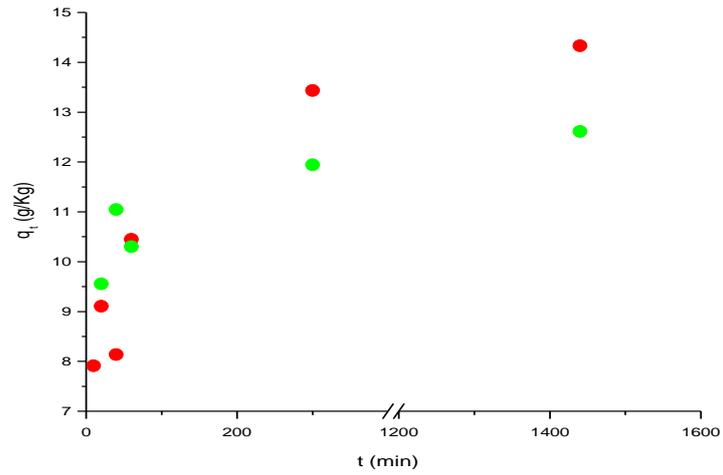


Figura 4.20: Andamenti di q_t (a) e t/q_t (b, c) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano deacetilato saturati con DC e posti ad equilibrare in tampone PBS; deac1 (simboli rossi) e deac3 (simboli verdi).

Tabella 4.6: Parametri di equilibrio (q_e) e cinetici (k_2) associati all'assorbimento e al rilascio di DC da parte di idrogeli di chitosano deacetilato.

campione	processo	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)	rilascio (%)	tempo di rilascio (h)
Deac1	assorbimento	87 ± 10	$(1,0 \pm 0,6) 10^{-5}$		
Deac3	assorbimento	91 ± 9	$(1,5 \pm 1,1) 10^{-5}$		
Deac1	rilascio	$14,5 \pm 0,1$	$(3,5 \pm 0,8) 10^{-3}$	16	5
Deac3	rilascio	$12,7 \pm 0,1$	$(7 \pm 2) 10^{-3}$	14	5

I dati riportati in Tabella 4.6 non evidenziano differenze di comportamento per i due campioni, nonostante il loro diverso grado di acetilazione, sia in fase di *uptake* di DC sia in fase di rilascio.

Dal confronto con i dati riportati nelle Tabelle 4.1 e 4.2 per idrogeli derivanti da chitosano commerciale non trattato e messi ad equilibrare con soluzioni di DC di concentrazione comparabile ($9 \cdot 10^{-4}$ o $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L), si osservano in fase di *uptake* leggeri incrementi di q_e non significativi se si tiene conto dell'errore sperimentale associato a tali misure, e sostanziale invarianza per i valori di k_2 ; mentre più rilevanti appaiono le differenze riscontrate in fase di rilascio, in quanto gli idrogeli ottenuti da chitosano deacetilato sembrano in grado di rilasciare una quantità di farmaco pari a circa la metà rispetto ad idrogeli non trattati, in intervalli di tempo almeno triplicati. Tale risultato potrebbe essere spiegato ipotizzando l'esistenza di interazioni specifiche che si vengono ad instaurare tra l'antibiotico ed i residui amminici del polisaccaride che trattengono il farmaco all'interno del DDS. Le costanti cinetiche di rilascio risultano maggiori di circa due ordini di grandezza rispetto a quelle di *uptake*.

Per completare lo studio dell'influenza delle proprietà molecolari del chitosano sulle capacità di *uptake* e rilascio degli idrogeli, sono stati preparati campioni di chitosano a massa molecolare ridotta, dal momento che i prodotti commerciali a nostra disposizione non presentano differenze significative di questo parametro. Per la degradazione della massa molecolare del polisaccaride è stata scelta una reazione di idrolisi acida, secondo un protocollo messo a punto in una tesi precedente [34] riportato di seguito:

- 2 g di chitosano commerciale (Chit MMW) sono stati solubilizzati in beuta con 200 mL di una soluzione acquosa di HCl 0,6 mol/L e mantenuti in bagno d'acqua a 80°C (100 mL per un'ora, e i restanti 100 mL per due ore);
- i campioni trattati sono stati raffreddati sotto acqua corrente, precipitati per aggiunta della miscela basica EtOH/NH₃/H₂O 7:2:1 v/v;
- i precipitati sono stati lavati con EtOH fino a neutralità e poi essiccati in stufa a 50°C sotto vuoto.

In questo modo sono stati ottenuti due campioni di chitosano a massa molecolare ridotta, che sfortunatamente non hanno portato alla formazione di idrogeli per sgocciolamento probabilmente perché il processo di degradazione adottato è risultato troppo spinto. Di conseguenza, questa linea di ricerca è stata interrotta e non si è nemmeno proceduto alla determinazione della massa molecolare dei campioni di chitosano degradato per via viscosimetrica.

4.2.3 Uptake e rilascio di TC da parte di idrogeli di chitosano

Per lo studio dell'*uptake* e del rilascio del Triamcinolone acetone (TC) è stato seguito lo stesso protocollo messo a punto per l'antibiotico DC, eccezion fatta per quel che riguarda il mezzo solvente. Infatti, tenendo in considerazione i risultati riportati nel paragrafo 4.1.2 relativi alla solubilità di TC in soluzioni idroalcoliche, gli esperimenti di *uptake* sono stati condotti da soluzioni in etanolo, mentre gli esperimenti di rilascio sono stati portati avanti in miscela di PBS:EtOH al 50% v/v.

Su idrogeli freschi preparati da Chit HMW sono stati condotti esperimenti di *uptake* con sette soluzioni a diversa concentrazione di TC (da $5 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L). A titolo di esempio, in Figura 4.21 sono mostrati gli andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t ricavati dagli idrogeli messi ad equilibrare con una soluzione di TC di concentrazione pari a $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L. I grafici relativi alle altre soluzioni sono riportati in Appendice.

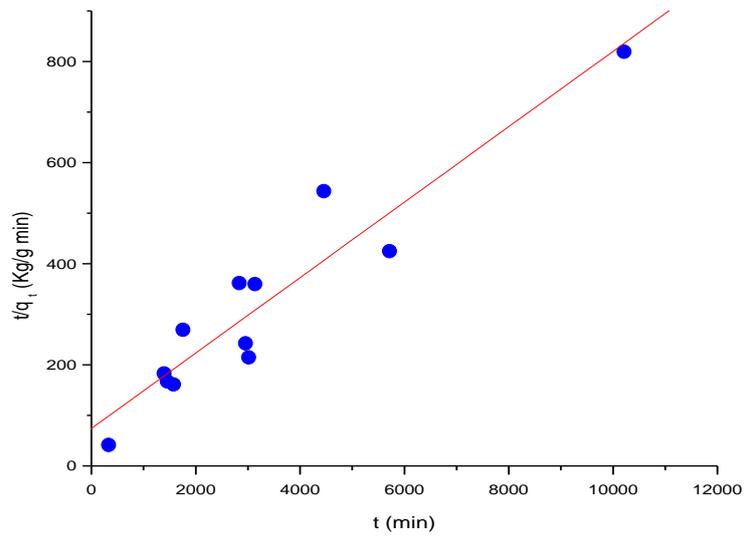
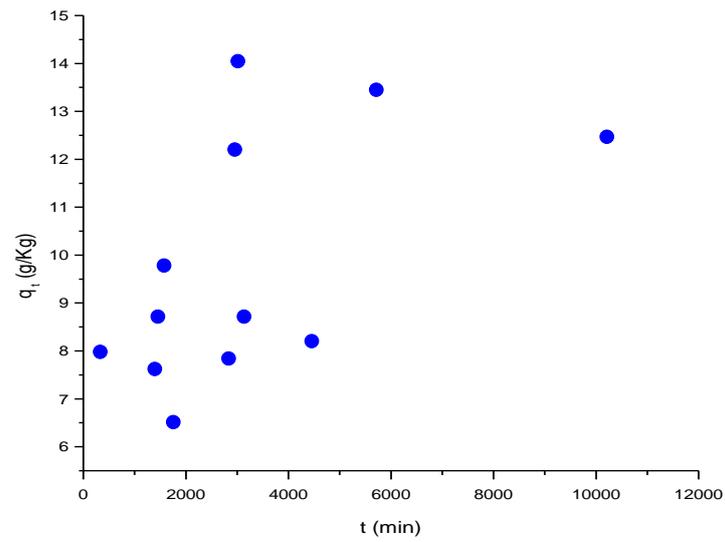


Figura 4.21: Andamenti di q_t (a) e t/q_t (b) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano posti ad equilibrare con una soluzione alcolica di TC di concentrazione pari a $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

I parametri di equilibrio (q_e) e cinetici (k_2) ottenuti per tutto l'intervallo di concentrazioni di TC esplorato sono riportati in Tabella 4.7.

Tabella 4.7: Tabella relativa all'uptake di TC da parte di idrogeli ottenuti da Chit HMW.

Concentrazione (<i>mol/L</i>)	q_e (<i>g/Kg</i>)	k_2 (<i>Kg/g min</i>)
$5,0 \cdot 10^{-5}$	8 ± 2	$(8,2 \pm 7,2) \cdot 10^{-5}$
$7,5 \cdot 10^{-5}$	$9,1 \pm 2,4$	$(4,6 \pm 4,3) \cdot 10^{-5}$
$1,0 \cdot 10^{-4}$	8 ± 3	$(4,9 \pm 6,0) \cdot 10^{-5}$
$2,0 \cdot 10^{-4}$	$13,1 \pm 1,6$	$(6,1 \pm 4,1) \cdot 10^{-5}$
$3,0 \cdot 10^{-4}$	$13,4 \pm 1,5$	$(7,5 \pm 5,1) \cdot 10^{-5}$
$4,0 \cdot 10^{-4}$	$12,6 \pm 1,2$	$(1,0 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$
$5,0 \cdot 10^{-4}$	13 ± 1	$(3,2 \pm 2,4) \cdot 10^{-4}$

Dal confronto con i dati riportati in Tabella 4.1 relativi all'uptake di DC da parte degli stessi idrogeli in condizioni sperimentali comparabili, si osserva una ridotta capacità di questi sistemi di assorbire TC. Inoltre, non si riscontra dipendenza sostanziale del valore di q_e dalla concentrazione della soluzione di farmaco, diversamente da quanto verificato per l'uptake di DC.

Riportando in grafico i valori di q_e (*g/Kg*) in funzione delle concentrazioni in soluzione all'equilibrio C_e (g/m^3), si ottiene l'andamento descritto in Figura 4.22 sia su scala lineare (a) sia su scala logaritmica (b).

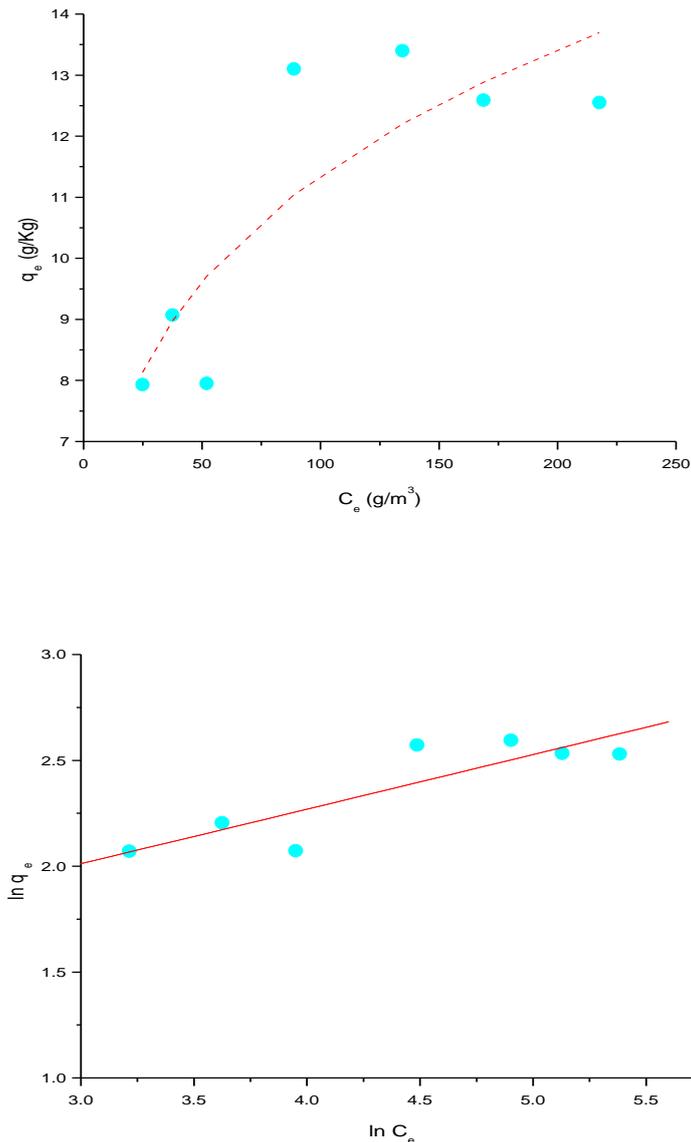


Figura 4.22 Grafico relativo all'isoterma di Freundlich e il suo grafico lineare per l'assorbimento di TC.

L'andamento lineare evidenziato in scala analitica suggerisce che il processo di *uptake* può essere descritto attraverso l'isoterma di Freundlich. I valori di Q_f e $1/n$ estrapolati rispettivamente dall'intercetta e dalla pendenza della retta di Figura 4.22b, corrispondono rispettivamente a $3,4 \pm 0,8$ (m³/g)^{1/n}(g/Kg) e $0,26 \pm 0,06$. Rispetto ai valori calcolati per l'*uptake* di DC, il parametro Q_f risulta quasi raddoppiato, mentre il parametro $1/n$ è ridotto a meno della metà.

Gli studi di rilascio di TC sono stati condotti sugli idrogeli saturati in miscela di PBS:EtOH al 50% v/v nel tentativo di simulare le condizioni fisiologiche. Anche in questo caso la concentrazione della soluzione di farmaco nella soluzione fisiologica surnatante è stata misurata per via spettroscopica ad intervalli di tempo costanti al massimo di assorbimento di TC. La quantità di cortisonico rilasciata

per unità di chitosano (anche in questo caso definita con il parametro q_t) è stata calcolata dalla relazione [2] riportata nel capitolo 3.

In Figura 4.23 è riportata, a titolo di esempio, una cinetica di desorbimento di TC in miscela di PBS:EtOH al 50%, da parte di idrogeli che hanno preventivamente assorbito il farmaco in una soluzione 1 mmol/L in etanolo. I valori dei parametri q_e e k_2 ottenuti sono riportati in Tabella 4.8.

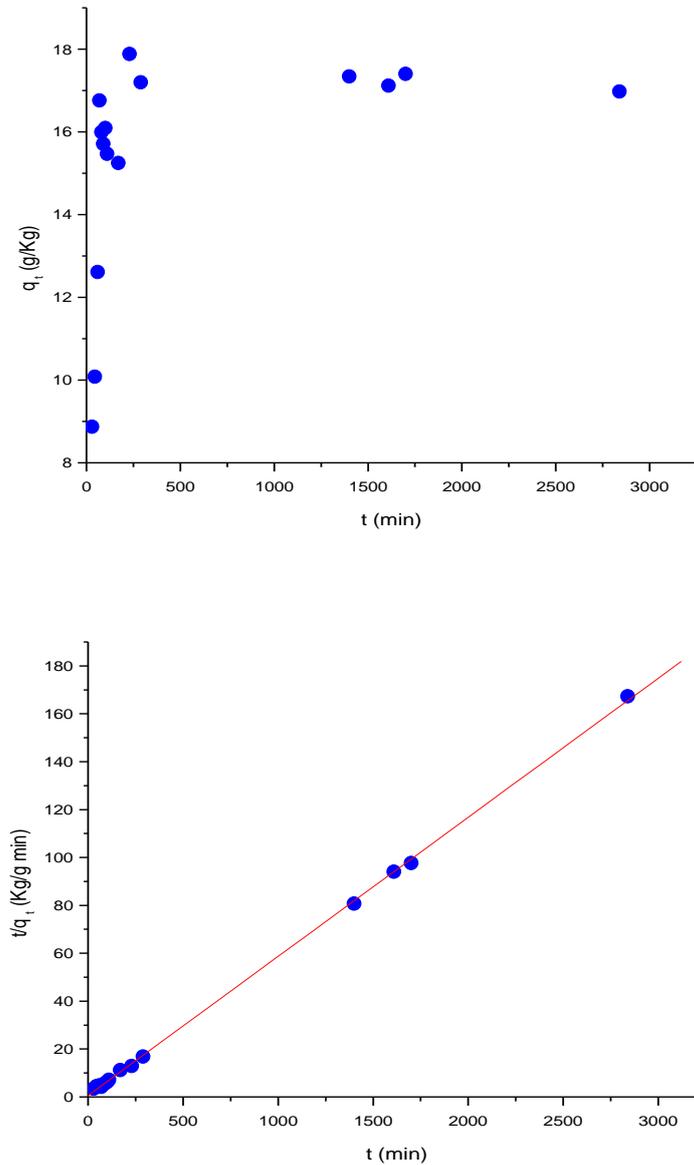


Figura 4.23: Andamenti di q_t (a) e t/q_t (b) in funzione del tempo per idrogeli di chitosano saturati con una soluzione alcolica di TC di concentrazione pari a 1 mmol/L e messi ad equilibrare in miscela di PBS:EtOH al 50% v/v.

Tabella 4.8: Parametri di equilibrio (q_e) e cinetici (k_2) associati all'assorbimento e al rilascio di TC da parte di idrogeli di chitosano.

Farmaco	processo	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)	rilascio (%)	tempo di rilascio (h)
TC	assorbimento	$12,1 \pm 0,6$	$(1,9 \pm 0,1) 10^{-4}$		
TC	rilascio	$17,2 \pm 0,1$	$(6 \pm 3) 10^{-3}$	~ 100	1

Gli idrogeli di chitosano assorbono quantità inferiori di TC rispetto a DC, anche se in tempi più rapidi. Per contro, il rilascio del cortisonico risulta quantitativamente più rilevante. La discordanza dei valori di q_e trovata per TC in fase di assorbimento e di rilascio, fisicamente non giustificabile, è da attribuirsi probabilmente ad errori sperimentali correlabili a parziale evaporazione del solvente. Da sottolineare in questo tipo di DDS che la costante cinetica di rilascio è incrementata almeno di un ordine di grandezza rispetto a quella di assorbimento per entrambi i farmaci.

4.3 Preparazione e caratterizzazione di film di chitosano come dispositivi per il rilascio controllato di DC e TC

Il lavoro sperimentale è proseguito con la preparazione di film di chitosano commerciale per *casting* nell'intento di ottenere sistemi maneggevoli e di conseguenza più facilmente inseribili nella tasca parodontale. La stabilità alla dissoluzione/degradazione dei film in soluzione acquosa è stata incrementata per trattamento in soluzione alcalina e successiva reticolazione con il diepossido EGDE.

4.3.1 Preparazione di film di chitosano

Al fine di valutare l'influenza della tipologia del DDS sulle capacità del chitosano di agire come veicolante di DC e TC sono stati preparati film di chitosano commerciale per *casting* procedendo come indicato di seguito:

- 3 mL di soluzione acetica di chitosano a diversa concentrazione sono stati depositati in una capsula di Petri di 4 cm di diametro e lasciati ad essiccare in stufa a 35 °C sotto vuoto fino a completa evaporazione del solvente.

- Successivamente, i film sono stati staccati dalla capsula Petri e posti per 15 minuti in una miscela di EtOH:NH₃:H₂O (7:2:1 v/v), capace di rendere i film di chitosano insolubili in acqua per deprotonazione dei gruppi amminici superficiali. Per aumentarne l'insolubilità ed impedire così la loro frantumazione in acqua, alcuni film sono stati reticolati con il di-epossido etilenglicoldiglicidil etero (EGDE), capace di reagire sia con i sostituenti amminici sia con i gruppi idrossilici del polisaccaride, la cui struttura chimica è riportata in Figura 4.24 [34].

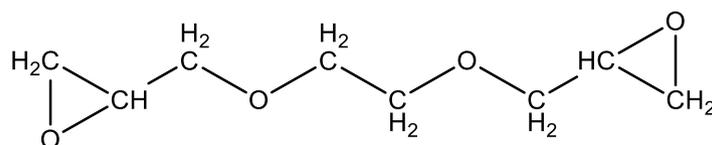


Figura 4.24: Formula chimica del reticolante epossidico EGDE.

- Una volta preparati, i film sono stati essiccati, pesati e ne è stato misurato lo spessore.

Sono stati preparati film partendo da soluzioni di chitosano a diversa concentrazione (2%, 2,5%, 3% w/v in ambiente acetico) allo scopo di ottenere film a diversa densità e investigare così l'influenza di tale parametro sulla capacità dei film di chitosano di assorbire/rilasciare i farmaci.

In Tabella 4.9 sono riportati i dati misurati (peso, spessore) e calcolati (densità) per ciascuno dei film preparati.

Tabella 4.9: Peso, spessore e densità dei film di chitosano preparati da soluzioni del polisaccaride a diversa concentrazione.

Campione	concentrazione chitosano MMW (% w/v)	peso (g)	spessore film (mm)	densità (g/cm ³)
Film 1	2,0	0,056	0,07 ± 0,01	0,57
Film 2	2,5	0,062	0,08 ± 0,02	0,76
Film 3	3	0,082	0,06 ± 0,02	0,80

All'aumentare della concentrazione della soluzione di partenza si ottengono film di densità maggiore e quindi presumibilmente aventi una percentuale inferiore di spazi vuoti all'interno. In Figura 4.25 è riportato un tipico film di chitosano ottenuto per *drop-casting* a seguito dell'evaporazione del solvente ottenuto da una soluzione del polisaccaride di concentrazione pari a 2% w/v.

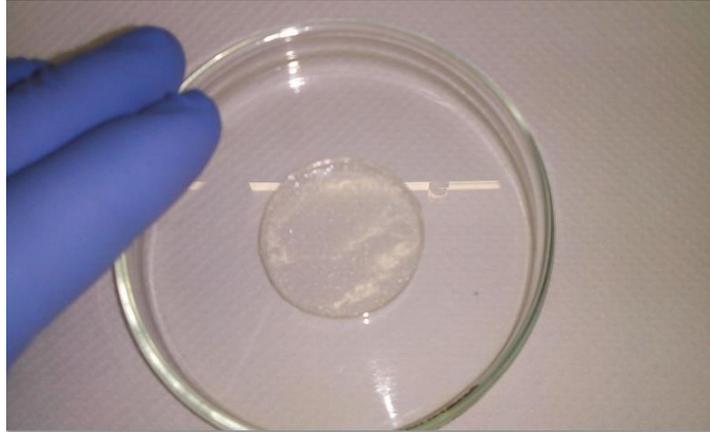


Figura 4.25: Tipico film di chitosano ottenuto per *drop-casting* da una soluzione del polisaccaride di concentrazione pari a 2% w/v.

4.3.2 Uptake e rilascio di DC da parte di film di chitosano

I film di chitosano sono stati inizialmente testati con l'antibiotico DC. A titolo di esempio, in Figura 4.26 sono riportati gli andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t ricavati da un film di chitosano MMW reticolato con EGDE messo ad equilibrare con una soluzione acquosa di DC 1 mmol/L. In Figura 4.27 sono invece riportati gli andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t del film reticolato con DC e messo ad equilibrare in tampone PBS.

In dettaglio gli esperimenti di *uptake* sono stati condotti ponendo ad incubare in 5 mL di soluzione acquosa di DC una porzione del film di peso secco grossomodo corrispondente a quello di 25 idrogeli secchi.

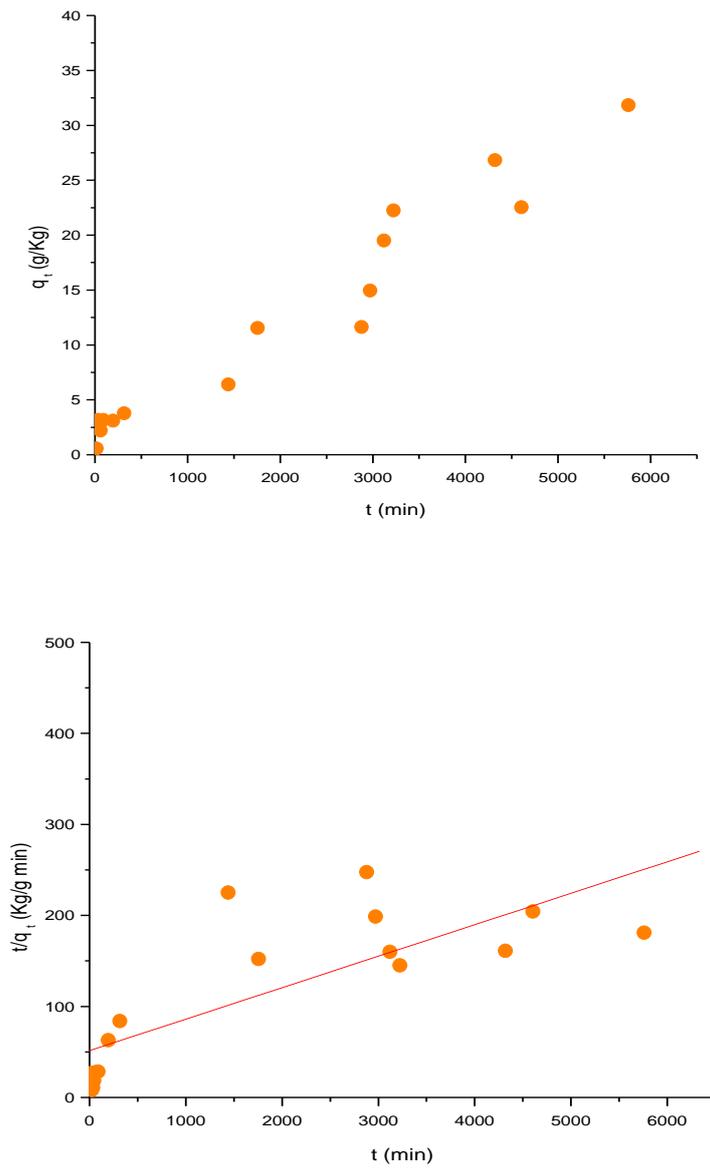


Figura 4.26: Andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t ricavati da un film di chitosano reticolato con EGDE messo ad equilibrare con una soluzione di DC di concentrazione pari a 1 mmol/L.

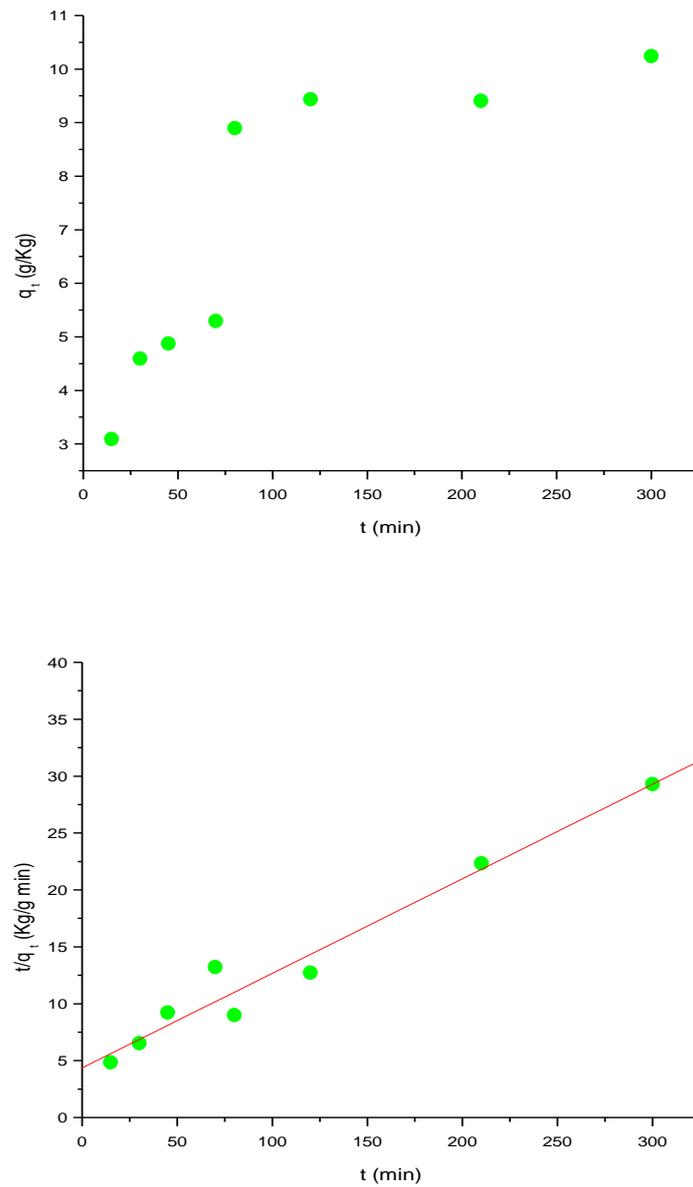


Figura 4.27: Andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t del film reticolato con DC e messo ad equilibrare in PBS.

In Tabella 4.10 sono riportati i valori di q_e e k_2 per l'*uptake* e il rilascio di DC ottenuti per il film di chitosano a media massa molecolare ricavato da una soluzione del polisaccaride al 2% w/v e reticolato con EGDE.

Tabella 4.10: Parametri di equilibrio (q_e) e cinetici (k_2) associati all'*uptake* e al rilascio di DC da parte di un film di chitosano reticolato con EGDE e ottenuto da una soluzione al 2% w/v del campione commerciale MMW.

Processo	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)	rilascio (%)	tempo di rilascio (h)
Uptake	29 ± 6	$(2,3 \pm 1,7) 10^{-5}$		
Rilascio	12 ± 1	$(1,6 \pm 0,6) 10^{-3}$	40	2

Il chitosano sotto forma di film è in grado di assorbire una quantità inferiore di farmaco rispetto agli idrogeli, a parità di concentrazione della soluzione di DC ove è avvenuto l'assorbimento, probabilmente a causa della ridotta superficie di DDS esposta a contatto con la soluzione di DC. Le modalità di rilascio dell'antibiotico non risultano variate in modo sostanziale. Tali risultati possono essere giustificati ipotizzando che DC venga semplicemente adsorbita sul film e non riesca a diffondere all'interno dello stesso. Tale supposizione è suffragata dal fatto che i film messi ad equilibrare con una soluzione acquosa di DC, se lasciati esposti alla radiazione solare, assumono dopo 4-5 giorni la colorazione bruna tipica della Doxiciolina ossidata e non più farmacologicamente attiva [32].

In Figura 4.28 sono riportate due immagini relative al film reticolato con EGDE messo ad adsorbire DC in acqua (1 mmol/L): la prima immagine (a) scattata quattro giorni dopo aver messo il pezzo di film ad adsorbire l'antibiotico in soluzione, la seconda immagine (b) relativa allo stesso campione dopo otto giorni.

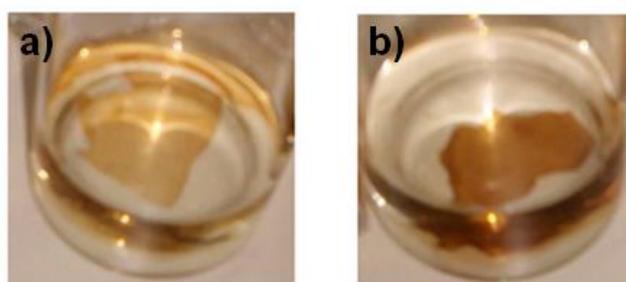


Figura 4.28: DC adsorbita su di un film reticolato: a) dopo 4 giorni; b) dopo 8 giorni.

Partendo da tale presupposto, il protocollo di preparazione dei film e *uptake* di DC è stato modificato per agevolare l'inglobamento del farmaco anche all'interno del film polimerico. In dettaglio si è proceduto come segue:

- 3 mL di soluzione acetica contenente chitosano a diversa concentrazione e farmaco a titolo noto sono stati depositati in una capsula di Petri di 4 cm di diametro e lasciati ad essiccare in stufa a 35 °C sotto vuoto fino a completa evaporazione del solvente.
- Successivamente, i film sono stati staccati dalla capsula Petri e posti per 15 minuti in una miscela di EtOH:NH₃:H₂O (7:2:1 v/v) con DC in concentrazione pari a quella dell'antibiotico nella soluzione polimerica iniziale per evitare fenomeni di diffusione del farmaco dal film all'ambiente esterno, e capace di rendere i film di chitosano insolubili in acqua per deprotonazione dei gruppi amminici superficiali.
- Una volta preparati ed essiccati i film, ne è stata prelevata una porzione che è stata pesata e poi incubata in tampone PBS per effettuare gli studi di rilascio del farmaco secondo le metodiche descritte nell'Introduzione.

In Figura 4.29 e 4.30 sono riportati gli andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t per DC ottenuti su film di chitosano preparati da soluzioni contenenti polisaccaride in percentuale variabile da 2% a 3% w/v e DC in concentrazione pari a 1 o 2 mmol/L e messi ad equilibrare in PBS.

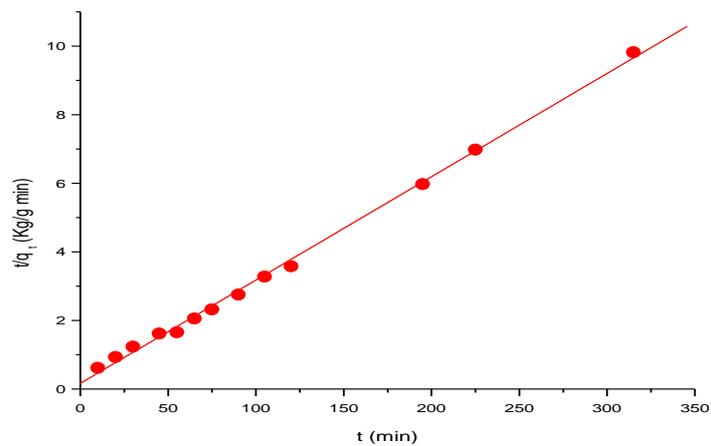
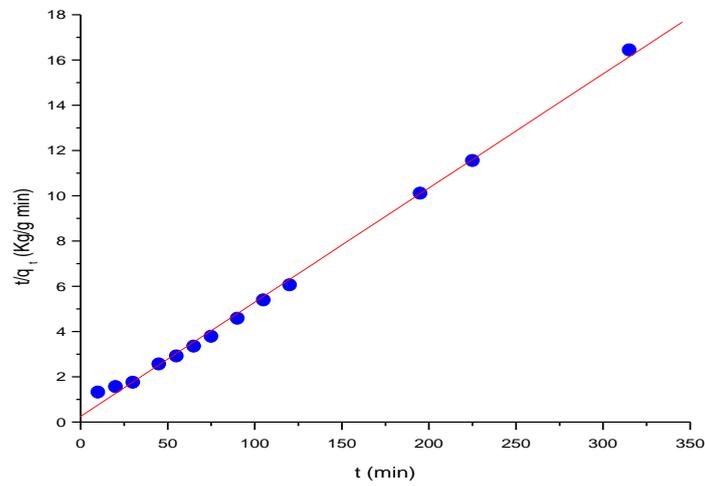
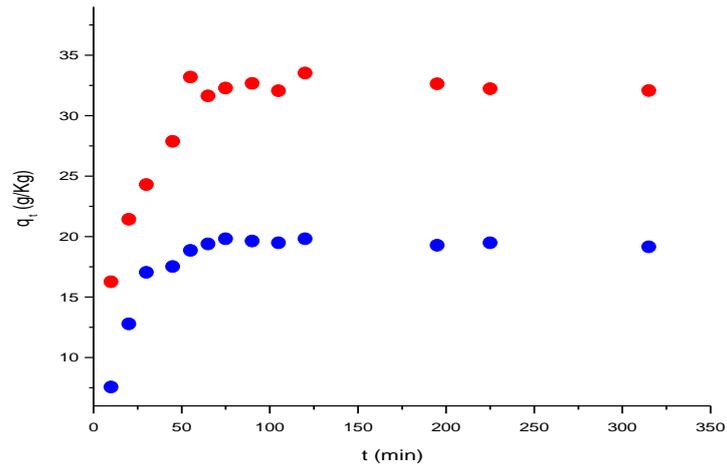


Figura 4.29: Andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t per DC ottenuti su film di chitosano preparati da soluzioni contenenti polisaccaride in percentuale pari al 2% w/v e DC in concentrazione pari a 1 mmol/L (simboli blu) e 2 mmol/L (simboli rossi) e messi ad equilibrare in PBS.

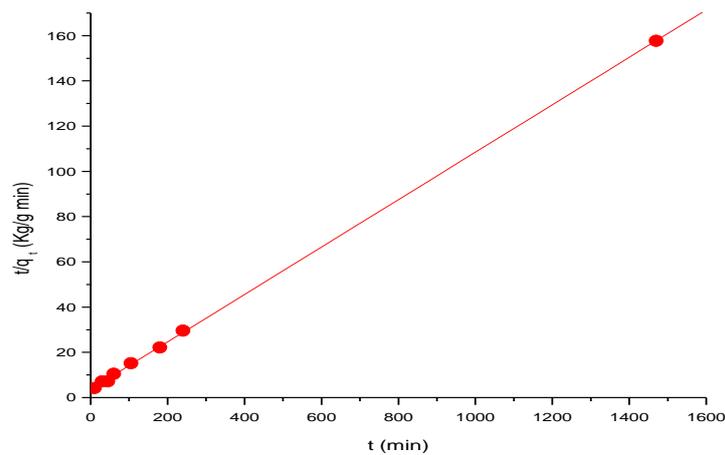
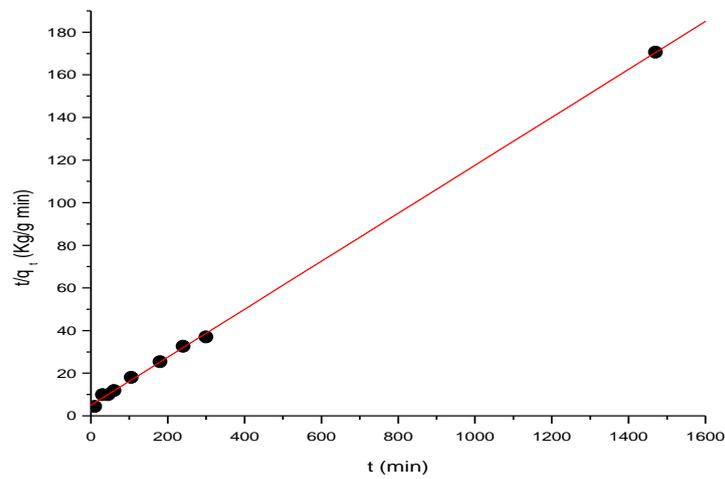
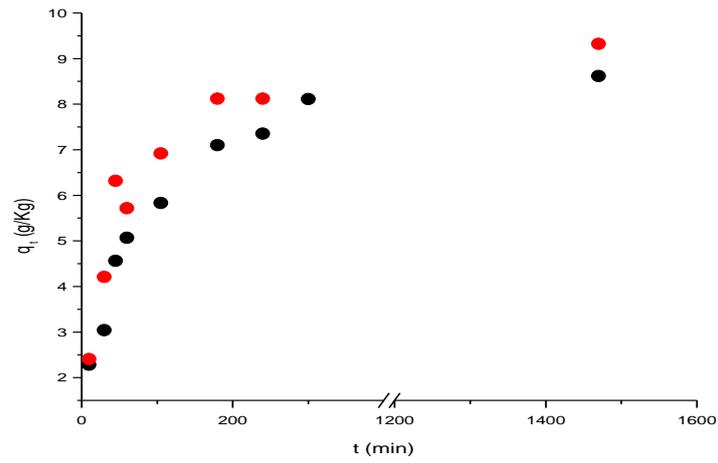


Figura 4.30: Andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t per DC ottenuti su film di chitosano preparati da soluzioni contenente polisaccaride in percentuale pari a 2,5% w/v (simboli neri) e 3% w/v (simboli rossi) e DC in concentrazione pari a 1 mmol/L e messi ad equilibrare in PBS.

In Tabella 4.11 sono riportati i parametri di rilascio per DC ottenuti su film di chitosano preparati da soluzioni contenenti polisaccaride in percentuale variabile da 2% a 3% w/v e DC in concentrazione pari a 1 o 2 mmol/L.

Tabella 4.11: Parametri di rilascio per DC da parte di film di chitosano preparati da soluzioni acquose di polisaccaride e farmaco a concentrazione variabile.

Concentrazione DC (mmol/L)	concentrazione chitosano MMW (% w/v)	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)	tempo di rilascio (h)
1	2	$19,8 \pm 0,3$	$(10 \pm 5) 10^{-3}$	1
2	2	$33,2 \pm 0,5$	$(6 \pm 2) 10^{-3}$	1
1	2,5	$8,9 \pm 0,1$	$(2,5 \pm 0,3) 10^{-3}$	4
1	3	$9,5 \pm 0,1$	$(3,0 \pm 0,3) 10^{-3}$	4

I dati ottenuti risultano in linea con i dati di densità di Tabella 4.9, dal momento che è lecito aspettarsi che in film più compatti e quindi dotati di meno spazi vuoti, sia l'inglobamento di molecole sia la loro diffusione verso l'esterno siano più difficoltosi. Tuttavia la quantità di farmaco assorbito e quindi rilasciato all'equilibrio da questi sistemi può essere incrementata aumentando opportunamente la concentrazione iniziale di DC nella soluzione di partenza, come dimostrano i dati ottenuti dal film preparato raddoppiando la concentrazione di farmaco nella soluzione di partenza. Non si riscontrano differenze sostanziali nelle cinetiche di rilascio di DC da parte dei film esaminati.

4.3.3 Uptake e rilascio di TC da parte di film di chitosano

Lo studio di *uptake* e rilascio di TC da parte di film di chitosano è stato condotto con la seconda metodica messa a punto per l'indagine con DC, vale a dire tramite preparazione di film a partire da soluzioni di polisaccaride e farmaco a concentrazioni note.

Gli studi di rilascio sono stati portati avanti in un opportuno volume della miscela di PBS:EtOH al 50% v/v, in considerazione della scarsa solubilità dell'antinfiammatorio in acqua.

In Figura 4.31 sono riportati gli andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t per TC ottenuti su di un film di chitosano preparato da una soluzione contenente polisaccaride al 2% w/v e TC in concentrazione pari a 2 mmol/L e messo ad equilibrare in miscela di PBS:EtOH al 50% di

etanolo.

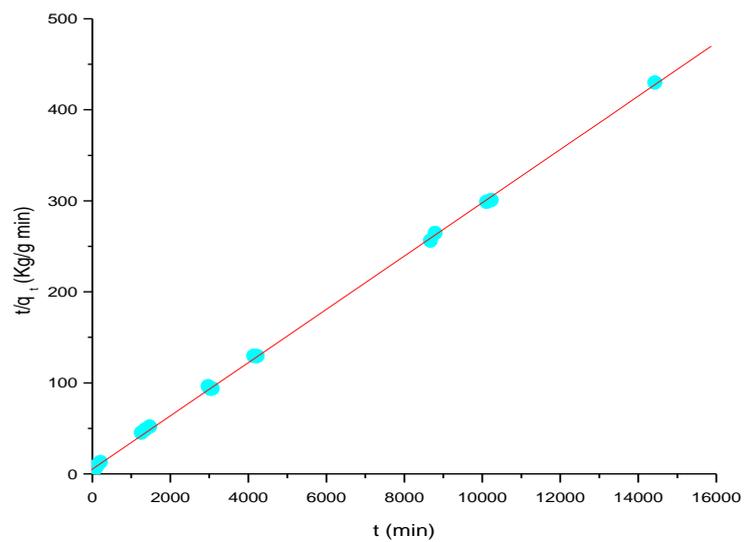
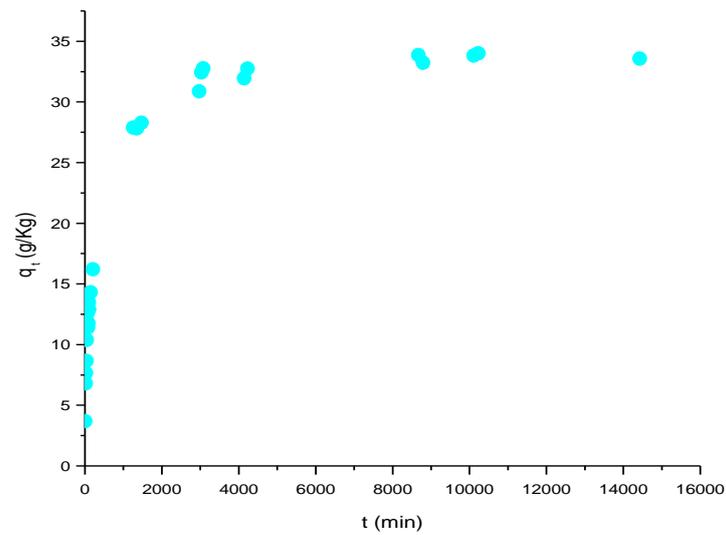


Figura 4.31: Andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t per TC ottenuti su di un film di chitosano preparato da una soluzione contenente polisaccaride al 2% w/v e TC in concentrazione pari a 2 mmol/L e messo ad equilibrare in miscela di PBS:EtOH al 50% di etanolo.

In Tabella 4.12 sono riportati i parametri relativi alla cinetica.

Tabella 4.12: Parametri di rilascio per TC da parte di un film di chitosano preparato da una soluzione acquosa di polisaccaride e farmaco a titolo noto.

Concentrazione TC (<i>mmol/L</i>)	concentrazione chitosano MMW (% w/v)	q_e (<i>g/Kg</i>)	k_2 (<i>Kg/g min</i>)	tempo di rilascio (<i>h</i>)
2	2	$34,2 \pm 0,1$	$(1,7 \pm 0,2) 10^{-4}$	~ 70

Ad una prima analisi, i film di chitosano sembrano in grado di assorbire e quindi rilasciare quantità di TC confrontabili con quelle di DC a differenza di quanto verificato per gli idrogeli. Questo risultato preliminare potrebbe suggerire che nei film l'interazione con il farmaco avviene tramite un meccanismo diverso, apparentemente indipendente dalle proprietà chimiche della molecola assorbita, ma tale ipotesi richiede ulteriori conferme per essere avvalorata.

4.4 Preparazione e caratterizzazione di membrane elettrospinnate di chitosano come dispositivi per il rilascio controllato di DC

L'ultimo tipo di DDS a base di chitosano che è stato testato nel corso del mio dottorato sono state membrane non tessute, costituite da nanofibre ottenute per *electrospinning* a partire da miscele polimeriche di chitosano e poli(ossietilene) in acqua. La ricerca, condotta in collaborazione con il gruppo delle prof.sse Maila Castellano e Silvia Vicini, ha richiesto lo studio preliminare delle proprietà reologiche delle soluzioni di chitosano nell'intento di individuare le condizioni sperimentali ottimali per l'elettrofilatura [40].

La reologia è quella disciplina che studia lo scorrimento e la deformazione dei materiali in seguito all'applicazione di una forza. La reologia per sistemi liquidi o semisolidi studia il flusso, mentre quella applicata ai sistemi solidi si occupa della deformazione. Il flusso è lo scorrimento del materiale in cui gli elementi che lo costituiscono si muovono in maniera relativa gli uni rispetto agli altri. Se questi elementi si muovono uno dietro l'altro oppure uno sull'altro, si parla di flusso di taglio (*shear flow*). La deformazione di un corpo continuo è invece un qualsiasi cambiamento della sua configurazione geometrica a seguito dell'applicazione di una sollecitazione. Affinchè si possa ottenere lo scorrimento o la deformazione è necessario che sia applicata una certa forza. In reologia la forza è sempre convertita in pressione e definita sforzo, oppure carico, con unità di misura Pascal (Pa). Lo stress può essere applicato perpendicolarmente alla superficie del corpo (*normal stress*) o parallelamente (*shear stress* o *tangential stress*). Se si applica uno *shear stress* ad un liquido o ad un semisolido, si genera un flusso di taglio. Tale flusso può essere immaginato come una serie di piani paralleli che scorrono l'uno sull'altro, con gli strati più vicini alla superficie dove è applicato lo sforzo che scorrono più velocemente di quelli sottostanti. La differenza di velocità di ogni strato è costante. Tale parametro è definito velocità di deformazione, *shear rate* (s^{-1}). Lo *shear rate* è la differenza di velocità tra due strati di liquido, separati da una distanza infinitesima.

4.4.1 Studio delle proprietà reologiche di soluzioni acquose di chitosano e di chitosano/poli(ossietilene)

Sono state preparate tre soluzioni di concentrazione pari a 2% w/v in ambiente acetico (CH_3COOH 1% v/v) in acqua bidistillata di Chit HMW, Chit MMW e Chit LMW di cui sono state acquisite le curve di viscosità nelle seguenti condizioni operative: $T = 25\text{ }^\circ C$ con una tolleranza di $0,5\text{ }^\circ C$; shear

rate = 0,1-100 s⁻¹, geometria piatto-piatto con diametro di 50 mm. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 4.32.

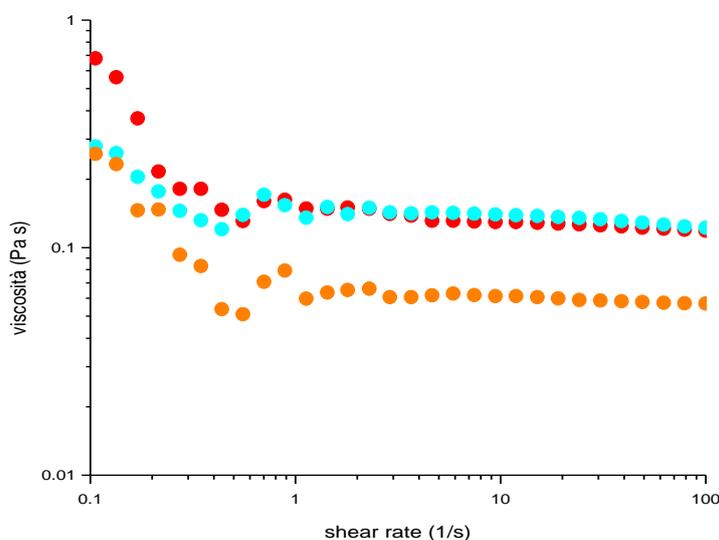


Figura 4.32: Curve di viscosità acquisite da soluzioni di concentrazione pari a 2% w/v in ambiente acetico di Chit HMW (simboli rossi), Chit MMW (simboli azzurri) e Chit LMW (simboli arancioni).

Tutte le curve (Figura 4.32) mostrano andamenti irregolari al di sotto della velocità di deformazione pari a 1 s⁻¹. Tali andamenti sono tipici di soluzioni non perfettamente omogenee in cui la presenza di particelle sospese provoca il brusco incremento della viscosità del sistema per bassi valori di *shear rate*. Al di sopra della soglia di 1 s⁻¹, tutte e tre i campioni mostrano un comportamento newtoniano. La viscosità della soluzione di Chit LMW è sempre inferiore a quella di Chit HMW e Chit MMW nell'intero intervallo di velocità di deformazione esplorato, mentre non si evidenziano differenze sostanziali nel comportamento reologico per gli altri due tipi di chitosano. I dati ottenuti indicano che non è possibile elettrofilare soluzioni di chitosano nelle condizioni operative normalmente adottate con lo strumento in dotazione al DCCI. Di conseguenza, sono state prese in considerazione miscele acquose di chitosano e poli(etilene ossido) (PEO, 9 10⁵ g/mol) allo scopo di modulare le proprietà reologiche della soluzione da elettrofilare. Inoltre, tenuto conto della scarsa omogeneità delle soluzioni preparate in ambiente acetico all'1% v/v, si è deciso di raddoppiare la concentrazione di CH₃COOH.

Sono state preparate diverse soluzioni di chitosano/PEO variando la massa molecolare del chitosano, la concentrazione di entrambi i polimeri e/o il rapporto di concentrazione tra chitosano e PEO, sulle quali è stata condotta l'analisi reologica (Figura 4.33).

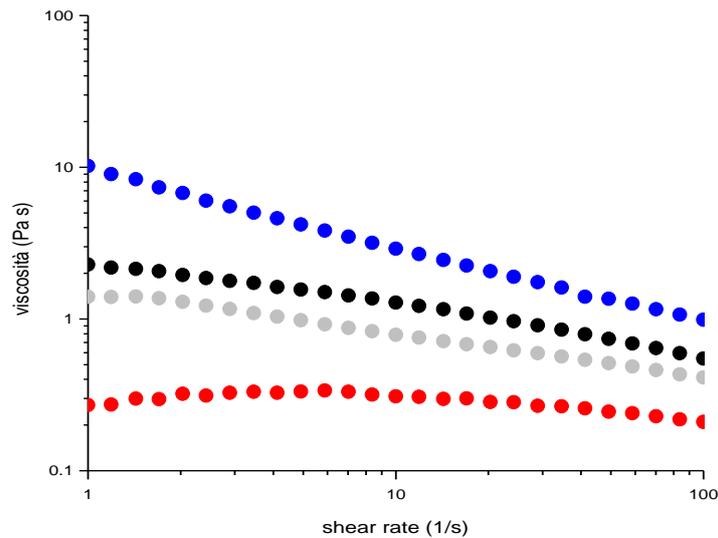


Figura 4.33: Curve di viscosità acquisite da miscele acquose di chitosano e PEO con diversa concentrazione e diverso rapporto di concentrazione: Chit HMW 2% w/v + PEO 3,5% w/v in rapporto 50:50 % (miscela 1, simboli neri), Chit MMW 2% w/v + PEO 3,5% w/v in rapporto 50:50 % (miscela 2, simboli grigi), Chit MMW 3,5% w/v + PEO 5% w/v in rapporto 50:50 % (miscela 3, simboli rossi), Chit MMW 3,5% w/v + PEO 5% w/v in rapporto 70:30 % (miscela 4, simboli blu).

L'aggiunta di PEO modifica le proprietà reologiche dei campioni, che presentano comportamento pseudo-plastico nella regione ad alte velocità di deformazione, eccezion fatta per la miscela 3 che ha un comportamento newtoniano.

Per la miscela 4 è stata raggiunta la viscosità considerata ideale per l'*electrospinning* che è 10 Pa s e quindi si è deciso di partire da questa preparazione a fare le prove di elettrofilatura.

4.4.2 Preparazione di membrane elettrofilate di chitosano e poli(ossietilene)

Una volta elettrofilate (condizioni operative: 19 KV, 0,4 mL/h) e raccolte su di un foglio di alluminio, le membrane sono state immerse in una miscela di $C_2H_5OH/NH_3/H_2O$ 7:2:1 v/v, per renderle insolubili in acqua al pari di film ed idrogeli, e quindi accuratamente lavate con acqua bidistillata. Da sottolineare che il trattamento chimico adottato ha lo scopo di fissare le fibre di chitosano, insolubili in ambiente basico, e non quelle di PEO, che dovrebbero essere rimosse dal passaggio nel bagno di fissaggio e dal successivo lavaggio con acqua. Al termine delle operazioni ci si aspetta quindi di ottenere una membrana prevalentemente costituita da fibre intrecciate di chitosano, ma in cui potrebbero essere ancora presenti fibre di PEO non rimosse dal lavaggio con

acqua.

Utilizzando le miscele di Chit HMW o MMW e PEO in diversa concentrazione e con diversi rapporti di concentrazione, si sono ottenuti risultati discordanti, brevemente riassunti di seguito:

- la miscela di Chit HMW al 2% w/v e PEO al 3,5% w/v (miscela 1) in proporzione 50:50 % non ha prodotto risultati, nel senso che le fibre non si sono formate;
- dalla miscela di Chit MMW al 2% w/v e PEO al 3,5% w/v in rapporto 50:50 % (miscela 2) si sono ottenute membrane, che però è stato difficile staccare dal collettore in alluminio senza provocare frantumazione della membrana;
- dalla miscela di Chit MMW al 3,5% w/v e PEO al 5% w/v in rapporto 50:50 % (miscela 3) non si sono ottenute neppure le fibre, probabilmente a causa dell'abbassamento troppo drastico della viscosità della miscela;
- dalla miscela di Chit MMW al 3,5% w/v e PEO al 5% w/v in rapporto 70:30 % (miscela 4) si sono ottenute fibre, che però non si sono interpenetrate tra di loro a formare la membrana di non tessuto.

Pertanto la miscela 2 è l'unica che ha fornito risultati parzialmente positivi. Le membrane ottenute da questa prova sono state caratterizzate morfologicamente al FE-SEM e tramite microscopia a forza atomica (AFM). I risultati ottenuti sono riportati rispettivamente in Figura 4.34 e in Figura 4.35.

Le immagini FE-SEM evidenziano la presenza di *beads* in scala mesometrica interconnesse tra di loro tramite fibre sottili di spessore nanometrico. L'analisi dimensionale delle strutture presenti, condotta su più di 200 *beads* e fibre e riportata in Appendice, indica un diametro delle *beads* pari a 430 ± 150 nm e per le fibre uno spessore pari a 45 ± 15 nm abbinato ad una lunghezza pari a 1110 ± 650 nm. In base all'esperienza pregressa del gruppo di ricerca delle prof.sse Castellano e Vicini, è possibile ipotizzare che le *beads* siano costituite da chitosano, tenuto conto della ben nota difficoltà ad elettrospinnare delle soluzioni di polisaccaridi, ma non è altrettanto immediato formulare ipotesi sulla natura chimica delle fibre costituenti il network.

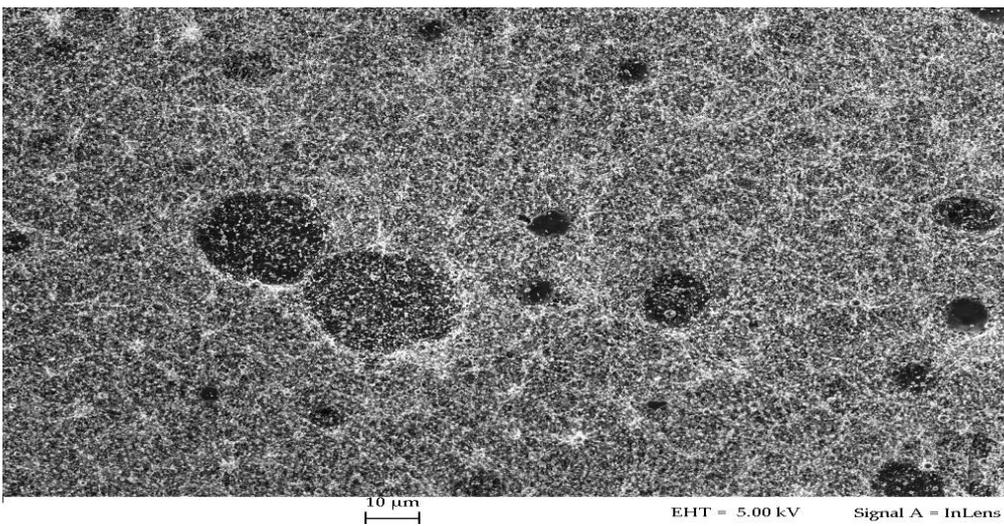
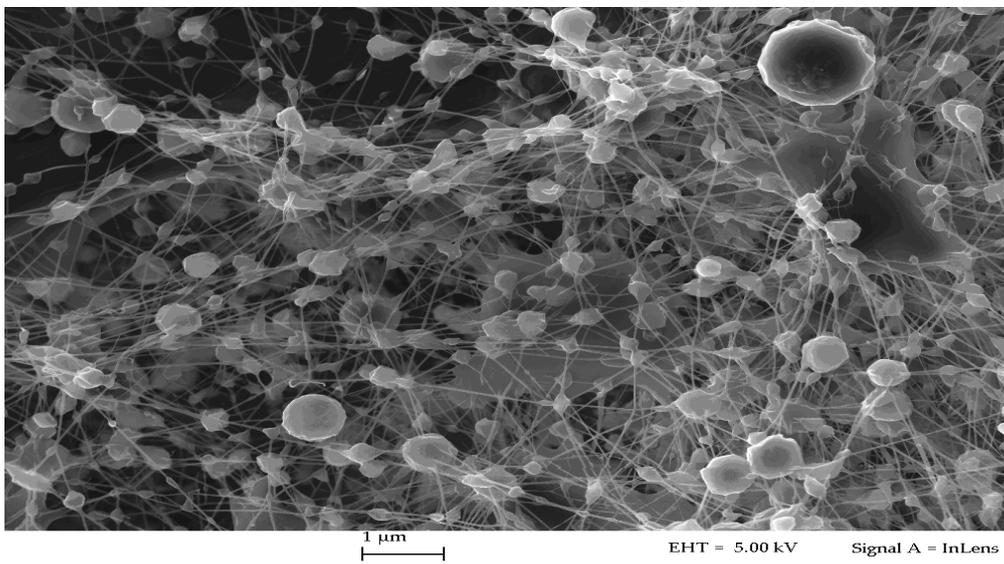
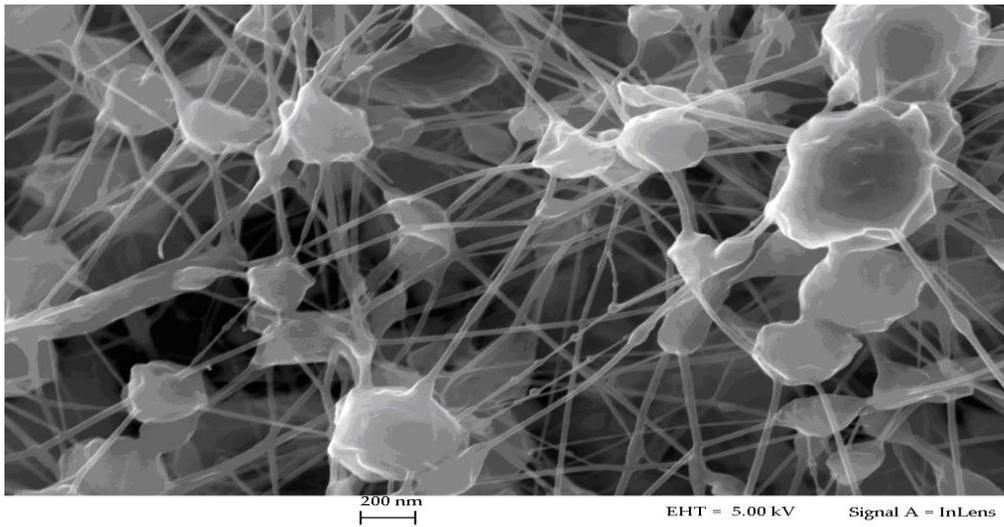


Figura 4.34: Immagini FE-SEM a diversi ingrandimenti di una membrana elettrofilata di Chit MMW/PEO ottenuta dalla miscela 2.

Anche la caratterizzazione tramite AFM evidenzia la presenza di *beads* e fibre interconnesse, in accordo con i dati precedenti.

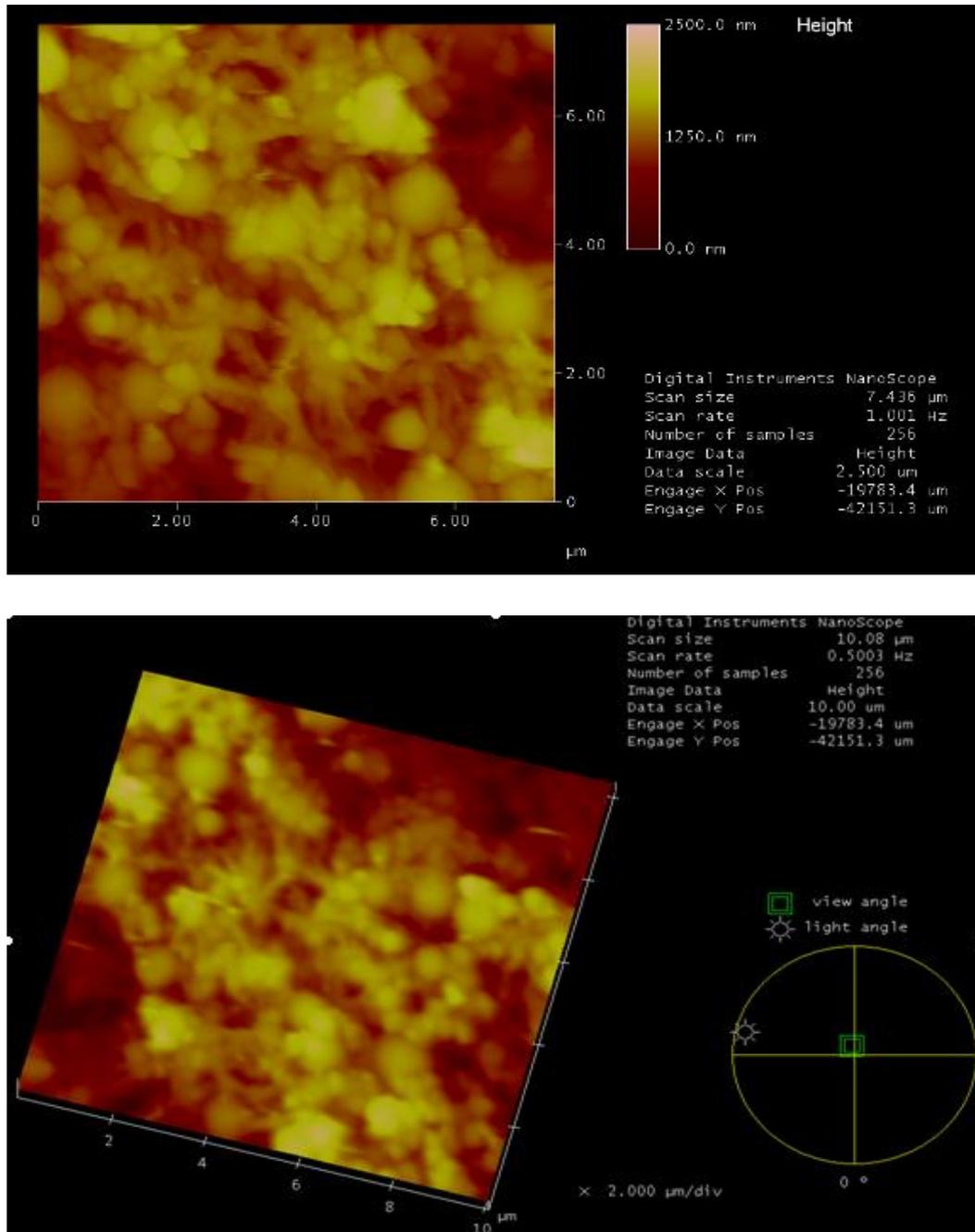


Figura 4.35: Immagini AFM di una membrana elettrofilata di Chit MMW/PEO ottenuta dalla miscela 2.

4.4.3 Uptake di DC da parte di membrane elettrofilate di chitosano e poli(ossietilene)

Sulla membrana di Chit MMW/PEO, ottenuta dalla miscela 2 e caratterizzata precedentemente, sono stati condotti gli esperimenti di *uptake* di DC secondo il protocollo messo a punto sugli idrogeli e sui film. Gli studi di rilascio di DC nonché quelli di *uptake* e rilascio di TC non sono stati completati per mancanza di tempo.

In dettaglio, una porzione della membrana di peso pari a 0,5 mg è stata preventivamente messa ad incubare con 2 mL di EtOH/NH₃/H₂O 7:2:1 v/v per il processo di fissaggio di fibre e *beads* di chitosano e quindi posta in stufa a 40 °C per quattro giorni fino a completa evaporazione del solvente. Si sono ottenuti frammenti di membrana, depositati sulla superficie della capsula Petri, che sono stati messi ad incubare con 2 mL di una soluzione 1 mmol/L di DC in acqua.

I grafici della cinetica di *uptake* dell'antibiotico sono riportati in Figura 4.36, mentre i parametri estratti da essi sono riassunti in Tabella 4.13.

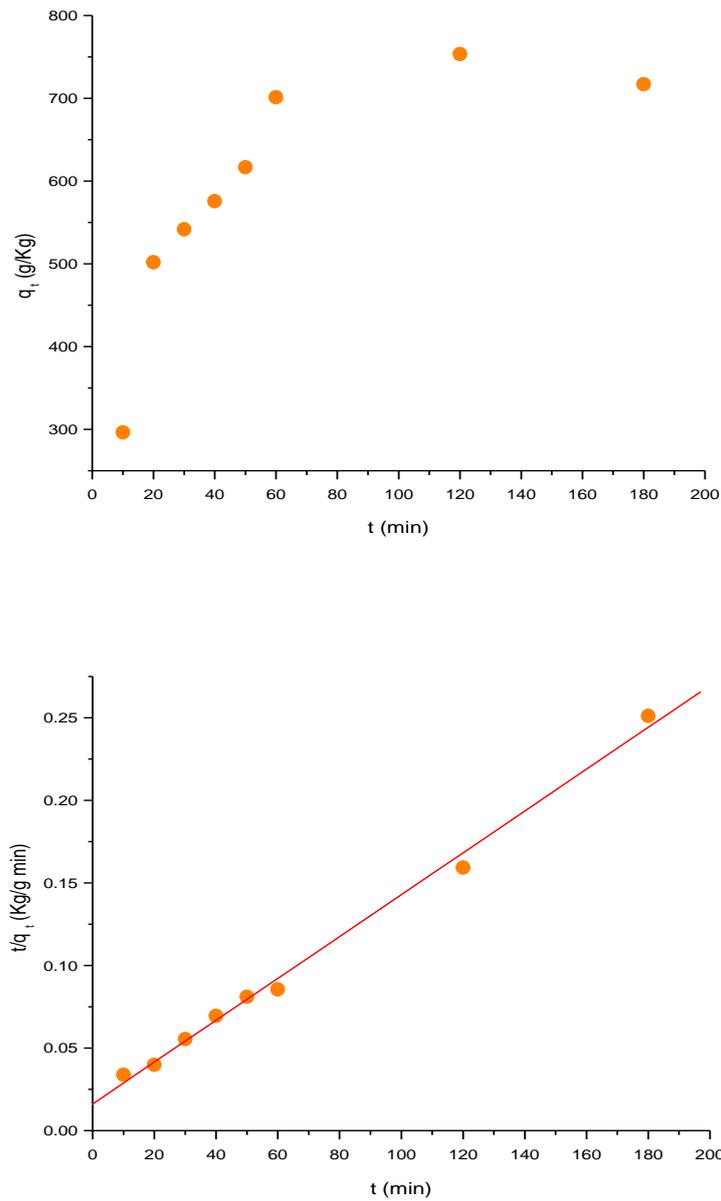


Figura 4.36: Andamenti in funzione del tempo dei parametri q_t e t/q_t ricavati da una membrana di chitosano MMW/PEO messa ad equilibrare con una soluzione di DC di concentrazione pari a 1 mmol/L.

Tabella 4.13: Parametri di equilibrio (q_e) e cinetici (k_2) associati all'assorbimento di DC da parte di una membrana di chitosano MMW/PEO.

processo	q_e (g/Kg)	k_2 (Kg/g min)
assorbimento	790 ± 20	$(1,0 \pm 0,3) 10^{-4}$

A parità di condizioni sperimentali, la membrana sembra in grado di assorbire quantità di DC dieci volte maggiori rispetto agli idrogeli, presi come DDS di riferimento, probabilmente in virtù della sua organizzazione strutturata di non-tessuto. L'incremento di un ordine di grandezza riguarda anche il parametro cinetico k_2 . Per quanto incoraggiante, il dato dovrà essere confermato in futuro, anche e soprattutto per quel che riguarda le proprietà correlate di rilascio.

4.5 Funzionalizzazione di film di chitosano con il tripeptide Arginina-Glicina-Aspartato (RGD)

Nell'ultima parte della mia attività sperimentale è stato iniziato lo studio della funzionalizzazione dei film di chitosano con il tripeptide RGD (arginina-glicina-aspartato), la cui formula di struttura è riportata in Figura 4.37, nell'intento di dotare questo tipo di DDS di proprietà di ancoraggio ai tessuti biologici e aumentare conseguentemente le potenzialità di somministrazione topica dei farmaci. È noto infatti che la sequenza RGD, comunemente definita *colla biologica*, è presente nella fibronectina e in molte proteine cellulari ed è coinvolta nei meccanismi di interazione e adesione cellulari governati dalle integrine [41].

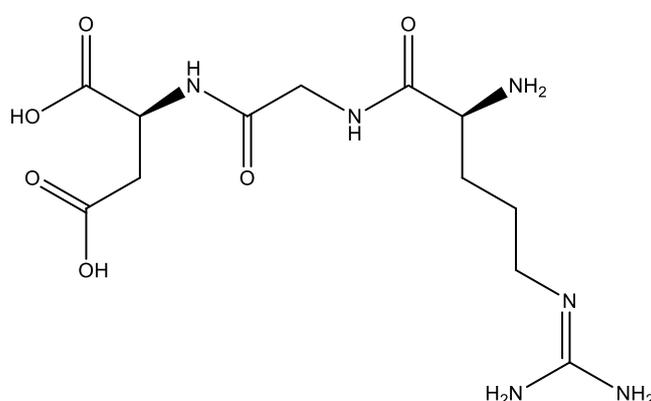


Figura 4.37: Formula di struttura della sequenza RGD.

La funzionalizzazione [42] di film di chitosano commerciale MMW è stata ottenuta per reazione di condensazione dei gruppi amminici superficiali del polisaccaride con i gruppi carbossilici del residuo di aspartato del tripeptide, precedentemente attivati con la carbodiimmide idrosolubile EDC (1-(3-dimetilamminopropil)-3-etilcarbodiimmide) secondo un protocollo messo a punto in una tesi di dottorato precedente [43]. Nello specifico una porzione di film di peso definito è stata immersa in una soluzione acquosa di RGD attivata con EDC nel rapporto molare nominale pari a 1:50 rispetto alla quantità stimata di gruppi amminici del polisaccaride presenti in massa. La reazione è stata

portata a completezza tramite basculazione a temperatura ambiente per la durata di 72 ore [42].

Per verificare la riuscita della funzionalizzazione con RGD, il film è stato raccolto, essiccato in stufa e confrontato tramite spettroscopia FTIR in modalità ATR con una porzione di film non trattato (Figura 4.38).

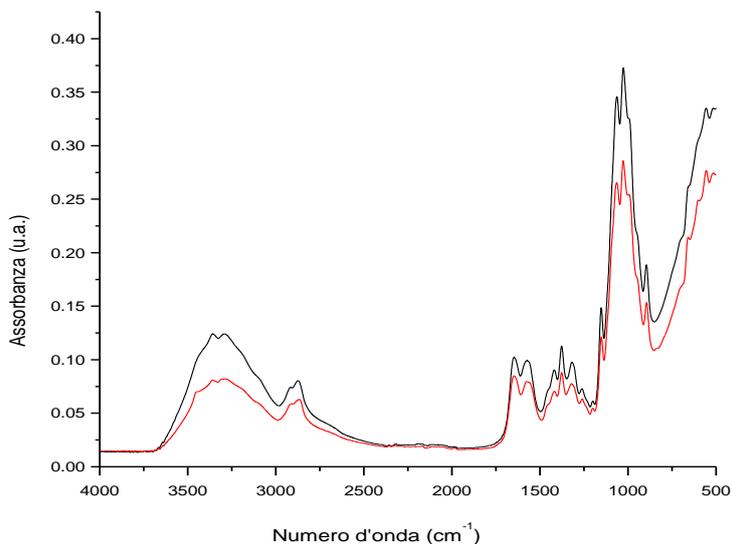


Figura 4.38: Spettri FTIR acquisiti su un film di chitosano in modalità ATR: porzione non funzionalizzata con RGD (linea nera) e porzione derivatizzata con il tripeptide (linea rossa).

Confrontando le intensità dei segnali è stato determinato il rapporto tra l'intensità del segnale a 1655 cm⁻¹, corrispondente alla vibrazione di stretching del carbonile dell'ammide del residuo di 2-acetil-D-glucosammina, e l'intensità del segnale a 1542 cm⁻¹, corrispondente alla vibrazione di bending dell'ammina primaria del residuo di 2-D-glucosammina. Si è ottenuto il valore di 1,13 per il film controllo e il valore di 1,19 per il film funzionalizzato con RGD. Tale risultato, indicando una crescita della percentuale di residui acetilati in catena, rappresenta una conferma indiretta dell'avvenuta reazione tra il tripeptide e i residui amminici di chitosano presenti sulla superficie del film. Per motivi di tempo non è stato possibile condurre lo studio di *uptake* e rilascio di DC e TC sul film derivatizzato con RGD per valutare l'effetto della funzionalizzazione sulle proprietà di veicolazione di farmaci di questo tipo di DDS.

Capitolo 5

Discussione dei risultati

Quando si prende in considerazione un materiale per la realizzazione di un sistema per la somministrazione controllata di farmaci, se ne devono valutare diverse proprietà. Tra queste quelle essenziali sono: la compatibilità biologica, la capacità di assorbire e rilasciare farmaci e la lavorabilità in forme facilmente somministrabili al paziente. Un materiale biocompatibile per DDS deve essere prima accettato dal sistema immunitario e poi, una volta esaurita la sua funzione, deve poter essere degradato e/o espulso dall'organismo. I tempi di degrado e/o di espulsione dall'organismo devono essere compatibili con i tempi di azione del farmaco.

In questo lavoro di tesi di dottorato è stato preso in considerazione un polisaccaride di origine naturale, il chitosano, perché, come evidenziato dai riferimenti bibliografici riportati nel Capitolo 2, è ben nota la sua biocompatibilità e ne è stata studiata la capacità di trattenere e rilasciare farmaci in diverse forme utili alla loro somministrazione. In particolare, la ricerca si è concentrata sulla veicolazione di due farmaci specifici, l'antibiotico Doxiciplina cloridrato (DC) e l'antinfiammatorio cortisonico Triamcinolone acetone (TC), per la cura della patologia parodontale.

Per poter confrontare i risultati delle misure di *uptake* e rilascio di DC e TC con i dati presenti in letteratura, sono stati inizialmente testati idrogeli sferici di chitosano di dimensione millimetrica, come proposto da Demartini [34] e da Chiou e Li [44 a]. In questi lavori è stata valutata la capacità di *uptake* di idrogeli di chitosano impiegando coloranti solubili in acqua. Invece in questo lavoro di tesi è stata studiata la capacità di *uptake*/rilascio di due farmaci, DC e TC. Lo scopo del lavoro è stato quello di capire in quale misura i farmaci sono assorbiti e rilasciati e anche se i processi di *uptake* e di rilascio siano determinati esclusivamente da fattori fisici come la diffusione, chimici come la degradazione in acqua del chitosano o se siano anche condizionati da interazioni specifiche che si vengono ad instaurare tra i farmaci stessi ed il polisaccaride.

La struttura degli idrogeli di chitosano è caratterizzata da porosità variabile, maggiore all'interno e minore nel guscio esterno. Ciò fa pensare che l'*uptake* del farmaco da una soluzione esterna a concentrazione nota possa avvenire attraverso due meccanismi principali:

- semplice diffusione del farmaco dalla soluzione esterna a quella contenuta nei pori;

- interazione del farmaco con la superficie della matrice di chitosano seguita da diffusione dello stesso all'interno della matrice del polimero.

Se il farmaco diffondesse semplicemente nei pori riempiti dal solvente acquoso senza essere assorbito dalla matrice di chitosano, ci si dovrebbe aspettare una cinetica dominata dal processo diffusivo; di conseguenza, la quantità di farmaco negli idrogeli dovrebbe aumentare in funzione della radice quadrata del tempo dell'esperimento. Se, invece, il farmaco fosse assorbito dalla matrice di chitosano attraverso la formazione di un'interazione specifica tra farmaco e polimero, presumibilmente tramite i sostituenti amminici ed idrossilici presenti sulla catena del polisaccaride, la cinetica di assorbimento dovrebbe essere di tipo esponenziale. Se nessuno dei due processi di *uptake* prevale sull'altro, ossia nel caso in cui i tempi caratteristici di entrambi i meccanismi risultano comparabili, ci si aspetta di trovare una cinetica più complessa. In questo caso, i modelli che tengano conto dei vari processi coinvolti difficilmente portano ad un'equazione analitica e spesso si ricorre ad equazioni fenomenologiche più facilmente manipolabili per descrivere la cinetica di *uptake*.

Per gli idrogeli investigati in questo lavoro, i dati delle misure di *uptake* sono ben descritti dal modello cinetico di pseudo-secondo ordine (equazione [3]). Questo è un modello fenomenologico di validità piuttosto generale [44] e quindi non sorprende che sia in grado di descrivere l'*uptake* anche di questo tipo di DDS.

Nel lavoro sull'assorbimento di un colorante solubile in acqua da parte di *beads* di chitosano [44 a], gli autori utilizzano diversi modelli per descrivere la cinetica, tra cui il modello di pseudo-secondo ordine, e diversi modelli per descrivere le isoterme di equilibrio di assorbimento, tra cui il modello di Langmuir e quello di Freundlich. È interessante confrontare i dati da loro riportati per il modello di pseudo-secondo ordine con quelli riportati in questa tesi in Tabella 4.1 per DC e in Tabella 4.7 per TC. L'ordine di grandezza delle costanti cinetiche k_2 ottenute nei due lavori è simile, ma i valori ottenuti da Chiou e Li crescono con la concentrazione iniziale del colorante, mentre quelli ottenuti in questa tesi non sembrano avere un andamento monotono in funzione della concentrazione iniziale del farmaco in soluzione.

Per quel che riguarda invece le isoterme di equilibrio di assorbimento, si può osservare che i valori dei parametri dell'isoterma di Freundlich per DC (pag. 29) e per TC (pag. 46) sono molto diversi da quelli riportati da Chiou e Li. Ciò indica che le condizioni di equilibrio che si vengono a realizzare per i due farmaci presi in esame e il colorante sono completamente diverse, a sottolineare l'influenza esercitata sia dalla natura chimica della specie assorbita sia dal tipo di interazioni

specifiche tra specie assorbita e matrice sul processo di *uptake*.

Le misure di *uptake* di TC indicano che il derivato cortisonico viene assorbito molto poco dagli idrogeli di chitosano. Tali misure si sono rivelate meno riproducibili di quelle effettuate con DC. Il fatto che TC non sia solubile in acqua, e che questo abbia obbligato a modificare il sistema solvente con una miscela di acqua ed etanolo, può essere una delle cause di questo risultato. Sarà necessario quindi studiare l'effetto dell'alcol sulla stabilità degli idrogeli di chitosano per cercare di dare una risposta più attendibile a questo dato sperimentale.

E' bene sottolineare che le misure di rilascio in vitro non danno indicazioni dei tempi di rilascio del farmaco in vivo, ma solo sul tipo di interazioni fisico-chimiche del farmaco con le strutture di chitosano prese in considerazione. In vitro, la quantità totale di farmaco iniziale è uguale a quella finale; in altri termini, il sistema considerato è un sistema chiuso in cui la velocità di rilascio dipende dalla quantità di farmaco rilasciata e da quella da rilasciare. In ogni istante la somma delle due quantità deve essere costante e pari a quella introdotta inizialmente nel sistema. In vivo, il farmaco rilasciato nell'organismo viene progressivamente metabolizzato e la sua concentrazione finale è zero. Pertanto, le velocità di rilascio misurate in vitro non possono costituire una previsione affidabile delle velocità di rilascio in vivo.

Gli andamenti temporali dell'*uptake* e del rilascio, non riconducibili al solo processo di diffusione, suggeriscono che i farmaci sono assorbiti non solo nei pori ma anche nella matrice di chitosano. E' ipotizzabile che il farmaco trattenuto nella matrice di chitosano possa essere rilasciato più lentamente di quello contenuto nei pori o comunque secondo modalità cinetiche differenti, che tengano conto anche della cinetica di degradazione del polisaccaride in acqua. Pertanto, sarebbe importante definire come il farmaco si ripartisce tra pori e matrice di chitosano. Per questo sarà necessario, in futuro, affiancare alle misure di *uptake* accurate misure morfologiche e di porosità degli idrogeli di chitosano per valutare dimensioni e struttura dei pori anche in funzione del grado di invecchiamento del DDS.

Gli idrogeli di chitosano di dimensioni millimetriche, per forma e dimensioni, non sono adatti alla somministrazione di DC e TC nelle tasche parodontali e sono stati presi in considerazione solo come sistema modello per ricavare informazioni preliminari sulle potenzialità del chitosano di veicolare DC e TC.

Pellicole (o film) o membrane sottili di dimensioni millimetriche o sub-millimetriche sarebbero più facilmente inseribili nelle tasche parodontali. Si è quindi pensato di produrre film per *casting* da soluzioni del polisaccaride e membrane nanostrutturate per elettrofilatura da miscele acquose di

chitosano e poli(ossietilene) (PEO).

Gli studi cinetici di *uptake* e di rilascio di DC e TC da parte di film di chitosano, resi insolubili in acqua per trattamento basico o reticolazione con EGDE, hanno evidenziato che anche in questo caso i dati sperimentali sono fenomenologicamente interpretabili con il modello di pseudo-secondo ordine e quindi con la presenza di una cinetica mista. Differenze sono state trovate per le quantità di farmaco assorbito e rilasciato rispetto agli idrogeli testati nelle stesse condizioni sperimentali. I dati ottenuti da film a diversa densità sembrano suggerire una correlazione tra grado di porosità del film e capacità di assorbimento e di rilascio del sistema, come già ipotizzato per gli idrogeli.

I dati più interessanti in prospettiva sono stati ottenuti dallo studio di *uptake* di DC da parte di membrane di non-tessuto ottenute per elettrofilatura da miscele acquose di chitosano e PEO, riportati nel paragrafo 4.4.3 di questo lavoro di tesi. Le membrane risultano costituite da una struttura particolare a “filo di perle” in cui *beads* di diametro di circa 400 nm sono connesse con fili di circa 50 nm di spessore e di circa 1000 nm di lunghezza. Si è ipotizzato che le *beads* siano costituite da solo chitosano, mentre rimane un certo grado di incertezza sulla composizione delle fibre, non ancora risolto con le tecniche di caratterizzazione sperimentale a nostra disposizione. Questa struttura sembra essere particolarmente promettente nel caso fosse provato che il farmaco possa essere immagazzinato anche nella matrice di chitosano, in quanto le *beads* potrebbero quindi essere dei “serbatoi” di DC a rilascio lento. Le misure preliminari di *uptake* indicano che la cinetica è la stessa di tipo presumibilmente misto, già osservata per gli idrogeli di dimensione millimetrica, e che la quantità di DC assorbita per unità di massa di chitosano, q_e , è maggiore di circa un ordine di grandezza. Fattori di forma e una maggiore porosità della membrana rispetto agli idrogeli potrebbero essere alla base di questa notevole differenza.

Complessivamente i risultati ottenuti in questo lavoro di dottorato sono in linea con quelli presenti in letteratura. Il desorbimento dei farmaci in vitro da parte di questo tipo di dispositivi si conclude quasi sempre in poche ore (*burst* di rilascio) per poi raggiungere un equilibrio. Obiettivo primario della ricerca scientifica in questo settore è quello di limitare il *burst* iniziale di desorbimento, come testimoniato dalle innovative nanofibre di chitosano di Sedghi et al. [28 e] e dai film di chitosano con TC studiati in questo lavoro di tesi.

Capitolo 6

Conclusioni

Nel corso di questa tesi di dottorato sono state investigate le potenzialità del chitosano, un polisaccaride di basso costo di origine naturale, come materiale costitutivo di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci (DDS).

L'obiettivo della ricerca, condotta in collaborazione con il Dr. Carlo Becce, titolare di uno studio dentistico a Savona, è stato quello di valutare l'applicabilità dei sistemi investigati per la cura della patologia parodontale, una famiglia di malattie infiammatorie di tipo distruttivo ad eziologia batterica tra le più diffuse a livello mondiale. Per questo motivo sono state studiate le proprietà di veicolazione di due farmaci specifici, l'antibiotico Doxyciclina cloridrato (DC) e il cortisonico Triamcinolone acetonide (TC), ampiamente utilizzati nella profilassi e nella cura della malattia parodontale.

In dettaglio, sono stati preparati, caratterizzati, testati e confrontati tre diversi sistemi a base di chitosano: idrogeli sferici di dimensioni millimetriche, film ottenuti per *casting* da soluzioni acquose del polisaccaride e membrane di non-tessuto ottenute per elettrofilatura di miscele acquose di chitosano e poli(ossietilene) (PEO). Le capacità di tali dispositivi sono state valutate anche in funzione di diversi parametri sperimentali, quali le proprietà molecolari del chitosano (grado di acetilazione, massa molecolare) o il tempo di invecchiamento dei sistemi, correlabile alla ben nota biodegradabilità del polisaccaride in ambiente acquoso.

Nel dettaglio, il programma di lavoro sperimentale è stato dedicato allo studio dell'equilibrio e della cinetica di *uptake* di DC e TC dei diversi DDS messi ad equilibrare a temperatura ambiente con soluzioni di farmaco a concentrazione nota. A questa fase ha fatto seguito lo studio, sempre a temperatura ambiente, della cinetica di rilascio in vitro, in condizioni atte a simulare il più possibile l'ambiente fisiologico. Operativamente, i parametri cinetici sono stati ricavati da misure di assorbimento UV-Vis condotte ad intervalli di tempo definiti tramite elaborazione con equazioni di tipo fenomenologico in grado di riprodurre il più fedelmente possibile i dati sperimentali.

Il primo tipo di DDS preso in esame è rappresentato da idrogeli sferici di chitosano, ottenuti per semplice sgocciolamento di soluzioni del polisaccaride a pH acetico in bagno coagulante basico costituito da EtOH:NH₃:H₂O 7:2:1 v/v. Gli idrogeli, non direttamente impiantabili nelle tasche

parodontali, sono stati selezionati come sistema modello per un primo *screening* delle proprietà di veicolazione di DC e TC da parte del chitosano in funzione delle proprietà del polimero e delle condizioni sperimentali adottate. La scelta è stata dettata anche dalla necessità di confrontare i risultati ottenuti con quelli pubblicati in precedenza su idrogeli dello stesso tipo investigati per il loro comportamento con coloranti specifici, utilizzati come sonde colorimetriche.

I dati delle misure di *uptake* e di rilascio di DC e TC da parte degli idrogeli risultano ben descritti da una cinetica di pseudo-secondo ordine, un modello fenomenologico già rivelatosi piuttosto efficace nella descrizione dell'interazione tra matrici polimeriche e composti a bassa massa molecolare. Il modello è essenzialmente basato su di una cinetica mista, in cui le modalità di assorbimento del dispositivo sono regolate in parte dalla diffusione del farmaco all'interno del sistema e in parte dalle interazioni specifiche che si vengono ad instaurare tra le catene del polisaccaride (presumibilmente attraverso i sostituenti amminici ed idrossilici in catena) e le specie attive.

I dati raccolti sembrano poter confermare tale ipotesi in quanto:

- A parità di condizioni sperimentali, le quantità di DC assorbite e rilasciate dagli idrogeli, definite dal parametro q_e , sono significativamente superiori a quelle di TC, a sottolineare la diversa affinità della matrice polimerica per i due tipi di farmaco. Inoltre, la ridotta capacità di rilascio di DC riscontrata per gli idrogeli preparati da chitosano deacetilato (e quindi con più alta percentuale di gruppi amminici liberi) potrebbe costituire un ulteriore indizio della presenza di interazioni specifiche tra DC ed i residui di 2-D-glucosammina del chitosano.
- La caratterizzazione morfologica condotta al FESEM degli idrogeli ha evidenziato una struttura a porosità variabile, caratterizzata dalla presenza di uno strato esterno denso di spessore compreso tra 2 e 10 μm , e da una zona centrale in cui risultano ben visibili pori interconnessi di dimensioni variabili tra 0,3 e 25 μm e quindi potenzialmente adatti ad includere molecole farmacologicamente attive anche relativamente grandi. Tale struttura è compatibile con l'instaurarsi di meccanismi di diffusione dei farmaci dalla soluzione esterna verso l'interno del sistema. Inoltre, i risultati ottenuti con gli idrogeli invecchiati, per i quali è lecito ipotizzare un incremento della porosità dovuto a parziale degradazione delle catene polisaccaridiche, indicano un incremento dei parametri di rilascio in linea con l'ipotesi di assorbimento fisico dei farmaci.

In ogni caso i dati cinetici ricavati sugli idrogeli per DC e TC risultano comparabili con quelli riscontrati in passato con molecole sonda coloranti nel definire le modalità di interazione di questo tipo di DDS con molecole specifiche.

Tuttavia, l'aspetto più interessante ai fini applicativi emerso dagli studi sugli idrogeli riguarda la capacità di questi sistemi di rilasciare solo una frazione della quantità di farmaco caricato. Tale

frazione varia dal 10% al 60% per DC, in funzione delle condizioni sperimentali adottate e del grado di invecchiamento dei sistemi. Tale risultato indica che il chitosano ha le potenzialità di mantenere il farmaco nelle tasche parodontali per un tempo relativamente lungo, stimabile in qualche settimana, e quindi di prolungarne l'effetto nel tempo senza dover ricorrere a somministrazioni ripetute.

Anche altri tipi di DDS a base di chitosano, potenzialmente più maneggevoli per l'applicazione diretta nelle tasche parodontali, sono stati presi in esame in questo lavoro di tesi, vale a dire film e membrane elettrofilate composte da chitosano e PEO.

Anche i risultati derivanti dalle cinetiche di *uptake* e di rilascio di DC e TC da parte di film di chitosano, resi insolubili in acqua per trattamento basico o reticolazione con EGDE, sono in buon accordo sperimentale con il modello di pseudo-secondo ordine e quindi con la presenza di una cinetica mista. Dal confronto con i dati ricavati dagli idrogeli, sono emerse differenze nelle quantità di farmaco assorbito e rilasciato a parità di condizioni sperimentali, che risultano di non facile interpretazione e necessitano pertanto di ulteriori approfondimenti. In ogni caso, informazioni ricavate da film a diversa densità sembrano suggerire una correlazione tra grado di porosità del film e capacità di assorbimento e di rilascio del sistema, come ipotizzato per gli idrogeli.

Risultati molto interessanti sono stati ottenuti dalle membrane elettrofilate di chitosano e PEO, principalmente in virtù della loro struttura a "filo di perle" in cui *beads* di diametro di circa 400 nm, potenzialmente utilizzabili come *reservoir* a rilascio lento del farmaco, sono connesse con fili di circa 50 nm di spessore e di circa 1000 nm di lunghezza. Misure preliminari di *uptake* di DC da parte di queste membrane hanno dato anche per questo sistema andamenti cinetici di tipo misto, capaci però di caricare quantità di DC superiori di circa un ordine di grandezza rispetto agli idrogeli sferici di chitosano di dimensione millimetrica.

Complessivamente i risultati ottenuti sembrano evidenziare una stretta correlazione tra modalità e tempi di rilascio dei farmaci e morfologia dei DDS a base di chitosano, correlazione che dovrà essere indagata più approfonditamente in futuro, anche in funzione delle dinamiche di degradazione del chitosano in ambiente acquoso.

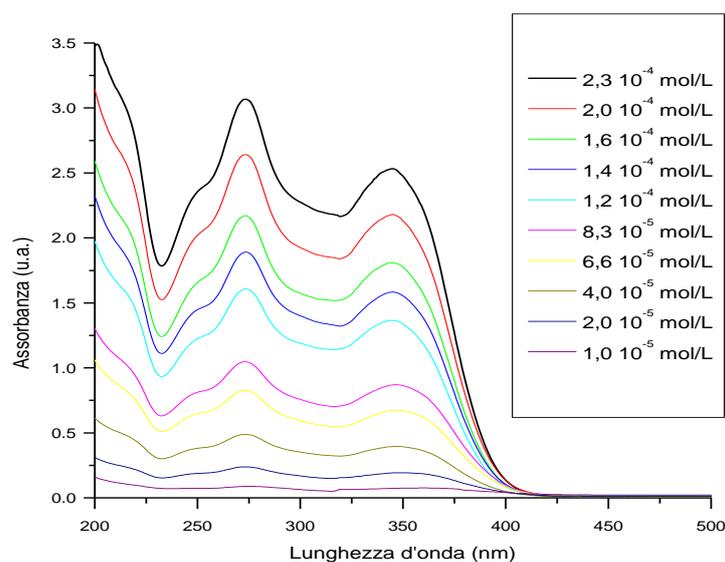
Per quanto riguarda la diversa affinità riscontrata per DC e TC da parte dei sistemi preparati, almeno nel ventaglio delle condizioni sperimentali esplorato, i risultati ottenuti potrebbero essere fortemente condizionati dalla ridotta solubilità in acqua del cortisonico rispetto all'antibiotico, che ha obbligato lo studio degli andamenti cinetici in miscele di acqua-etanolo anziché in soluzioni simil-fisiologiche. Per cui sarà necessario in futuro studiare l'effetto dell'alcol sulla stabilità di

questi sistemi per controllare le ricadute sulle loro capacità di veicolare questi farmaci.

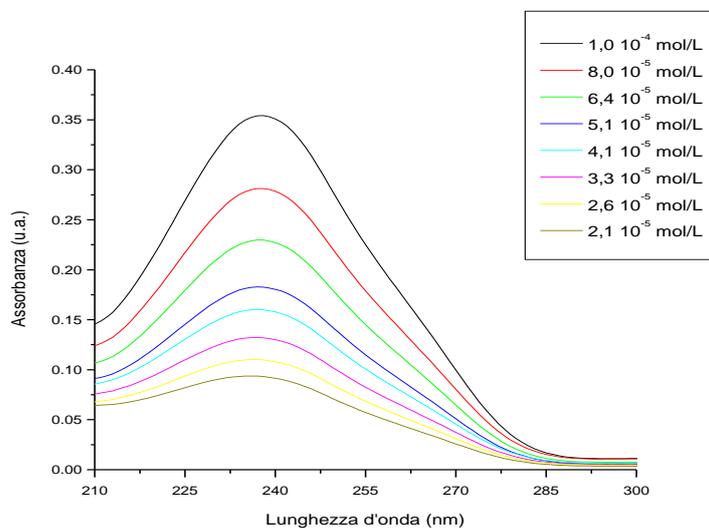
Capitolo 7

Appendice

Spettri ottenuti dalle diverse soluzioni acquose di DC di concentrazione variabile da $1,0 \cdot 10^{-5}$ a $2,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L usate per la costruzione della retta di calibrazione.

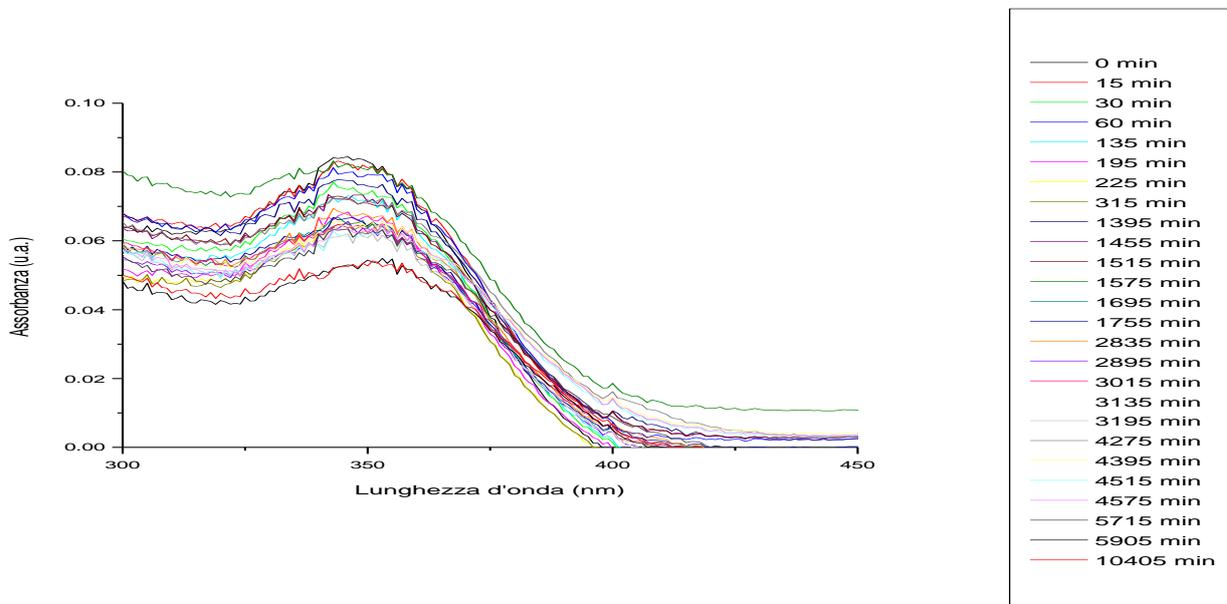


Spettri ottenuti dalle diverse soluzioni alcoliche di TC di concentrazione variabile da $2,1 \cdot 10^{-5}$ a $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L usate per la costruzione della retta di calibrazione.

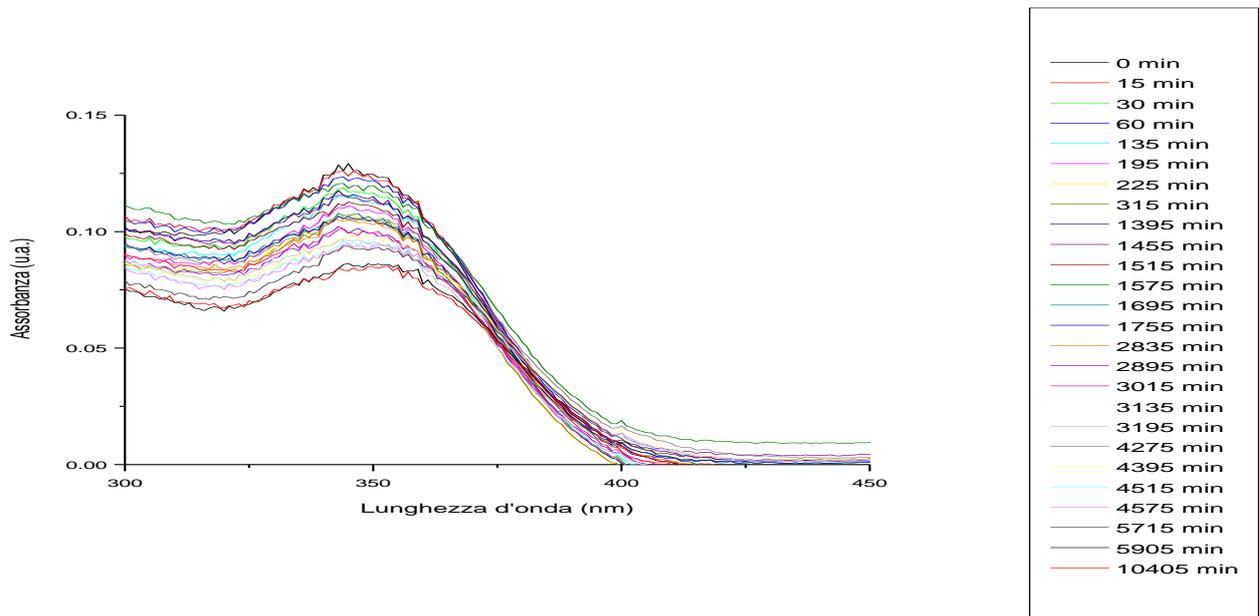


Spettri di assorbimento acquisiti per lo studio dell'*uptake* di DC da parte di idrogeli di chitosano relativi alle 8 concentrazioni studiate (da $4 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) per la costruzione dell'isoterma di equilibrio di assorbimento.

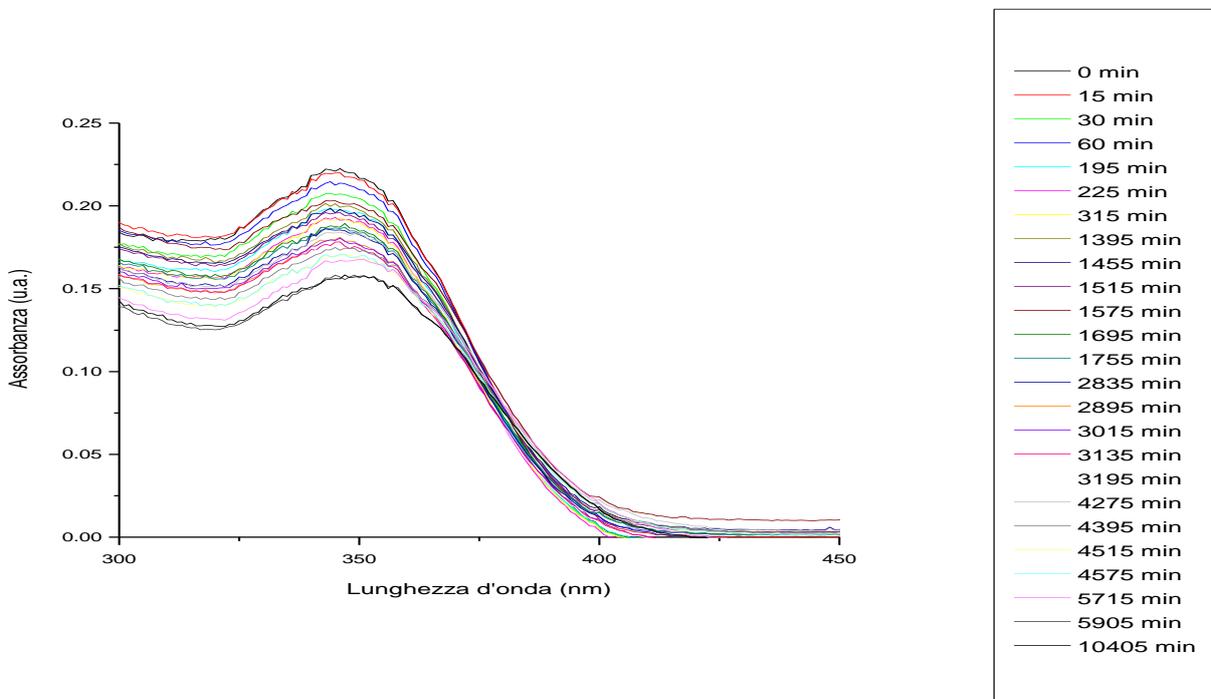
a) Prima concentrazione: $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L



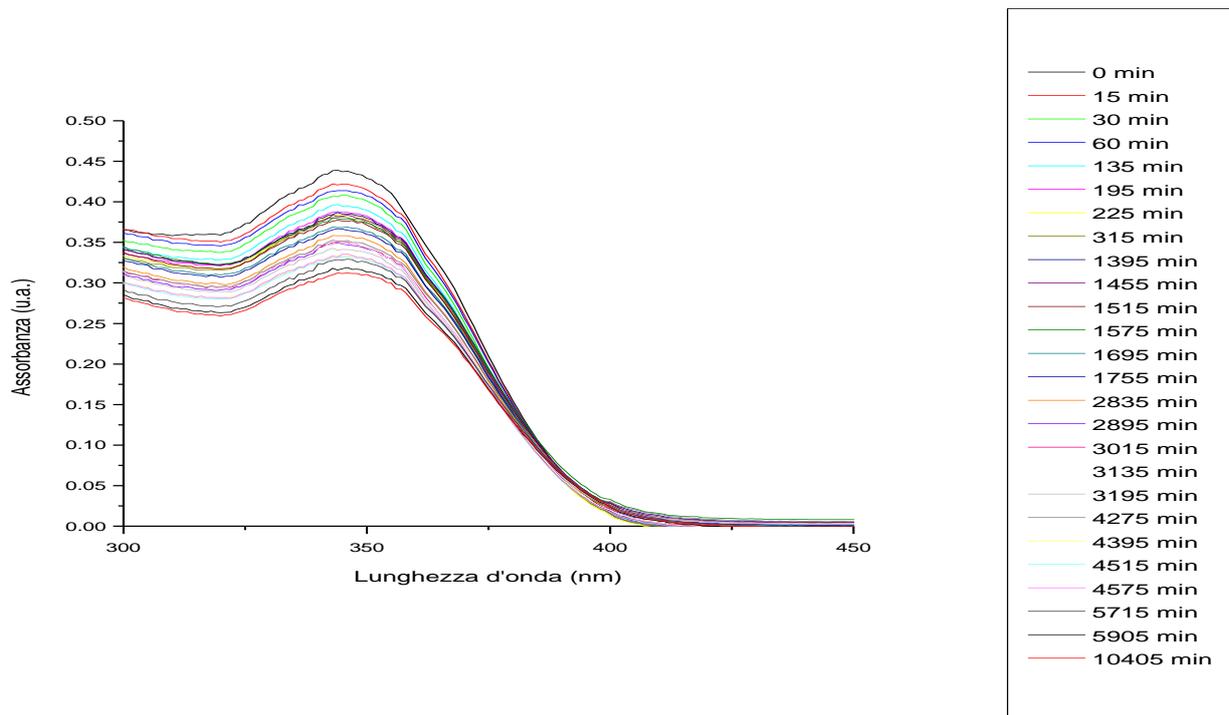
b) Seconda concentrazione: $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L



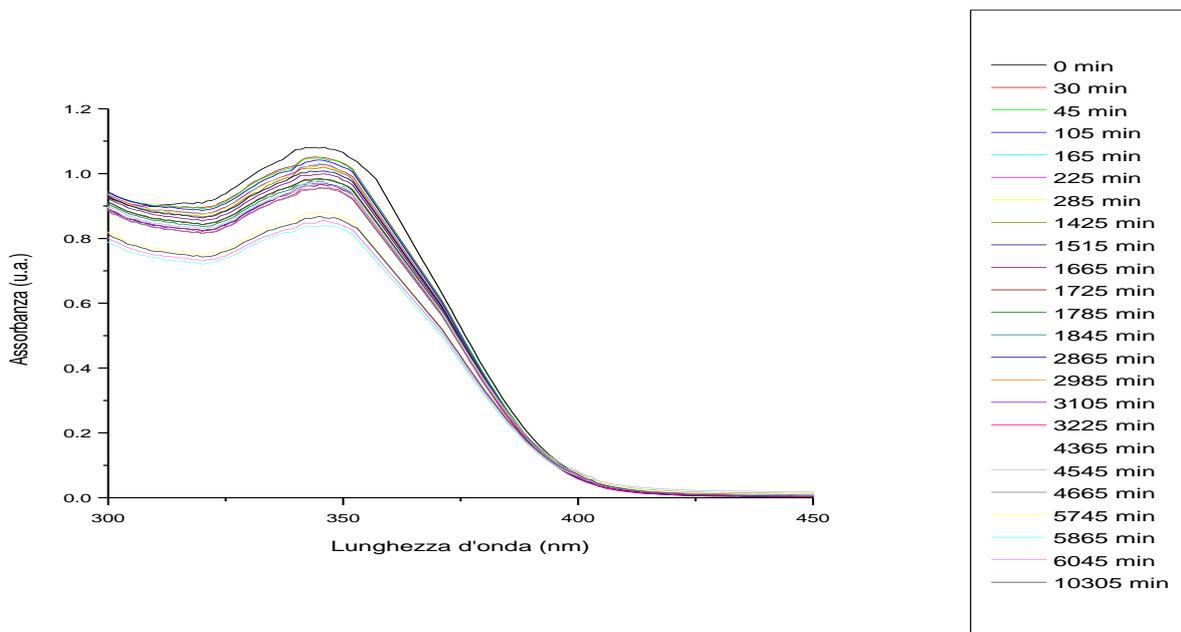
c) Terza concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L



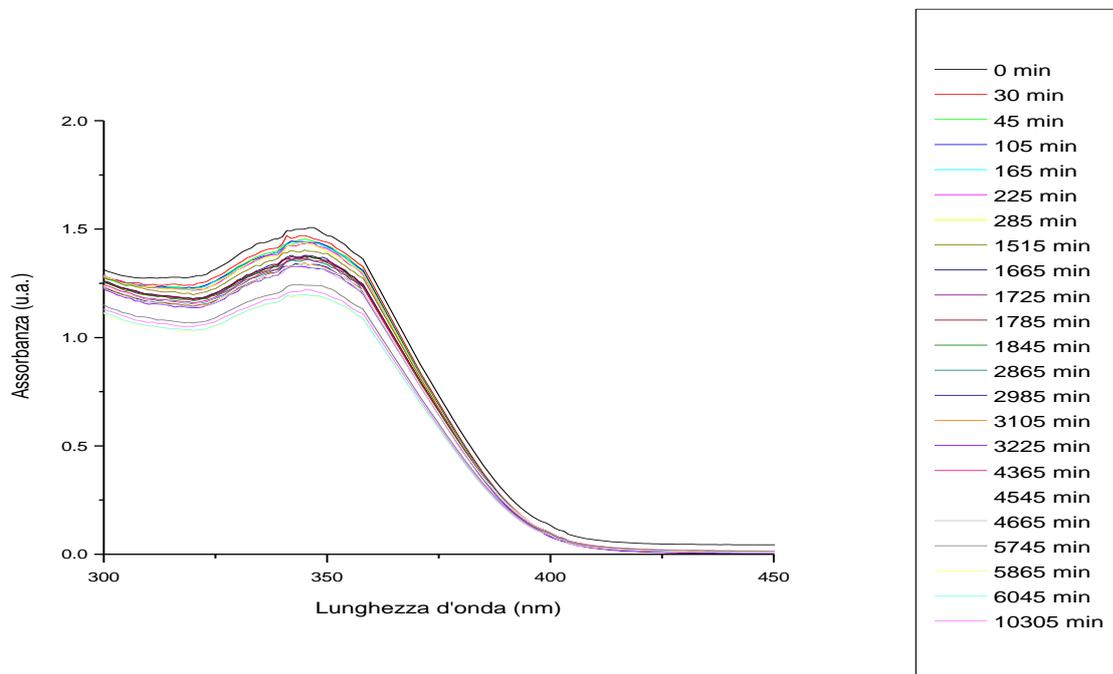
d) Quarta concentrazione: $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L



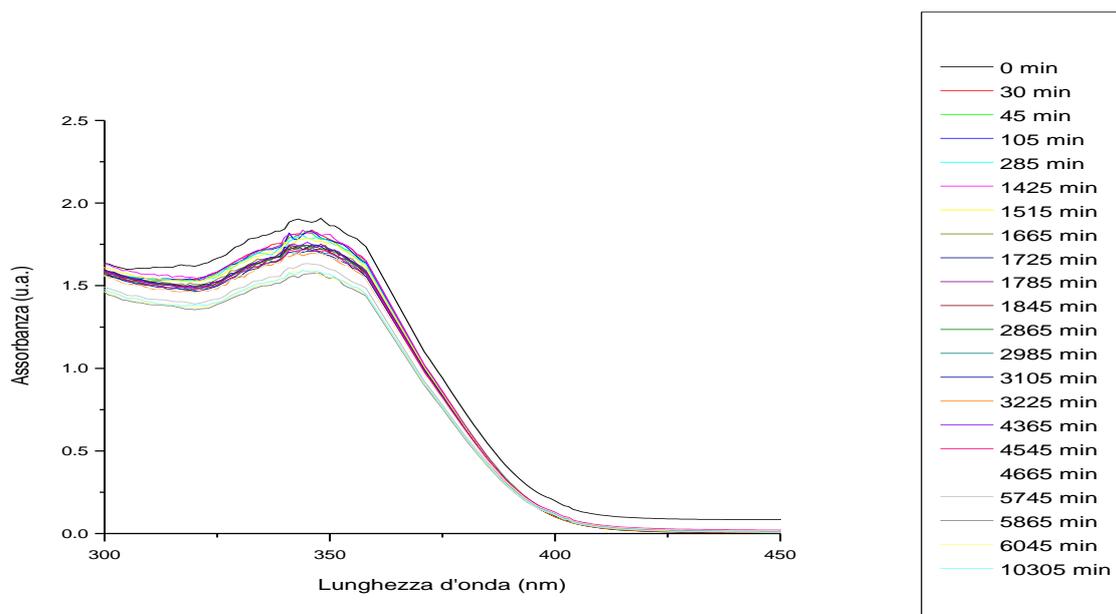
e) Quinta concentrazione: $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L



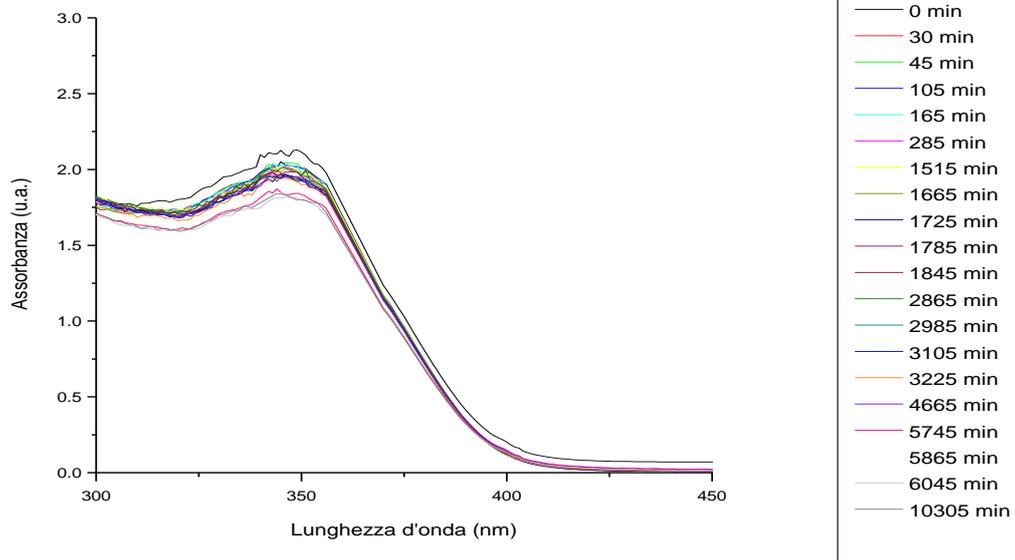
f) Sesta concentrazione: $7 \cdot 10^{-4}$ mol/L



g) Settima concentrazione: $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L

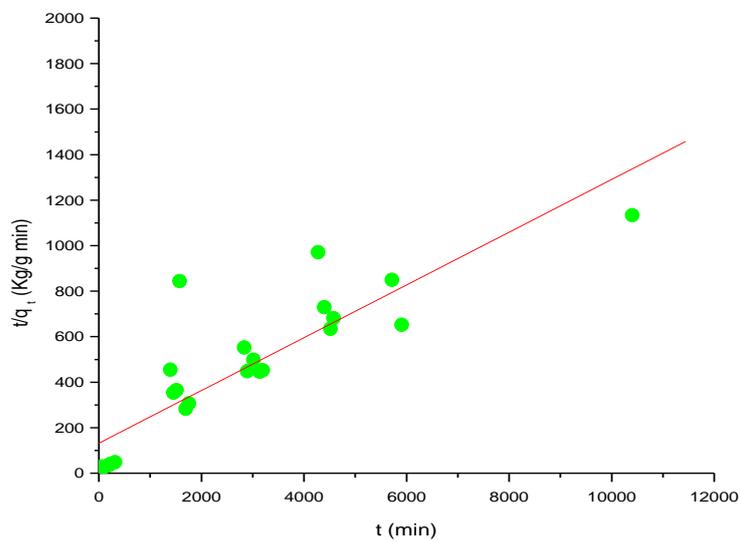
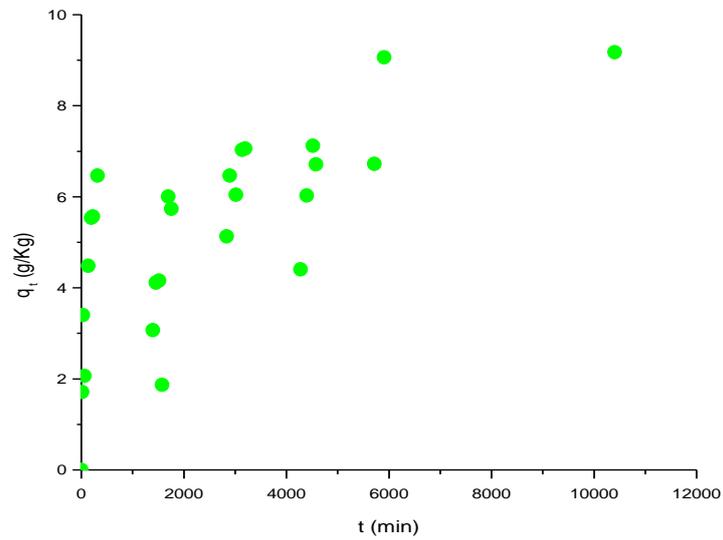


h) Ottava concentrazione: $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L

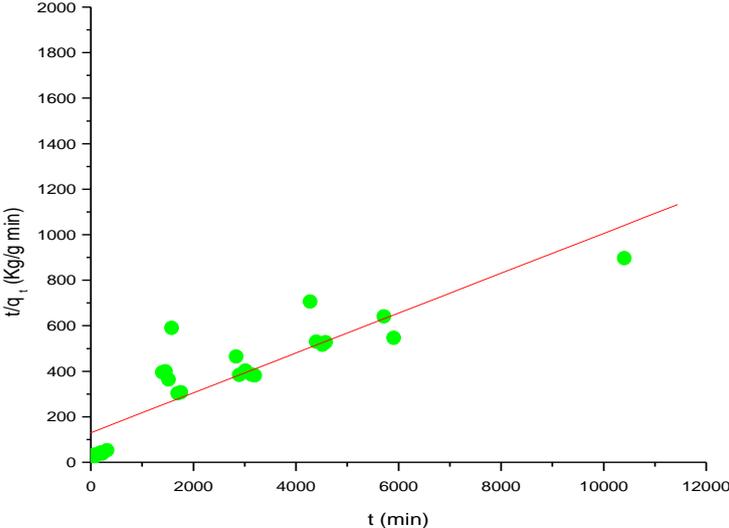
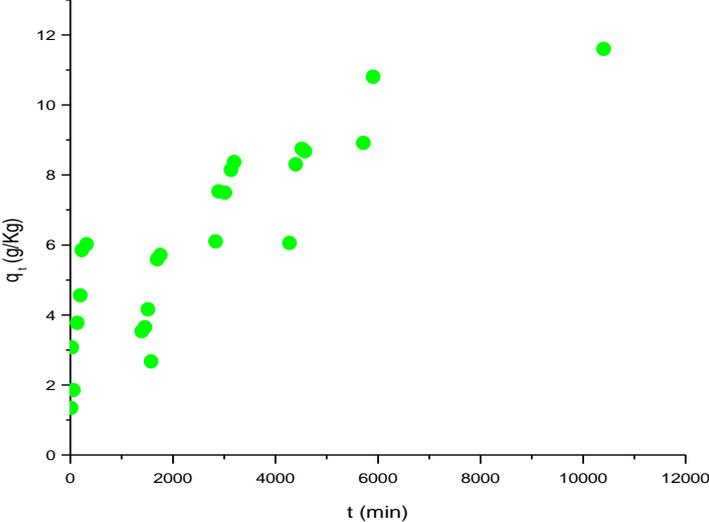


Andamenti di q_t (g/Kg) e t/q_t (Kg/g min) in funzione del tempo ricavati dagli idrogeli messi ad equilibrare con le 8 concentrazioni di DC studiate (da $4 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) per la costruzione dell'isoterma di equilibrio di assorbimento.

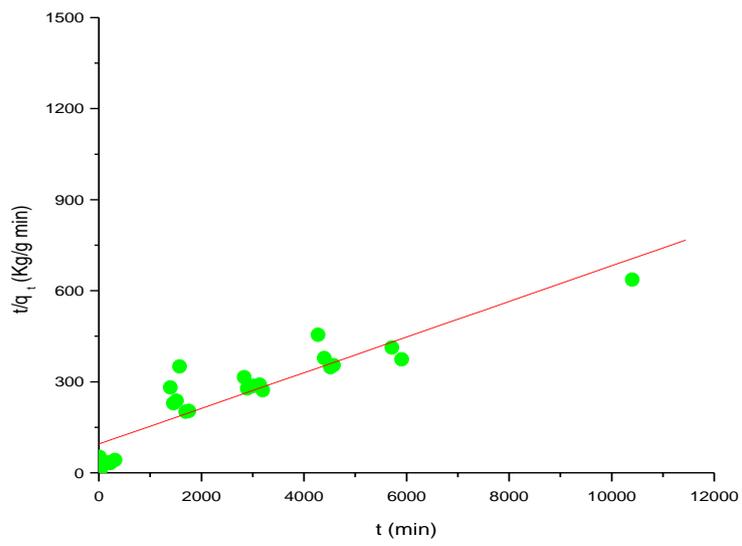
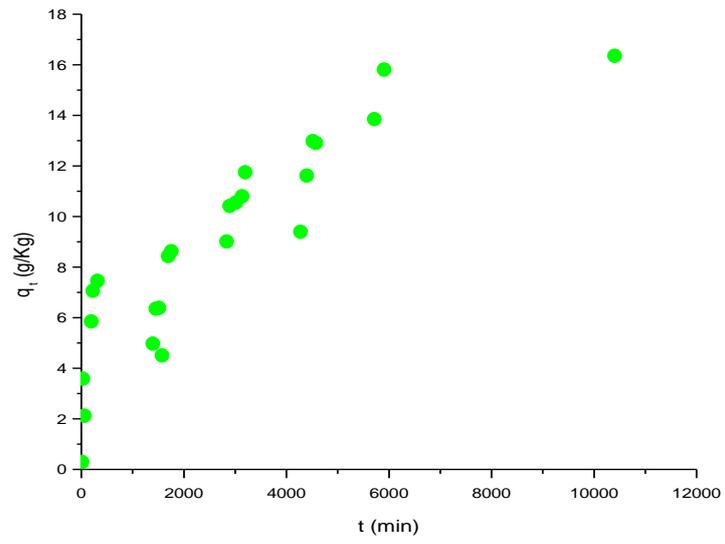
a) Prima concentrazione: $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L



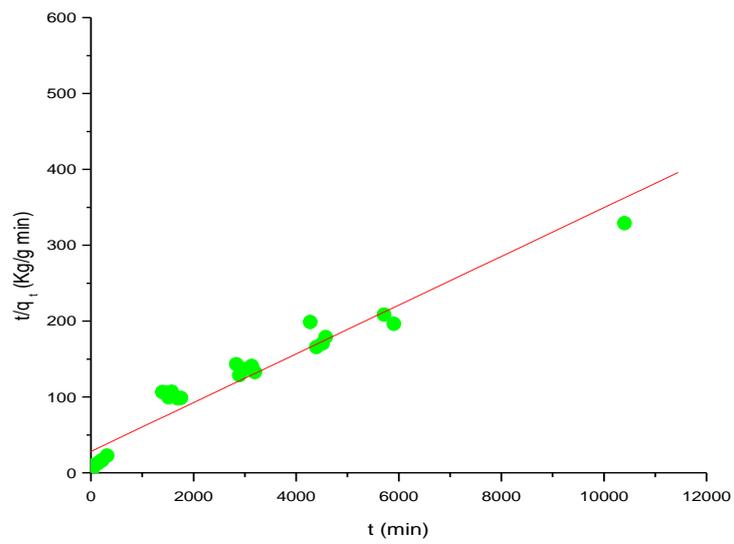
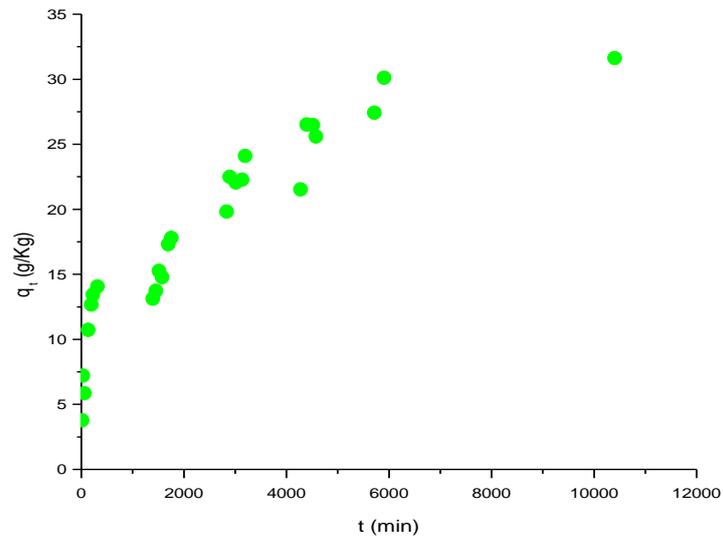
b) Seconda concentrazione: $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L



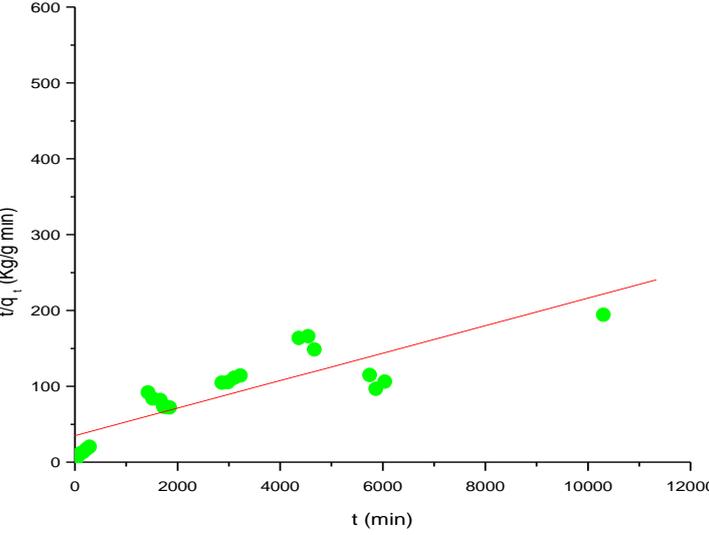
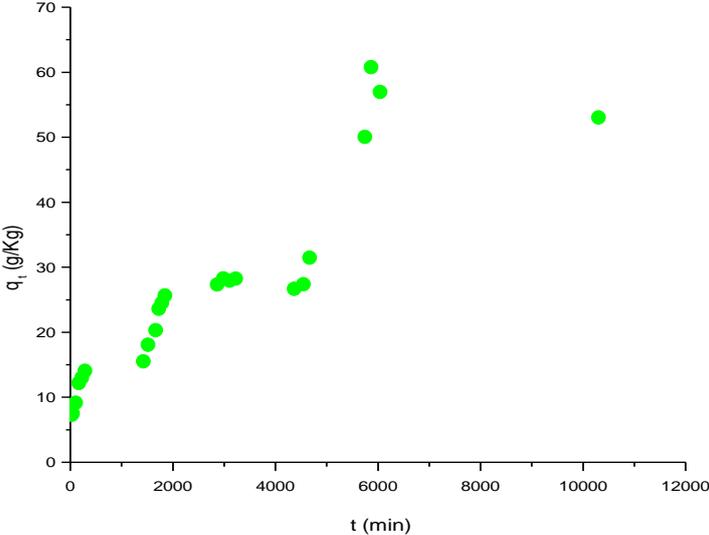
c) Terza concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L



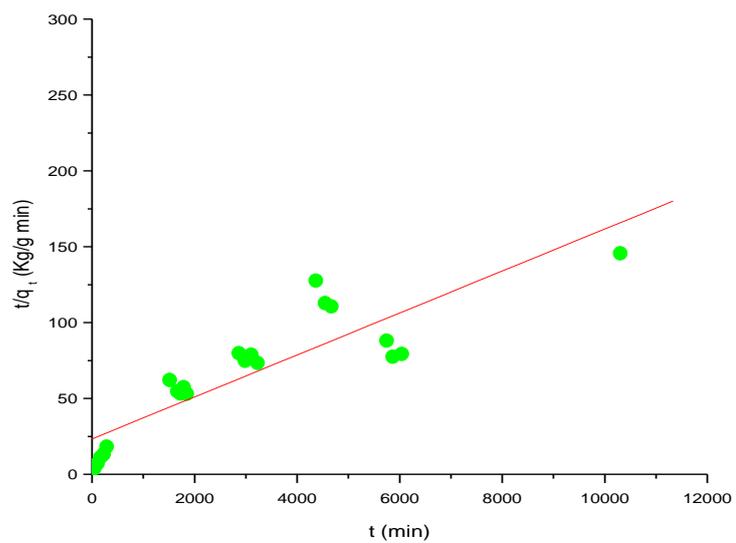
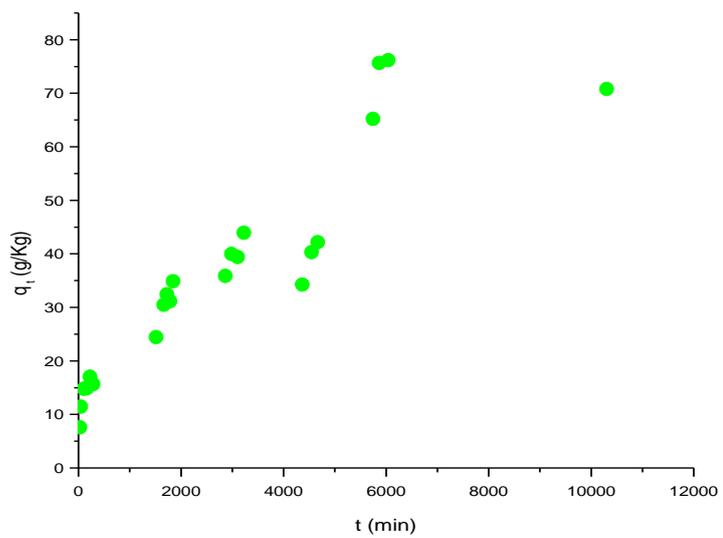
d) Quarta concentrazione: $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L



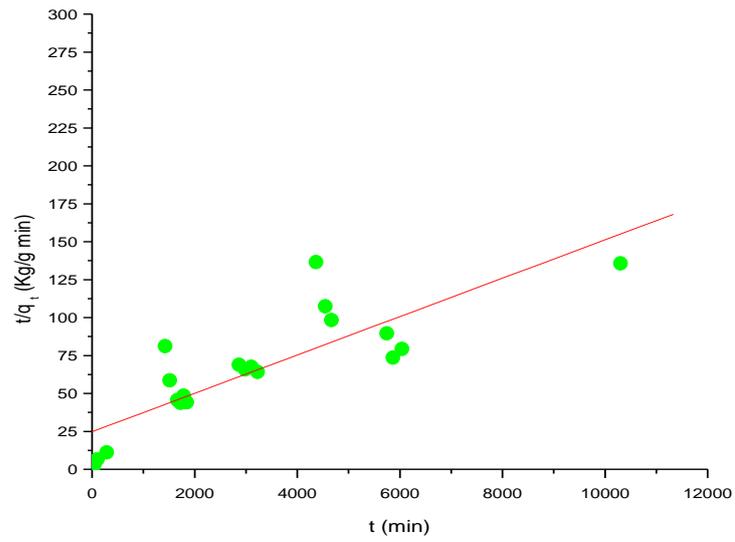
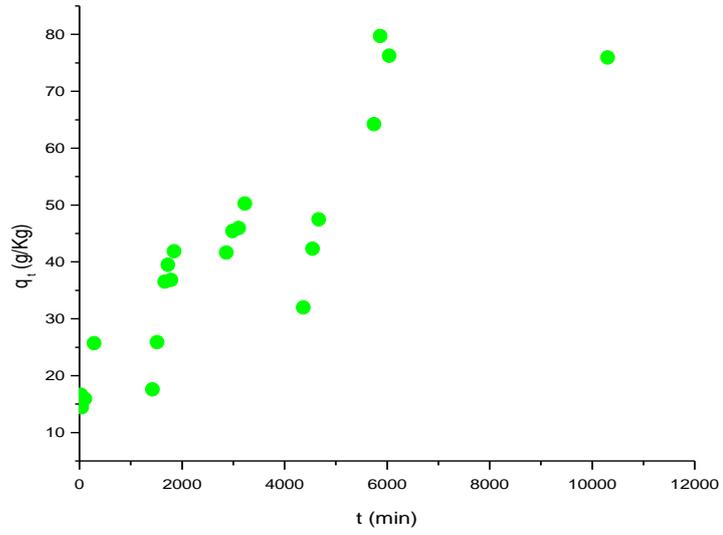
e) Quinta concentrazione: $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L



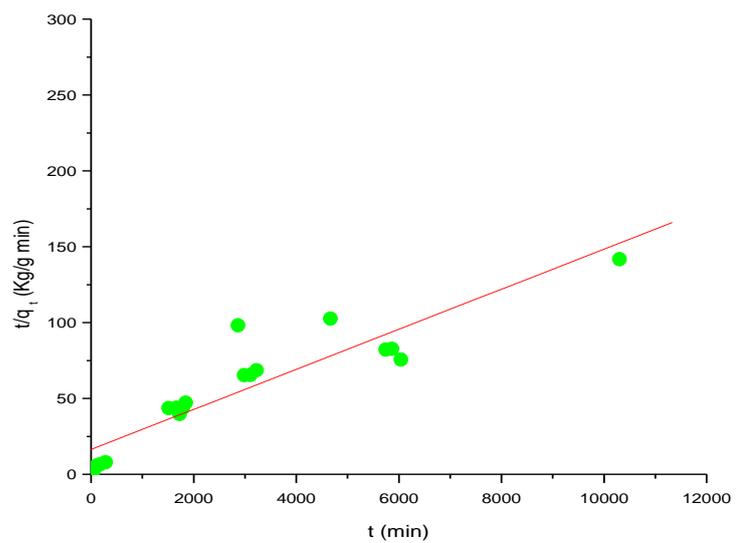
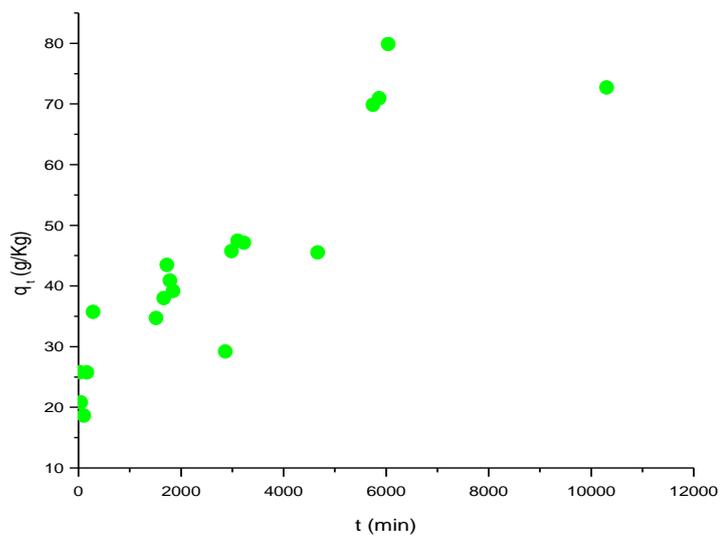
f) Sesta concentrazione: $7 \cdot 10^{-4}$ mol/L



g) Settima concentrazione: $9 \cdot 10^{-4}$ mol/L

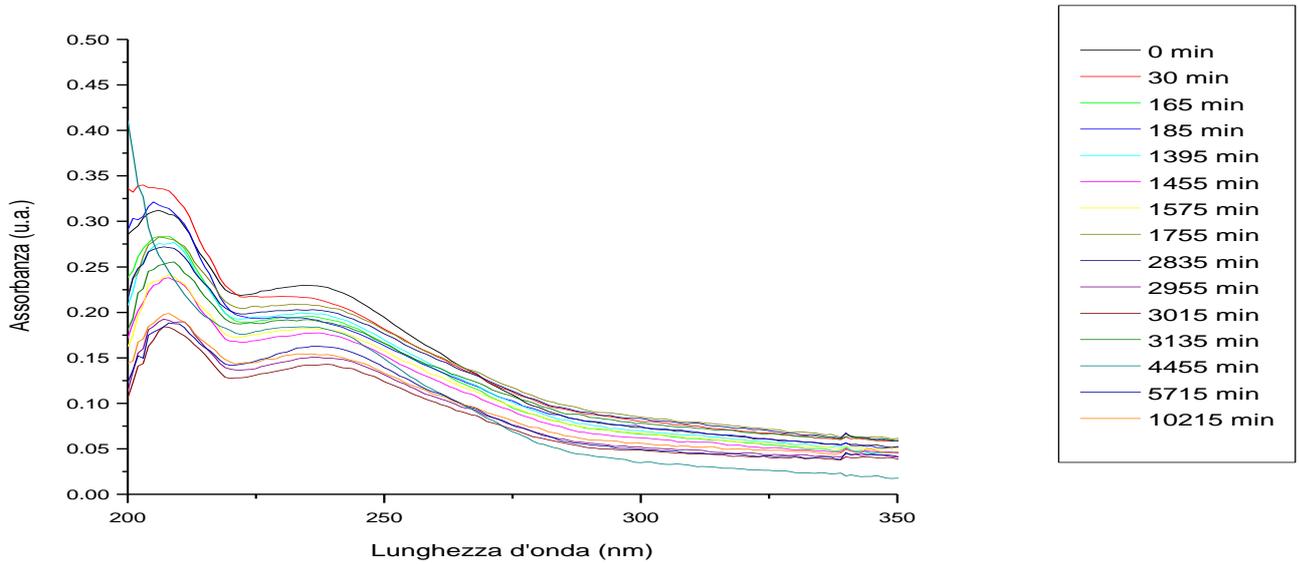


h) Ottava concentrazione: $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L

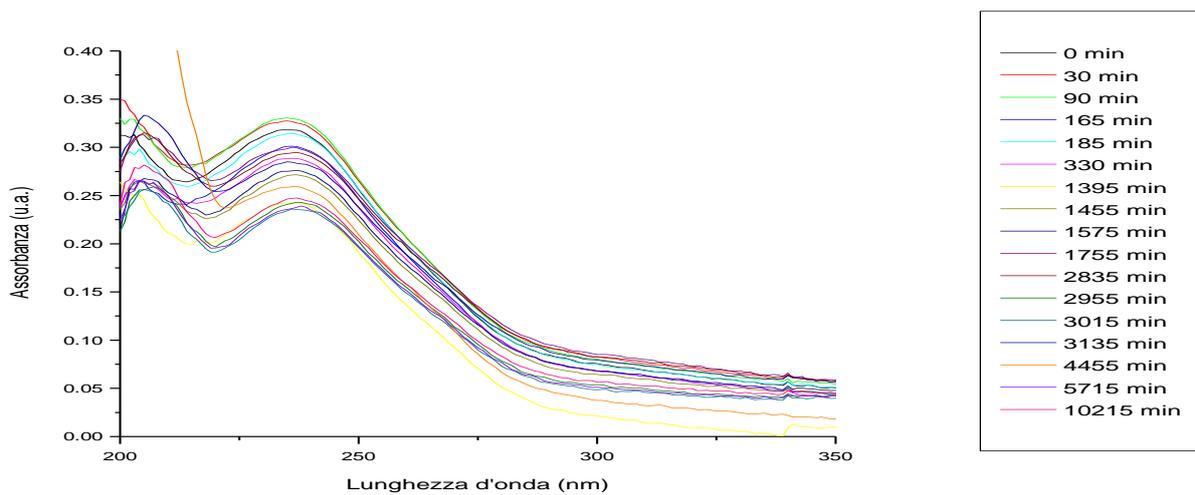


Spettri di assorbimento acquisiti per lo studio dell'*uptake* di TC da parte di idrogeli di chitosano relativi alle 7 concentrazioni studiate (da $5 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L) per la costruzione dell'isoterma di equilibrio di assorbimento.

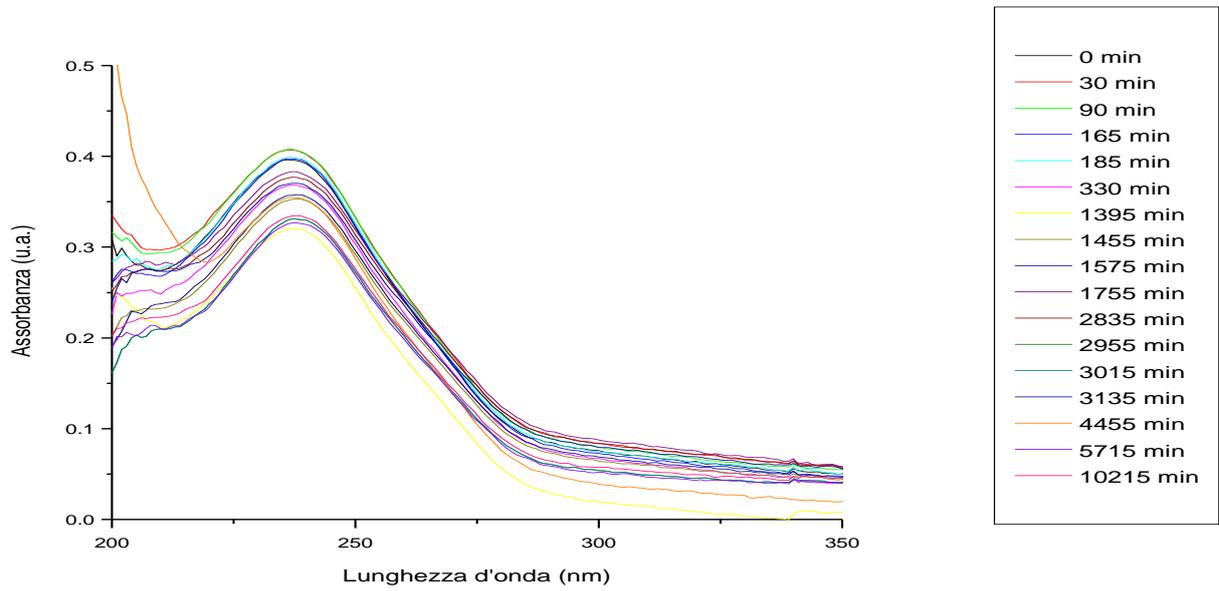
a) Prima concentrazione: $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L



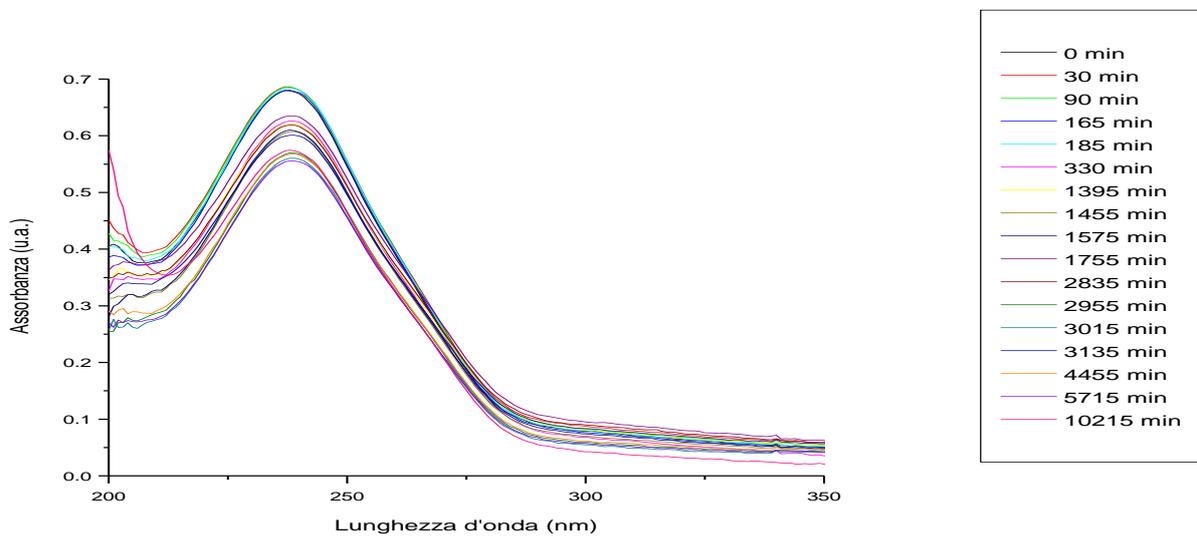
b) Seconda concentrazione: $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L



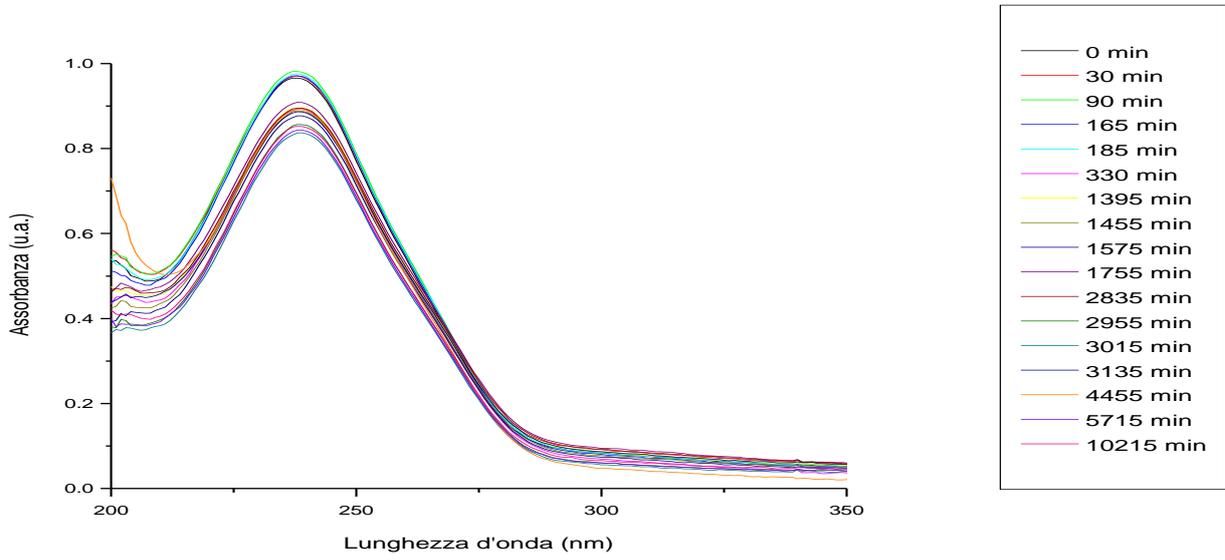
c) Terza concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L



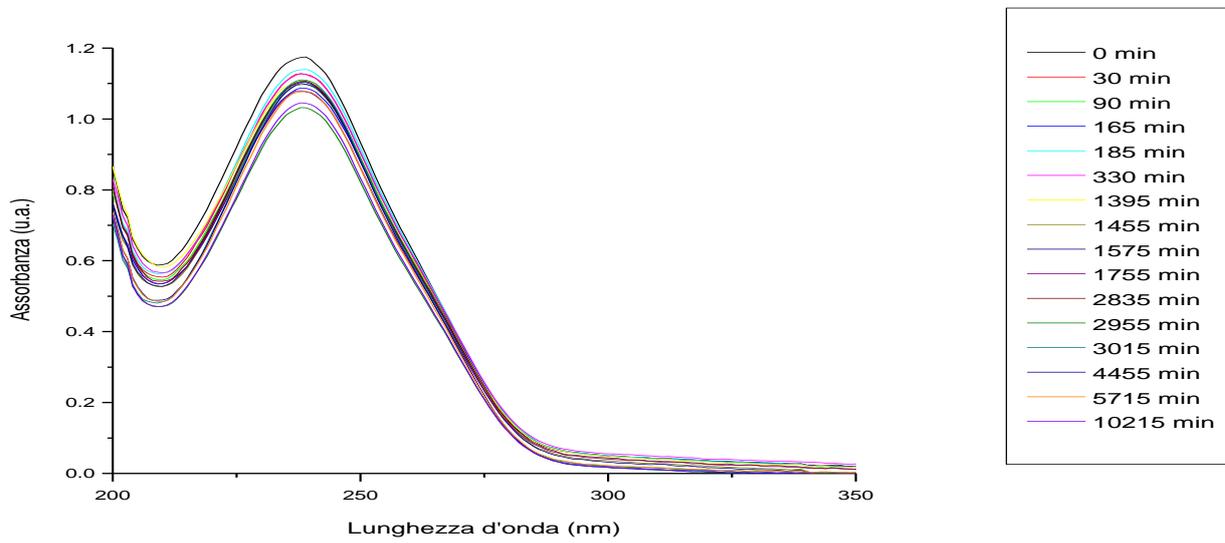
d) Quarta concentrazione: $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L



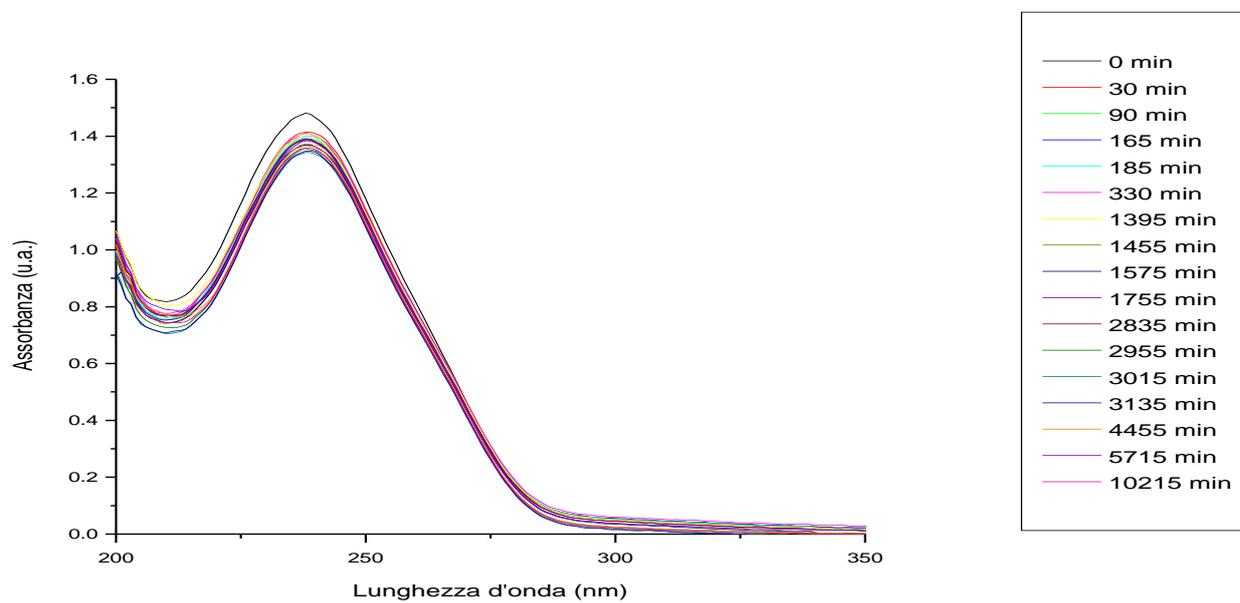
e) Quinta concentrazione: $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L



f) Sesta concentrazione: $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L

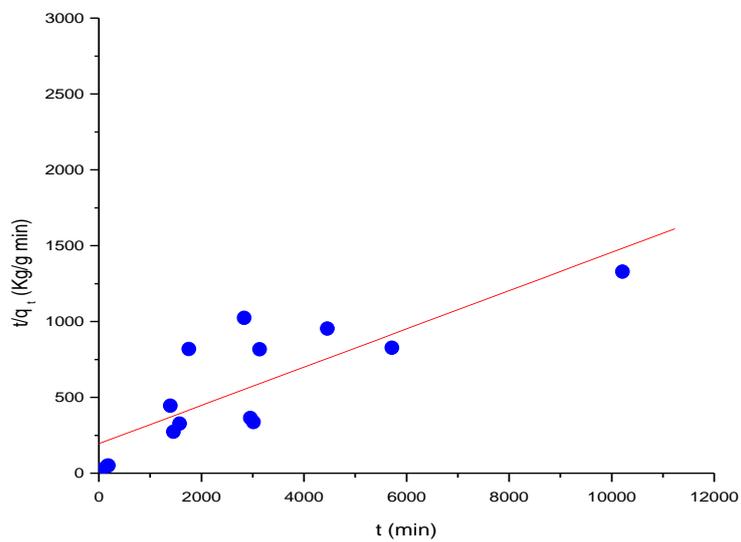
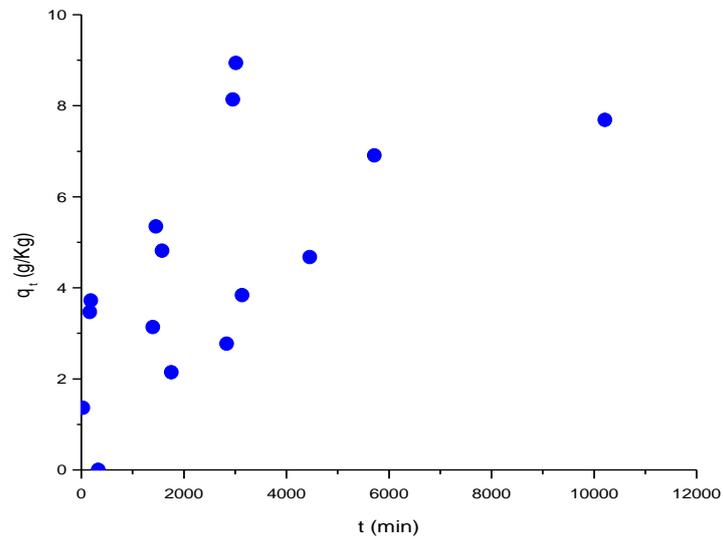


g) Settima concentrazione: $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L

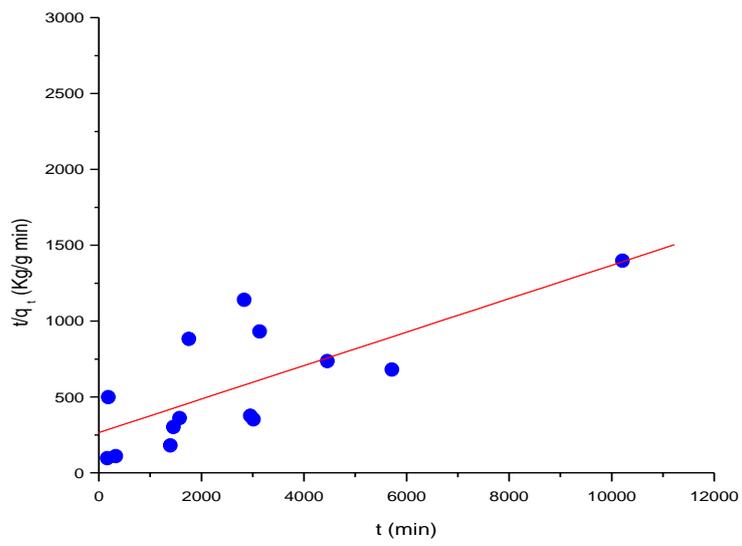
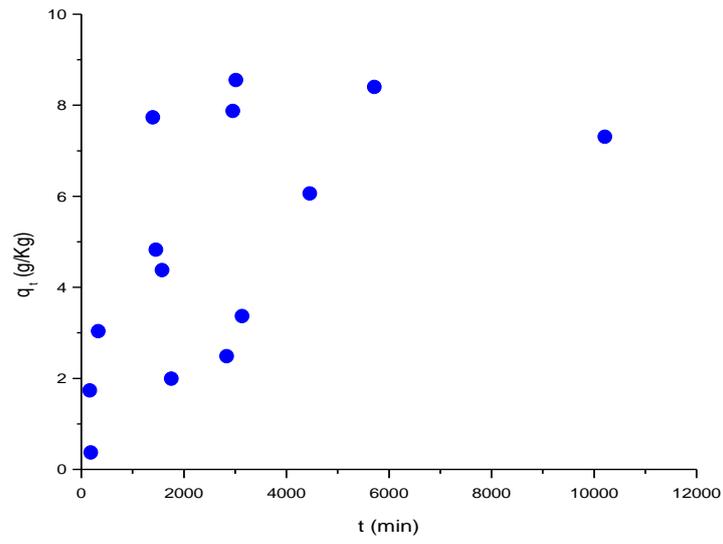


Andamenti di q_t (g/Kg) t/q_t (Kg/g min) in funzione del tempo ricavati dagli idrogeli messi ad equilibrare con le 7 concentrazioni di TC studiate (da $5 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L) per la costruzione dell'isoterma di equilibrio di assorbimento.

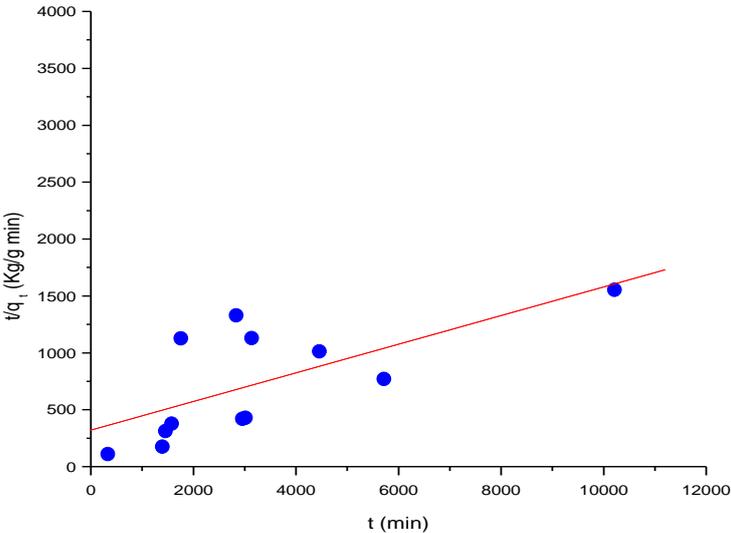
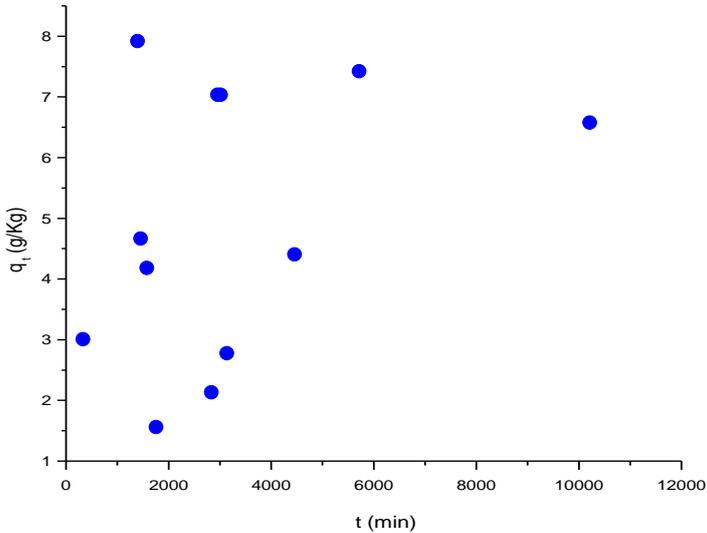
a) Prima concentrazione: $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L



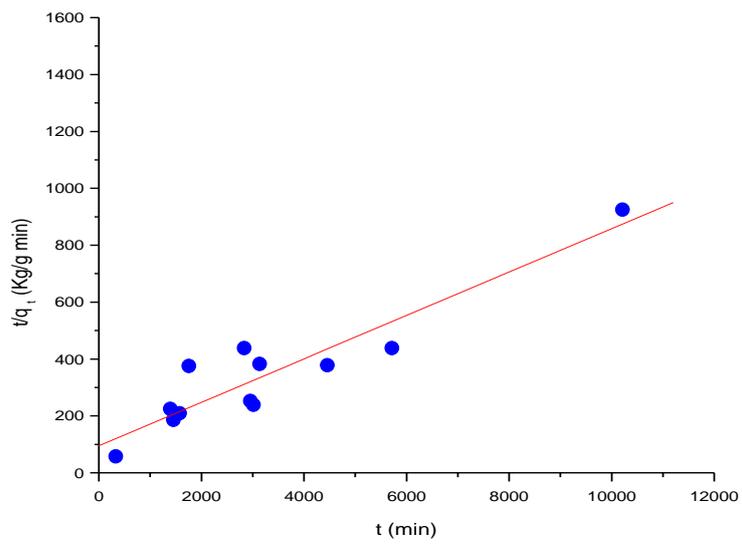
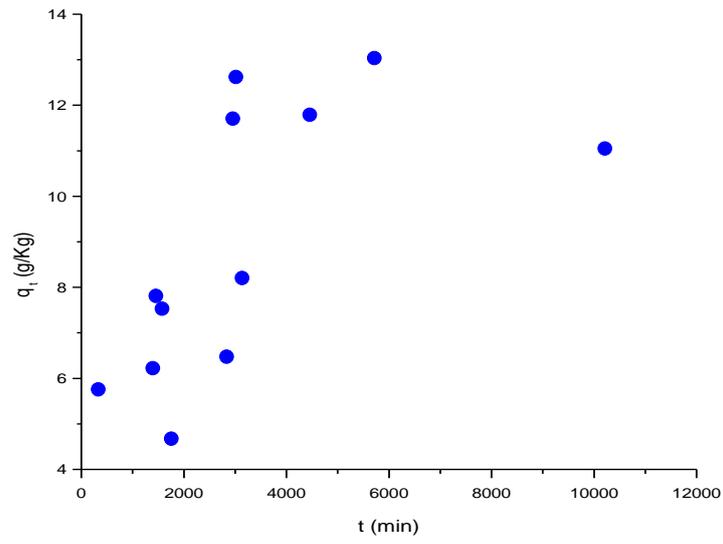
b) Seconda concentrazione: $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L



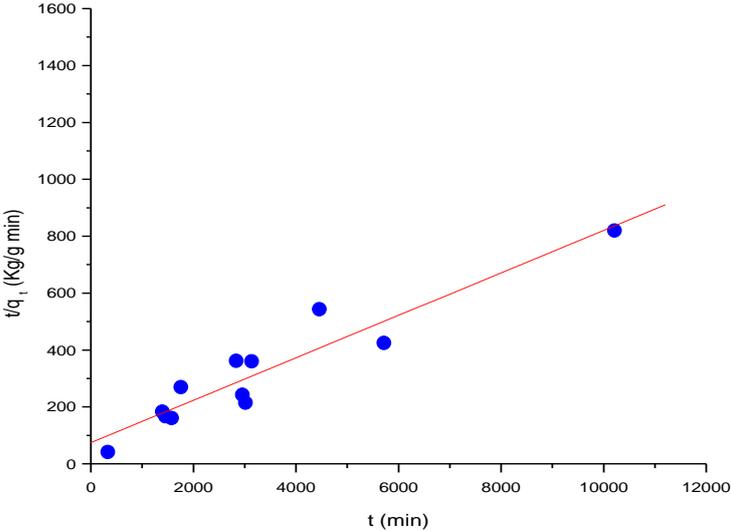
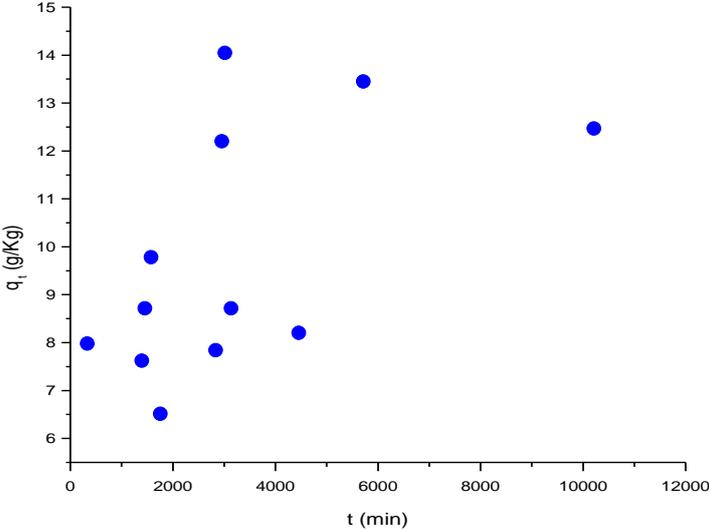
c) Terza concentrazione: $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L



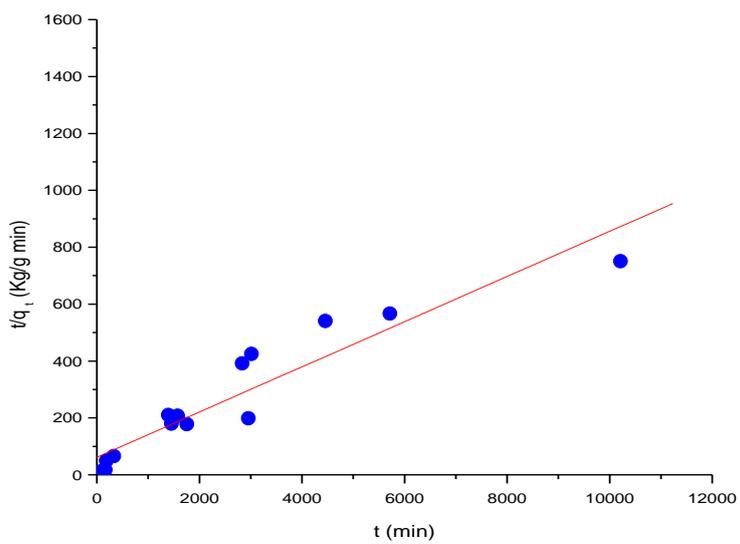
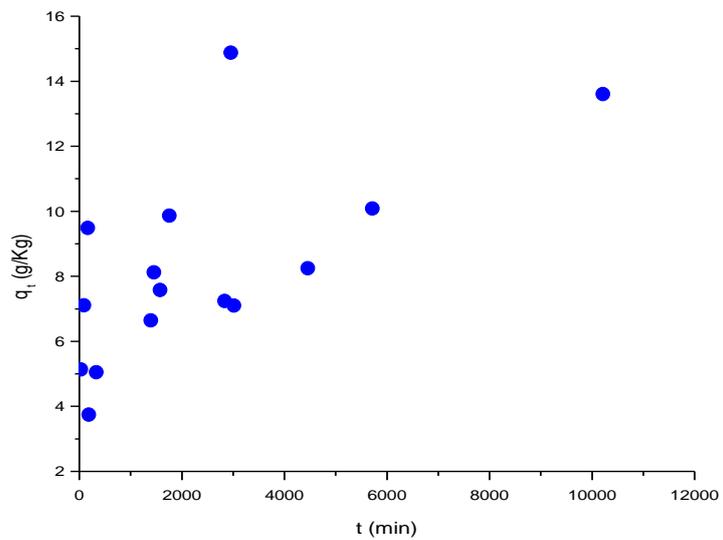
d) Quarta concentrazione: $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L



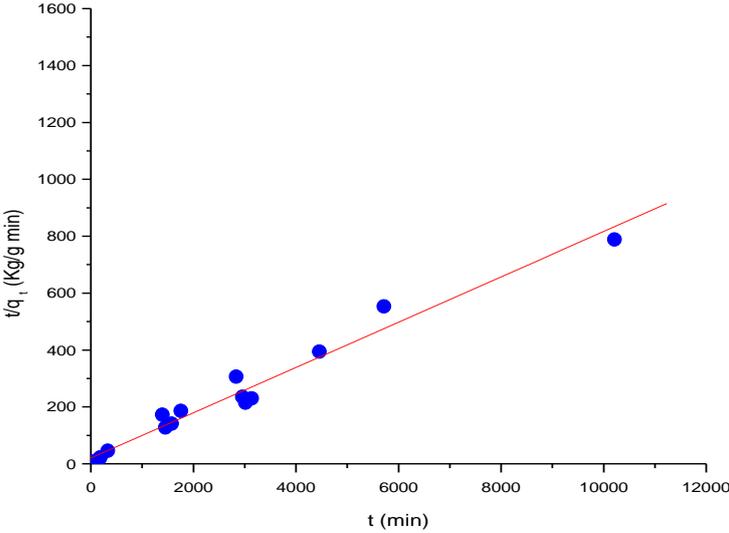
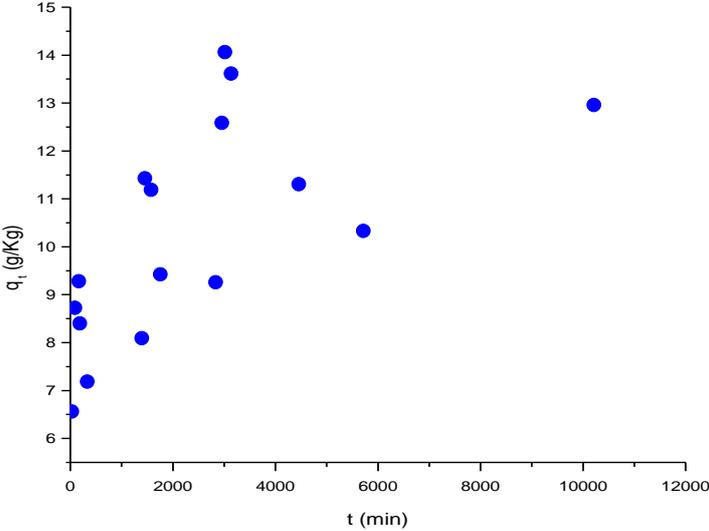
e) Quinta concentrazione: $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L



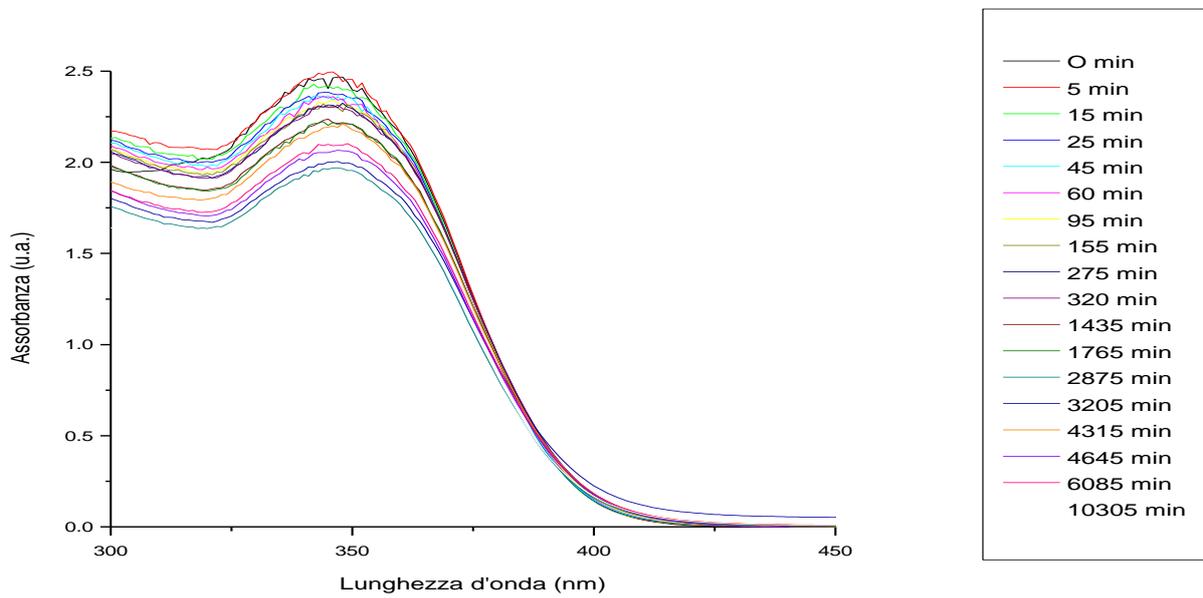
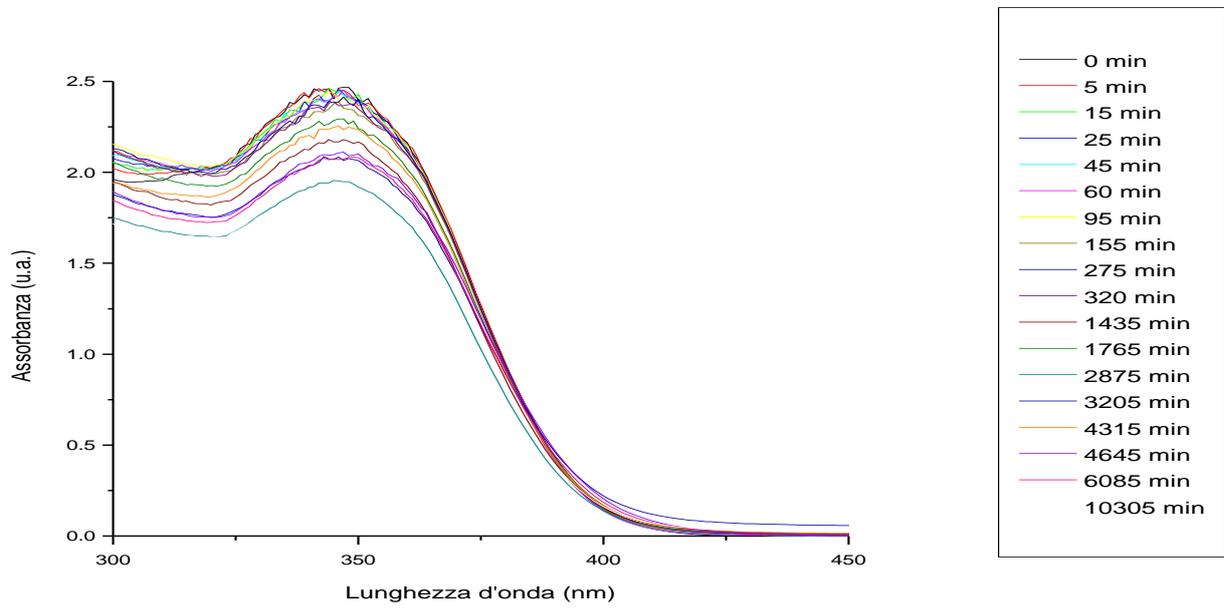
f) Sesta concentrazione: $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L



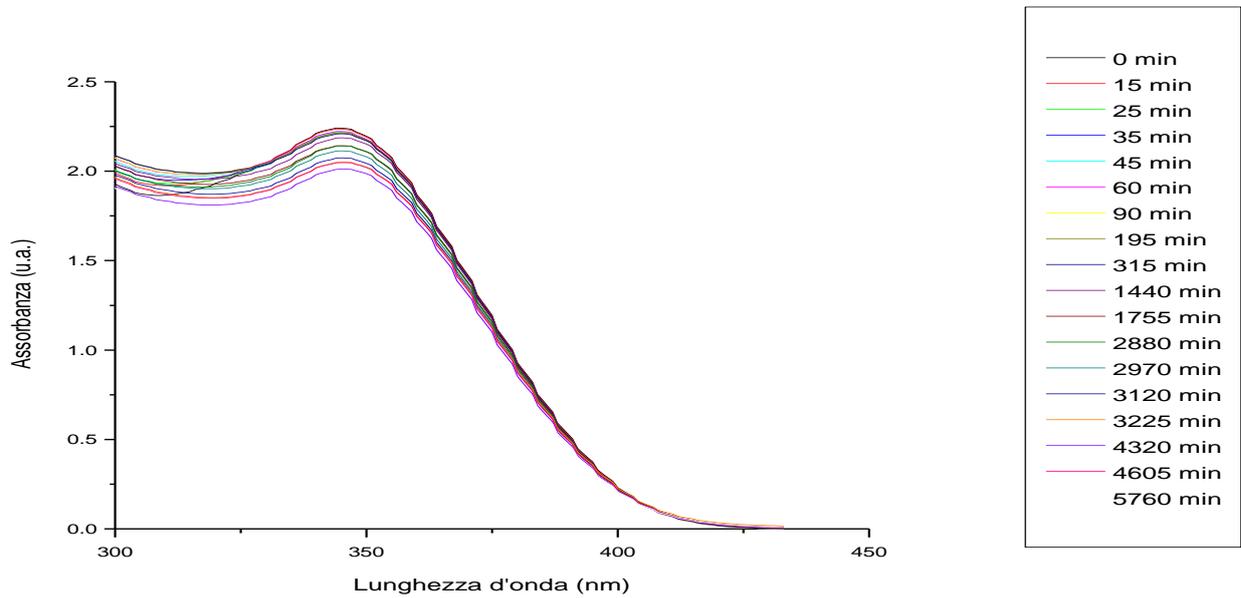
g) Settima concentrazione: $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L



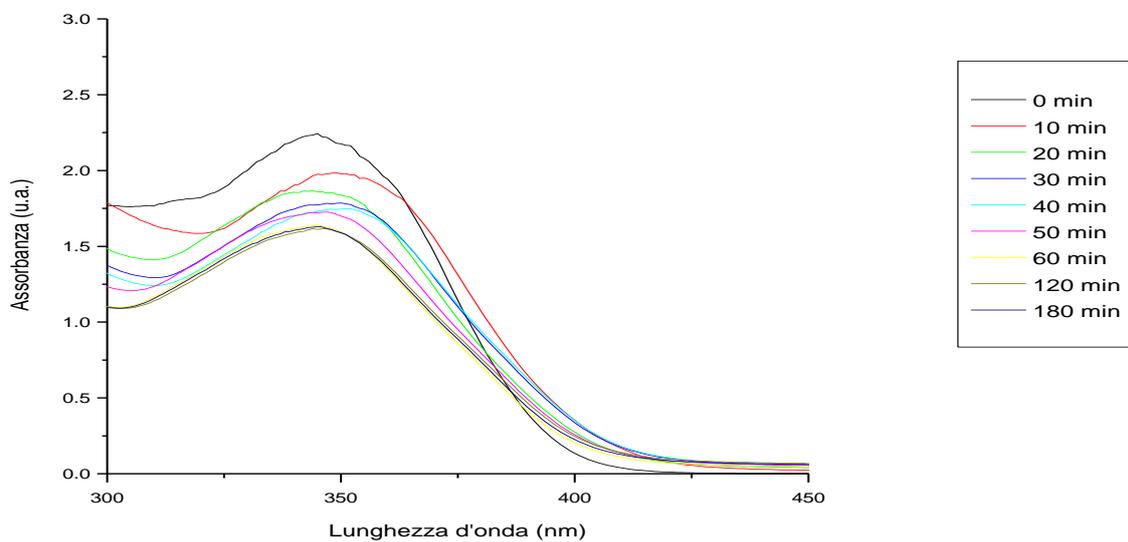
Spettri di assorbimento acquisiti per lo studio dell'*uptake* di DC da parte di idrogeli di chitosano deacetilato (deac1 e deac3).



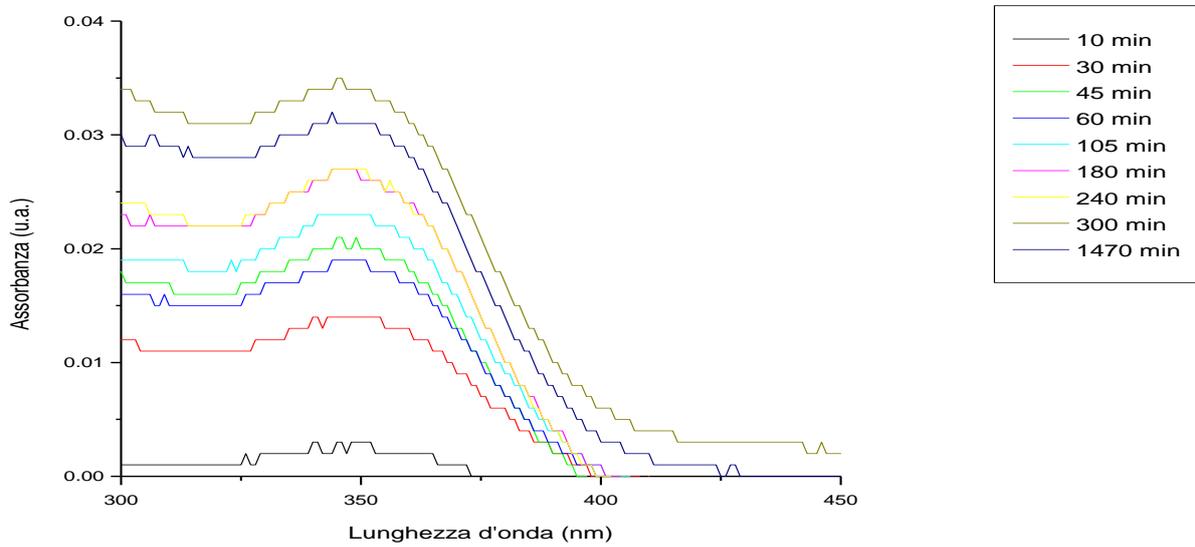
Spettri di assorbimento acquisiti per lo studio dell'*uptake* di DC da parte del film di chitosano reticolato con EGDE.



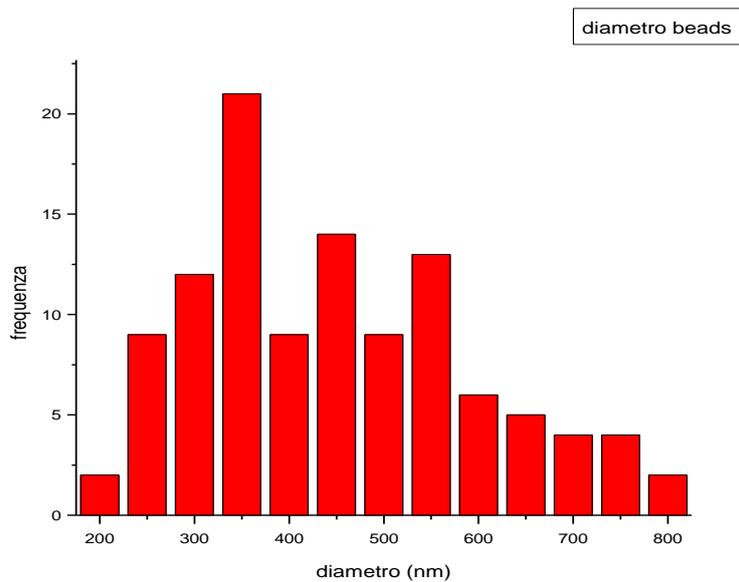
Spettri di assorbimento acquisiti per lo studio dell'*uptake* di DC da parte della membrana di chitosano MMW/PEO.

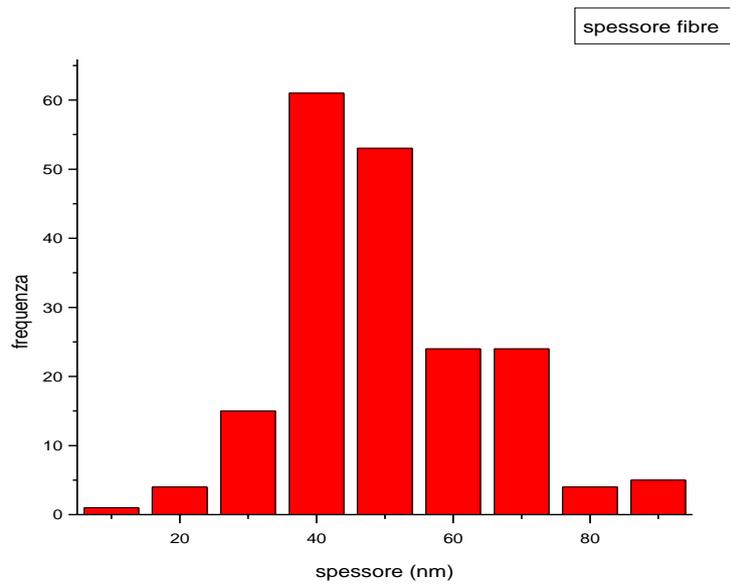
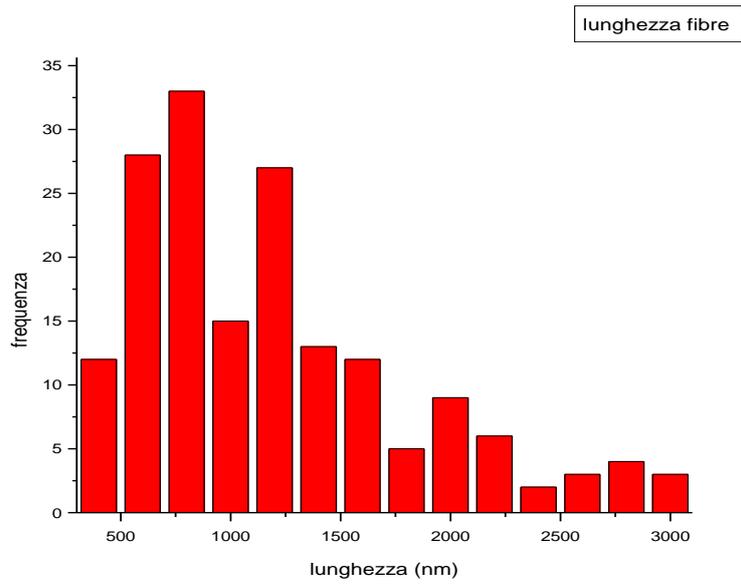


Spettri di assorbimento acquisiti per lo studio del desorbimento di DC da parte del film di chitosano ottenuto da una soluzione del polimero al 3% w/v.



Analisi dimensionale della membrana di chitosano MMW/PEO: *beads* (diametro) e fibre (lunghezza e spessore) costituenti la membrana di chitosano MMW/PEO.





Bibliografia

[1] (a) Closas L. M., Pelacho A. M., Agronomic potential of biopolymer films, *Biopolymers – new materials for sustainable films and coatings*, Plackett D. Ed. (2011); (b) Bertrand N., Gauthier N. A., Bouvet C., Moreau P., Petitjean A., Leroux J.-C., Leblond J., New pharmaceutical applications for macromolecular binders, *Journal of Controlled Release*, 155(2) (2011), 200-210; (c) Tang X. Z., Kumar P., Alavi S., Sandeep K. P., Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(5), (2012), 426-442; (d) Kalla S., Thakur K., Celli A., Kiechel M. A., Schauer C. L., Surface modification of plant fibers using environment friendly methods for their application in polymer composites, textile industry and antimicrobial activities: A review, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(3) (2013), 97-112; (e) Li X., Cui R., Sun L., Aifantis K. E., Fan Y., Feng Q., Cui F., Watari F., 3D-printed biopolymers for tissue engineering application, *International Journal of Polymer Science*, (2014), 1-13; (f) Hamed I., Ozogul F., Regenstein J. M., Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review, *Trends in food science & technology*, 48 (2016), 40-50.

[2] (a) Oh J. K., Drumright R., Siegwart D. J., Matyjaszewski K., The development of microgels/nanogels for drug delivery applications, *Progress in Polymer Science*, 33(4) (2008), 448-477; (b) Kumari A., Yadav S. K., Yadav S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 75(1) (2010), 1-18.

[3] (a) Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki S., Yamamoto A., Muranishi S., Chitosan capsules for colon specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(9) (1997), 1016-1021; (b) Felt O., Burl P., Buri P., Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(11) (1998), 979-993; (c) Senel S., Ikinci G., Kas S., Yousefi-Rad A., Sargon M. F., Hincal A. A., Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 193 (2000), 197-203; (d) Denkbas E. M., Ottenbrite R. M., Perspectives on chitosan drug delivery systems based on their geometries, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21(4) (2006), 351-368; (e) Sonia T. A., Sharma C. P., Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective, *Chitosan for Biomaterials I*, (2011),

23-53.

[4] (a) Perugini P., Conti G. B., Modena T., Pavanetto F., Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug, *International Journal of Pharmaceutic*, 252 (2003), 1-9; (b) Khajuria D. K., Patil O. N., Karasik D., Razdan R., Development and evaluation of novel biodegradable chitosan based metformin intrapocket dental film for the management of periodontitis and alveolar bone loss in a rat model, *Archives of Oral Biology*, 85 (2018), 120-129.

[5] (a) Zhang Y., Cheng X., Wang J., Wang Y., Shi B., Huang C., Yang X., Liu T., Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor- β 1 DNA for periodontal tissue engineering, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1) (2006), 362-369; (b) Peng L., Cheng X. R., Wang J. W., Xu D. X., Wang G., Preparation and evaluation of porous chitosan/collagen scaffolds for periodontal tissue engineering, *Journal of bioactive and compatible polymers* 21(3) (2006), 207-220; (c) Zhang Y.-F., Cheng X. R., Shi Y. C. B., Chen X.-H., Xu D.-X., Ke J., Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue, *Journal of Biomaterials Applications*, 21(4) (2007), 333-349; (d) Zhang Y., Wang Y., Shi B., Cheng X., A platelet-derived growth factor releasing chitosan/coral composite scaffold for periodontal tissue engineering, *Biomaterials*, 28(8) (2007), 1515-1522; (e) Liao F., Chen Y., Li Z., Wang Y., Shi B., Gong Z., Cheng X., A novel bioactive three-dimensional β -tricalcium phosphate/chitosan scaffold for periodontal tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(2) (2010), 489-496; (f) Peter M., Binulal N., Nair S., Selvamurugan N., Tamura H., Jayakumar R., Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering, *Chemical Engineering Journal*, 158(2) (2010), 353-361; (g) Xu C., Lei C., Meng L., Wang C. Song Y., Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration, *Journal of Biomedical Material Research B: Applied Biomaterials*, 100B (2012), 1435-1443; (h) Shalumon K., Sowmya S., Sathish D., Chennazhi K., Nair S., Jayakumar R., Effect of incorporation of nanoscale bioactive glass and hydroxyapatite in PCL/chitosan nanofibers for bone and periodontal tissue engineering, *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(3) (2013) 430-440.

[6] (a) Aiba S., Studies on chitosan: Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography, *International Journal of Biological Macromolecules*, 8 (1986), 173-176; (b) Duarte M.L., Ferriera M.C., Marvao M.R., Rocha J., An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by

FTIR spectroscopy, *International journal of Biological Macromolecules*, 31 (2002), 1-8; (c) de Alvarenga E. S., de Oliveira C. P., Bellato C. R., An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 80 (2008), 1155–1160; (d) Kasai M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy, *Carbohydrate Polymers*, 71 (2008), 497–508; (e) dos Santos Z. M., Caroni A. L. P. F., Pereira M. R., da Silva D. R., Fonseca J. L. C., Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis, *Carbohydrate Research*, 344 (2009), 2591–2595; (f) Kasai M. R, Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009), 1667–1676.

[7] (a) Hillyard I. W., Doczi J., Kiernan P. B., Antiacid and antiulcer properties of the polysaccharide chitosan in the rat, *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 115 (1964), 1108-1112; (b) Ito M., Ban A., Ishihara M., Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats, *The Japanese journal of pharmacology*, 82(3) (2000), 218-225; (c) Anandan N., Nair P. G., Mathew S., Anti-ulcerogenic effect of chitin and chitosan on mucosal antioxidant defence system in HCl-ethanol-induced ulcer in rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(2) (2004), 265-269.

[8] (a) Sugano M., Fujikawa T., Hiratsuji Y., Nakashima K., Fukuda N., Hasegawa Y., A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats, *American Journal of Clinical Nutrition*, 33 (1980), 787; (b) Sugano M., Watanabe S., Kishi A., Izume M., Ohtakara A., Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats, *Lipids*, 23(3) (1988), 187-191; (c) Maezaki Y., Tsuji K., Nakagawa Y., Kawai Y., Akimoto M., Tsugita T., Takekawa W., Terada A., Hara H., Mitsuoka T., Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(9) (1993), 1439-1444; (d) Ikeda I., Sugano M., Yoshida K., Sasaki E., Iwamoto Y., Hatano K., Effects of chitosan hydrolyzates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3) (1993), 431-435; (e) Moon M., Lee H., Kim Y., Hypocholesterolemic effects of chitosan in rats fed with high cholesterol diet, *The FASEB journal* (2006).

[9] (a) Ueno H., Yamada H., Tanaka I., Kaba N., Matsuura M., Okumura M., Kadosawa T., Fujinaga T., Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, *Biomaterials* 20(15) (1999), 1407-1414; (b) Ueno H., Mori T., Fujinaga T., Topical formulations

and wound healing applications of chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52(2) (2001), 105-115; (c) Ishihara M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Kikuchi M., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Uenoyama M., Kurita A., Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, *Biomaterials* 23(3) (2002), 833-840; (d) Kweon D., Song S., Park Y., Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator, *Biomaterials* 24(9) (2003), 1595-1601; (e) Mizuno K., Yamamura K., Yano K., Osada T., Saeki S., Takimoto N., Sakurai T., Nimura Y., Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice, *Journal of Biomedical Materials Research*, 64A (2003), 177-181; (f) Azad a. K., Sermsintham N., Chandkrachang S., Stevens W. F., Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application, *Journal of Biomedical Material Part B Applied Biomaterials*, 69B(2) (2004), 216-222; (g) Alemdaroglu C., Degim Z., Celebi N., Zor F., Ozturk S., Erdogan D., An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor, *Burns*, 32(3) (2006), 319-327; (h) Dai T., Tanaka M., Huang Y.-Y., Hamblin M. R., Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(7) (2011), 857-879.

[10] (a) Casettari L., Illum L., Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs, *Journal of Controlled Release*, 190 (2014), 189-200; (b) Biswas S. Chattopadhyay M., Sen K. K., Saha M. K., Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice, *Carbohydrate Polymers*, 121 (2015), 403-410; (c) Silva D., Pinto L. F. V., Bozukova D., Santos L. F., Serro A. P., Saramago B., Chitosan/alginate based multilayers to control drug release from ophthalmic lens, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 147 (2016), 81-89; (d) Caddeo C., Diez-Sales O. Pons R., Carbone C., Ennas G., Puglisi G., Fadda A. M., Marconi M., Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 461 (2016), 69-78; (e) Sarkar G., Orasugh J. T., Saha N. R., Roy I., Bhattacharyya A., Chattopadhyay A. K., Rana D., Chattopadhyay D., Cellulose nanofibrils/chitosan based transdermal drug delivery vehicle for controlled release of ketorolac tromethamine, *New Journal of Chemistry*, 41 (2017), 15312-15319; (f) Maestrelli F., Jug M., Cirri M., Kosalec I., Mura P., Characterization and microbiological evaluation of chitosan-alginate microspheres for cefixime vaginal administration, *Carbohydrate Polymers*, 192 (2018), 176-183.

[11] Jan J. C. A. R., Slovikova A., Amler E., Krupa P., Kecova H., Planka L., Gal P., Necas A.,

Mechanical response of porous scaffolds for cartilage engineering, *Physiological Research*, 56 (2007), S17-S25.

[12] Zhang Y., Reddy, J., El-turki, A., Ramakrishna, S., Su, B., Lim, C. T., Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering, *Biomaterial*, 29 (2008), 4314-4322.

[13] (a) Elgadir M. A., Uddin M. S., Ferdosh S., Adam A., Chowdhury A. J. K., Sarker M. Z. I., Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4) (2015), 619-629; (b) Zhang X., Hassanzadeh P., Miyake T., Jin J., Rolandi M., Squid beak inspired water processable chitosan composites with tunable mechanical properties, *Journal of Materials Chemistry B*, 4 (2016), 2273-2279; (c) Lima P. S., Brito R. S. F., Santos B. F. F., Tavares A. A., Rheological properties of HDPE/chitosan composites modified with PE-g-MA, *Journal of Material Research*, 32(4) (2017), 775-787.

[14] (a) Bhattarai N., Gunn J., Zhang M., Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1) (2010), 83-99; (b) Moussaoui Y., Mnasri N., Elaloui E., Salem R. B., Lagerge S., de Menorval L. C., Preparation of chitosan gel, *EPJ Web of Conferences*, 29 (2012), 0034; (c) Ahmadi F., Oveisi Z., Samani S. M., Amoozgar Z., Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(1) (2015), 1-16; (d) Hassanzadeh P., Kazembadeh-Narbat M., Rosenzweig R., Zhang X., Khademhosseini A., Annabi N., Rolandi M., Ultrastrong and flexible hybrid hydrogels based on solution self-assembly of chitin nanofibers in gelatin methacryloyl, *Journal of Materials Chemistry B*, 4 (2016), 2539-2543; (e) Delmar K., Bianco-Peled H., Composite chitosan hydrogels for extended release of hydrophobic drugs, *Carbohydrate Polymers*, 136 (2016), 570-580.

[15] Hassan B. A. R., Overview on pharmaceutical formulation and drug design, *Pharmaceutical Analytica Acta*, 3(10) (2012), 1000e140.

[16] (a) Barbè C., Bartlett J., Kong L., Finnie K., Lin H. Q., Larkin M., Calleja S., Bush A., Calleja G., Silica particles: A novel drug-delivery system, *Advanced Materials*, 16 (21) (2004), 1959-1966; (b) Zhang Y., Chan H. F., Leong K. W., Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1) (2013), 104-120; (c) Zhang R., Fan Q.,

Yang M., Cheng K., Lu X., Zhang L., Huang W., Cheng Z., Engineering melanin nanoparticles as an efficient drug–delivery system for imaging guided chemotherapy, *Advanced Materials*, 27(34) (2015), 5063-5069; (d) Murata M., Narahara S., Kawano T., Hamano N., Piao J. S., Kang J.-H., Ouchida K., Murakami T., Hashizume M., Design and function of engineered protein nanocages as a drug delivery system for targeting pancreatic cancer cells via neuropilin-1, *Molecular Pharmaceutics*, 12(5) (2015), 1422-1430; (e) Wang X.-G., Dong Z.-Y., Cheng H., Wan S.-S., Chen W.-H., Zou M.-Z., Hou J.-W., Deng H.-X., Zhang X.-Z., A multifunctional metal–organic framework based tumor targeting drug delivery system for cancer therapy, *Nanoscale*, 7(38) (2015), 16061-16070.

[17] (a) Thacharodi D., Rap K. P., Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery system for the controlled delivery of propranolol hydrochloride, *Biomaterials*, 16 (1995), 145-148; (b) Kshirasagar N. A., Bodhe P. V., Kotwani R. N., Targeted drug delivery in visceral leishmaniasis, *Journal of Parasitic Diseases*, 21 (1997), 21-24; (c) Sulistio A., Reyes-Ortega F., D'Souza A. M., Ng S. M. Y., Valade D., Quinn J. F., Donohue A. C., Mansfeld F., Blencowe A., Qiao G., Pranker R., Quirk S., Whittaker M. R., Davis T. P., Tait R. J., Precise control of drug loading and release of an NSAID–polymer conjugate for long term osteoarthritis intra-articular drug delivery, *Journal of Material Chemistry B*, 5(31) (2017), 6221-6226; (d) Cook M. T., Brown M. B., Polymeric gels for intravaginal drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 270 (2018), 145-157.

[18] (a) Prabakaran M., Mano F., Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems, *Drug Delivery*, 12(1) (2004), 41-57; (b) Bernkop-Schnürch A., Dünnhaupt S., Chitosan-based drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3) (2012), 463-469.

[19] (a) Gupta K. C., Kumar M. N. V. R., Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan, *Biomaterials*, 21(11) (2000), 1115-1119; (b) Yuan Q., Shah J., Hein S., Misra R. D. K., Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier, *Acta Biomaterialia*, 6(3) (2010), 1140-1148; (c) Belcerzak J., Mucha M., Analysis of model drug release kinetic for complex matrices of polylactide-chitosan, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivates*, XV (2010), 117-126.

[20] (a) Chang S. T., Chen L.C., Lin S.-B., Cheng H.-H., Nano-biomaterials application:

Morphology and physical properties of bacterial cellulose/gelatin composites via crosslinking, *Food Hydrocolloids*, 27(1) (2012), 137-144; (b) Zarzar J., Shatz W., Peer N., Taing R., McGarry B., Liu Y., Greene D. G., Zarraga I. E., Impact of polymer geometry on the interactions of protein-PEG conjugates, *Biophysical Chemistry*, 236 (2018), 22-30.

[21] (a) Kawaguchi H., Functional polymer microspheres, *Progress in Polymer Science*, 25(8) (2000), 1171-1210; (b) Wang J., Chen J.-S., Zong J.-Y., Zhao D., Li F., Zhuo R.-X., Chen S.-X., Calcium carbonate/carboxymethyl chitosan hybrid microspheres and nanospheres for drug delivery, *Journal of Physical Chemistry C*, 114(44) (2010), 18940-18945; (c) Prow T. W., Grice J. E., Lin L. L., Faye R., Butler M., Becker W., Wurm E. M. T., Yoong C., Robertson T. A., Soyer H. P., Roberts M. S., Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6) (2011), 470-491; (d) Joye I. J., McClements D. J., Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization and application, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5) (2014), 417-427; (e) Trushina D. B., Bukreeva T. V., Antipina M. N., CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications, *Materials Science and Engineering: C*, 45 (2014), 644-658; (f) He Y., Park K., Effects of the Microparticle Shape on Cellular Uptake, *Molecular Pharmaceutic*, 13(7) (2016), 2164-2171.

[22] (a) Kawaguchi H., Functional polymer microspheres, *Progress in polymer science*, 25(8) (2000), 1171-1210; (b) Sinha V. R., Trehan A., Biodegradable microspheres for protein delivery, *Journal of Controlled Release*, 90(3) (2003), 261-280.

[23] (a) Hjerten S., The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles, *Biochemical Biophysical Acta-Specialized Section on Biophysical Subjects*, 79(2) (1964), 393-398; (b) Donbrow M., Benita S., The effect of polyisobutylene on the coacervation of ethyl cellulose and the formation of microcapsules, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 29(1) (1977), 4P; (c) Stenekes R. J. H., Franssen O., van Bommel E. M. G., Crommelin D. J. A., Hennink W. E., The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics, *Pharmaceutical Research*, (1998) 15:557; (d) Das M. K., Rao K.R., Evaluation of zidovudine encapsulated ethylcellulose microspheres prepared by water-in-oil-in-oil (w/o/o) double emulsion solvent diffusion technique, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 63(2) (2006), 141-8; (e) Kar M., Choudhury P.K., Formulation and evaluation of ethyl cellulose microspheres prepared by the multiple emulsion technique, *Pharmazie*, 62(2) (2007), 122-5; (f) Zhao X., Wu J., Gong F. L., Cui J. M., Janson J. C., Ma G. H., Su Z. G., Preparation of uniform and

large sized agarose microspheres by an improved membrane emulsification technique, *Powder Technology*, 253 (2014), 444-452.

[24] (a) Wang H., Xu Y., Zhou X., Docetaxel-loaded chitosan microspheres as a lung targeted drug delivery system: In vitro and in vivo evaluation, *International Journal of Molecular Science*, 15(3) (2014), 3519-3532; (b) Jyoti K., Bhatia R. K., Martis E. A. F., Coutinho E. C., Jain U. K., Chandra R., Madan J., Soluble curcumin amalgamated chitosan microspheres augmented drug delivery and cytotoxicity in colon cancer cells: In vitro and in vivo study, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 148 (2016), 674-683; (c) Dozie-Nwachukwu S. O., Danyuo Y., Obayemi J. D., Odusanya O. S., Malatest K., Soboyejo W. O., Extraction and encapsulation of prodigiosin in chitosan microspheres for targeted drug delivery, *Material Science and Engineering: C*, 71 (2017), 268-278.

[25] (a) Arya A., Chandra A., Sharma V., Pathak K., Fast Dissolving Oral Films: An Innovative Drug Delivery System and Dosage Form, *International Journal of ChemTech Research*, 2(1) (2010), 576-583; (b) Wolinsky J. B., Colson Y. L., Grinstaff M. W., Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers, *Journal of Controlled Release*, 159(1) (2012), 14-26.

[26] (a) Norrman K., Ghanbari-Siahkali A., Larsen N. B., Studies of spin-coated polymer films, *Annual Reports Section C: Physical Chemistry*, 101 (2005), 174-201; (b) Zhao K., Yu X., Li R., Amassian A., Han Y., Solvent-dependent self-assembly and ordering in slow-drying drop-cast conjugated polymer films, *Journal of Material Chemistry C*, 3 (2015), 9842-9848.

[27] (a) Can A. S., Erdal M. S., Gungor S., Ozsoy Y., Optimization and characterization of chitosan films for transdermal delivery of ondansetron, *Molecules* 18, 5 (2013), 5455-5471; (b) Sahadat Md N., Hoban A.P., Morshed B.I., Haggard W.O., Investigation of electrical stimulus on chitosan film based DDS, *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 26-30 Agosto (2014); (c) Lefnaoui S., Moulai-Mostefa N., Yahoum M., Gasmi S., Design of antihistaminic transdermal films based on alginate-chitosan polyelectrolyte complexes: characterization and permeation studies, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(3) (2018), 432-443.

[28] (a) McHugh A. J., The role of polymer membrane formation in sustained release drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 109 (2005), 211-221; (b) Homayoni H., Ravandi S. A. H.,

Valizadeh M., Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization, *Carbohydrate Polymers*, 77 (2009), 656-661; (c) Repanas A., Wolkers WF, Gryshkov O., Muller M., Glasmacher B., Pcl/Peg electrospun fibers as drug carriers for the controlled delivery of dipyridamole, *Journal of In Silico and In Vitro Pharmacology*, Vol 1 (2015), 1:2; (d) Palivan C. G., Goers R., Najer A., Zhang X., Car A., Meier W., Bioinspired polymer vesicles and membranes for biological and medical applications, *Chemical Society Reviews*, 45 (2016), 377-411; (e) Sedghi R., Shaabani A., Mohammadi Z., Samadi Y., Isaei E., Biocompatible electrospinning chitosan nanofibers: a novel delivery system with superior local cancer therapy, *Carbohydrate polymers*, 159 (2017), 1-10.

[29] (a) Huang L., Nagapudi K., Apkarian R. P., Chaikof E. L., Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 12 (2001), 979-993; (b) Duan B., Dong C., Yuan X., Yao K., Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide), *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 15 (2004), 797-811; (c) Lu J.-W, Zhu Y.-L, Guo Z.-X., Hu P., Yu Y., Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide), *Polymer*, 47 (2006), 8026-8031; (d) Bonino C. A., Krebs M. D., Saquing C. D., Jeong S. I., Shearer K. L., Alsberg E., Khan S. A., Electrospinning alginate-based nanofibers: from blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems, *Carbohydrate Polymers*, 85 (2011), 111-119; (e) Paipitak K., Pornpra T., Mongkontalang P., Techitdheer W., Pecharapa W., Characterization of PVA-chitosan nanofibers prepared by electrospinning, *Procedia Engineering*, 8 (2011) 101-105; (f) Huang S., Zhou L., Li M.-C., Wu Q., Kojima Y., Zhou D., Preparation and properties of electrospun poly(vinyl pyrrolidone)/cellulose nanocrystal/silver nanoparticle composite fibers, *Materials*, 9 (2016) 523.

[30] (a) Jain N., Jain G. K., Javed S., Iqbal Z., Talegaonkar S., Ahmad F. J., Khar R. K., Recent approaches for the treatment of periodontitis, *Drug Discovery Today*, 13 (2008), 932-943; (b) Chen F.-M., An Y., Zhang R., Zhang M., New insights into and novel applications of release technology for periodontal reconstructive therapies, *Journal of Controlled Release*, 149(2) (2011), 92-110.

[31] Neuman M., *Vademecum degli antibiotici ed agenti chemioterapici anti-infettivi*, Sigma-tau, quinta edizione (1994).

[32] Davies A. K., McKellar J. F., Phillips G. O., Reid A. G., Photochemical oxidation of tetracycline in aqueous solution, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 3 (1979), 369-375.

[33] Goodman & Gilman, *Le basi farmacologiche della terapia*, McGraw-Hill, decima edizione (2003).

[34] Dematini A., Preparazione e caratterizzazione di biomateriali per applicazioni in campo biomedicale, Tesi di dottorato, XVII ciclo, Università di Genova, (2005).

[35] Mariano N. A., Oliveira R. G., Fernandes M. A., Rigo E. C. S., Corrosion behaviour of pure titanium in artificial saliva solution, *Revista Materia*, 878 (2009), 14.

[36] Cacciari R. D., Reynoso E., Monteyaro H. A., Biasutti M. A., Photodegradation of prednisolone under UVB solar irradiation. Role of photogenerated ROS in the degradation mechanism, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(11) (2017), 1717-1726.

[37] Gupta V. D., Stability of triamcinolone acetate solutions as determined by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(12) (1983), 1453-1456.

[38] (a) Mima S., Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S., *Highly deacetylated chitosan and its properties*, *Journal of Applied Polymer Sciences*, 28 (1983), 1909-1917; (b) Wang W., Bo S., Li S., Qin W., *Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation*, *International journal of Biological Macromolecules*, 13 (1991), 281-285.

[39] Ming-Hua H., Da-Ming W., Hsyue-Jen H., Hwa-Chang L., Tzu-Yang H., Juin-Yih L., Lein-Tuan H., Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds, *Biomaterials*, 26 (2005), 3197-3206.

[40] (a) Homayoni H., Ravandi S. A. H., Valizadeh M., Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization, *Carbohydrate Polymers*, 77 (2009), 656-661; (b) Qasim S. B., Zafar M. S., Najeeb S., Khurshid Z., Shah A. H., Husain S., Ur Rehman I., Electrospinning of Chitosan-Based Solutions for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2018), 407.

[41] (a) Roman J., Little C.W., McDonald J.A., Potential role of RGD-binding integrins in mammalian lung branching morphogenesis, *Development*, 112 (1991), 551-558; (b) Ramos J. W.,

Whittaker C. A., DeSimone D. W., Integrin-dependent adhesive activity is spatially controlled by inductive signals at gastrulation, *Development*, 122 (1996), 2873-2883; (c) Ruoslahti E., RGD and other recognition sequences for integrins, *Annual Reviews*, 12 (1996), 697-715; (d) John Kao W., Lee D., Schense J.C., Hubbell J. A., Fibronectin modulates macrophage adhesion and FBGC formation: The role of RGD, PHSRN, and PRRARV domains, *Journal of Biomedical Materials Research*, 55 (2001), 79-88.

[42] (a) Ming-Hua H., Da-Ming W., Hsyue-Jen H., Hwa-Chang L., Tzu-Yang H., Juin-Yih L., Lein-Tuan H., Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds, *Biomaterials*, 26 (2005), 3197–3206; (b) Hansson A., Hashom N., Falson F., Rousselle P., Jordan O., Borchard G., In vitro evaluation of an RGD-functionalized chitosan derivative for enhanced cell adhesion, *Carbohydrate Polymers*, 90 (2012), 1494-1500; (c) Li J., Zheng L., Zeng L., Zhang Y., Jiang L., Song J., RGD Peptide-Grafted Graphene as a New Biomimetic Nanointerface for Impedance-Monitoring Cell Behaviors, *Journal of Nanomaterials*, (2016); (d) Gan D., Liu M., Xu T., Wang K., Tan H., Lu X., Chitosan/biphasic calcium phosphate scaffolds functionalized with BMP-2-encapsulated nanoparticles and RGD for bone regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, (2018).

[43] Zappia S., Synthesis and characterization of organic and metallo-organic hybrid materials for sensoristic and photovoltaic applications, Dottorato in Scienze Chimiche, XXV ciclo, Università di Genova.

[44] (a) Chiou M. S., Li H. Y., Adsorption behaviour of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads, *Chemosphere*, 50 (2003), 1095-1105; (b) Liu Y., Shen L., A general rate law equation for biosorption, *Biochemical Engineering Journal*, 38 (2008), 390-394; (c) Largitte L., Pasquier R., A review of the Kinetics adsorption models and their application to the adsorption of lead by an activated carbon, *Chemical Engineering Research and Design*, 109 (2016), 495-504.

Publicazioni

- 1) Urso D., Demartini A., Becce C., Rolandi R., Alloisio M., Idrogeli di chitosano per il rilascio di farmaci in applicazioni odontoiatriche, Atti del XXII Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Genova 11-14 Settembre 2016, Edizioni Nuova Cultura, Roma, 2016, pagg. 252-255, ISBN: 9788868127206, DOI: 10.4458/7206-86;
- 2) Urso D., Becce C., Rolandi R., Alloisio M., Sistemi a base di chitosano per applicazioni farmacologiche, Atti del XXIII Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Catania 9-12 Settembre 2018, Giuseppe Maimone Editore Catania, pagg. 202-203, ISBN: 9788877514493;
- 3) Alloisio M., Urso D., Dodero A., Castellano M., Vicini S., Becce C., Rolandi R., Chitosan-based systems as drug delivery platforms for periodontal disease, Abstract per il congresso European Polymer Congress (EPC) 2019, Creta 9-14 Giugno 2019.

Ringraziamenti

Ringrazio la Coordinatrice della Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie della Chimica e dei Materiali dell'Università degli Studi di Genova (Prof. A. Saccone), i Tutor (Prof. M. Alloisio, Prof. R. Rolandi) e tutto il Collegio Docenti della scuola di dottorato.

Ringrazio i colleghi del Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale e del Dipartimento di Fisica.

Ringrazio gli amici sempre presenti nei momenti di bisogno.

Ringrazio la mia famiglia e mio fratello.

