



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI INGEGNERIA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Utilizzo di nanoparticelle polimeriche per veicolare molecole ad attività antiossidante

**Use of polymeric nanoparticles to deliver molecules with antioxidant
activity**

Candidato:
Francesco Itto

Relatore:
Prof. Emiliano Laudadio

Correlatore:
Prof.ssa Simona Sabbatini
Dott.ssa Cristina Minelli

Anno Accademico 2022-2023



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI INGEGNERIA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Utilizzo di nanoparticelle polimeriche per veicolare molecole ad attività antiossidante

**Use of polymeric nanoparticles to deliver molecules with antioxidant
activity**

Candidato:
Francesco Itto

Relatore:
Prof. Emiliano Laudadio

Correlatore:
Prof.ssa Simona Sabbatini
Dott.ssa Cristina Minelli

Anno Accademico 2022-2023

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA
Via Brezze Bianche – 60131 Ancona (AN), Italy

*Una dedica speciale ai miei genitori ed a mio fratello per per avermi
supportato durante tutto il mio percorso universitario.
Grazie.*

Abstract

La seguente tesi è incentrata sullo studio degli effetti delle diverse concentrazioni di un derivato lipofilo di Epigallocatechin-3-Gallato (EGCG) sulle nanoparticelle (NPs) composte dal copolimero acido polilattico poliglicolico (PLGA). Gli stabilizzanti utilizzati sono stati l'alcol polivinilico (PVA) ed il lipide DSPE-PEG₂₀₀₀. Le formulazioni sono state studiate attraverso simulazioni *in silico* e sperimentazione *in vitro*.

Le simulazioni hanno permesso di predire l'aggregazione delle varie componenti e la formazione dei sistemi PLGA/PVA (PNP) e PLGA/DSPE-PEG₂₀₀₀ (DNP), per poi confrontare le proprietà calcolate con i risultati ottenuti dalla sperimentazione *in vitro*.

Le tecniche di sperimentazione utilizzate sono state differenti. I nanosistemi sono stati analizzati attraverso immagini al microscopio a trasmissione elettronico (SEM), il quale ha permesso di visualizzare la disposizione del derivato di EGCG, chiamato C18-EGCG, in funzione della matrice polimerica. Inoltre, attraverso l'utilizzo del Dynamic Light Scattering (DLS) ha evidenziato la differenza di dimensioni tra DNP e PNP. I nanosistemi stabilizzati attraverso DSPE-PEG₂₀₀₀ hanno mantenuto pressochè costante il loro diametro anche con concentrazioni elevate di C18-EGCG, contrariamente alle PNP che hanno mostrato un aumento di dimensioni dose-dipendente.

Le considerazioni precedenti sono state confermate dall'analisi dei profili di densità di massa, ottenute mediante simulazioni atomistiche e spettroscopia infrarossa, utilizzata sperimentalmente. Entrambi gli approcci hanno evidenziato come, nel caso delle PNP, le molecole di C18-EGCG si dispongano all'interno della matrice polimerica, mentre espongono le teste polifenoliche all'interfaccia polimero-solvente nei sistemi DNP.

Le caratteristiche osservate si riflettono in un'efficienza di incapsulamento (%EE) delle DNP maggiore di circa il 20% rispetto alle PNP.

Considerando i risultati ottenuti dalle sperimentazioni i nanosistemi PLGA/DSPE-PEG₂₀₀₀ sono risultati più stabili e con una capacità di Drug Loading maggiore rispetto ai nanosistemi PLGA/PVA o al PLGA puro.

Indice

Introduzione	1
1 Polimeri biodegradabili	2
1.1 Cosa sono e proprietà	2
1.2 Polimeri biodegradabili e biorisorbibili in medicina	4
1.3 Nanoparticelle	6
1.4 Drug delivery	6
1.5 PGA e PLA	8
1.6 PLGA	11
2 Epigallocatechina-3-gallato	13
2.1 Descrizione e azione antiossidante	13
2.2 Epigallocatechina-3-gallato C-18	14
3 Scopo della tesi	15
4 Materiale e metodi	16
4.1 Sperimentazione in silico	16
4.1.1 Meccanica classica	16
4.1.2 Potenziale stretching E_s	17
4.1.3 Potenziale di Bending E_b	19
4.1.4 Potenziale torsionale E_w	20
4.1.5 Potenziale di non legame E_{nb}	21
4.1.6 Analisi conformazionale e minimizzazione dell'energia	21
4.1.7 Dinamica molecolare	24
4.1.8 Basi teoriche della dinamica molecolare: L'equazione del moto di Newton	25
4.1.9 Ensembles	25
4.1.10 Condizioni periodiche di contorno	25
4.1.11 Coupling della temperatura e della pressione	26
4.1.12 Modelli di solvente	27
4.1.13 Lo scoring	27
4.1.14 Settaggio del sistema	28
4.2 Caratterizzazione AFT-IR	29

Indice

5 Risultati e discussione	32
5.1 Fabbricazione di NP PLGA/PVA e PLGA/DSPE-PEG ₂₀₀₀ ed effetto del guscio lipidico EGCG-C18 sulla dimensione delle particelle . . .	32
5.2 Interazione del guscio lipidico antiossidante C18-EGCG con PLGA .	37
Conclusioni	43

Introduzione

Durante gli ultimi decenni si sono fatti passi avanti significativi in ambito di sviluppo di nanoparticelle biodegradabili a scopo biomedicale. Questa tecnologia ha innumerevoli impieghi soprattutto in ambito di drug delivery, cioè la veicolazione di una o più sostanze terapeutiche in maniera precisa verso la zona, tessuto o cellula target. Le nanoparticelle quindi possono essere impiegate in quei casi in cui si vuole evitare una inutile dispersione del principio attivo all'interno dell'organismo, ad esempio quando devono essere somministrate molecole altamente aggressive nei confronti del nostro organismo, come i farmaci chemioterapici, ma anche molecole che, per via della modalità di assunzione, non riescono a raggiungere la zona target senza subire modifiche alla propria struttura. La nanoparticella deve essere formulata in modo tale da permettere la degradazione della stessa solo nel momento in cui raggiunge l'obiettivo, ciò può avvenire se il sistema viene progettato in modo tale da essere sensibile ad alcuni parametri come la variazione di pH, di temperatura o all'azione di specifici enzimi.

Lo sviluppo delle nanoparticelle è molto dispendioso sia a livello economico che di tempo, per cui si integra la ricerca in laboratorio con lo studio *in silico*, cioè uno studio fatto attraverso sofisticati simulatori per simulare il comportamento della nanoparticella in ambiente biologico. Da queste simulazioni si può studiare quanto una struttura formata da polimero e principio attivo sia stabile, come questa si degradi e di conseguenza quali saranno i prodotti derivanti dalla sua degradazione.

Nel corso di questa tesi si andrà ad approfondire il sistema formato da nanoparticelle di PLGA, un copolimero biodegradabile formato da catene di acido polilattico (PLA) e poliglicolico (PGA), contenenti molecole di epigallocatechina 3 gallato C18 (C18-EGCG), ovvero un derivato sintetico di un potente antiossidante presente nelle foglie di tè verde. La modifica chimica riguarda l'aggiunta di una catena di diciotto carboni, la quale conferisce all'estratto naturale EGCG una migliore stabilità.

Capitolo 1

Polimeri biodegradabili

1.1 Cosa sono e proprietà

L'utilizzo di prodotti in polimero è ormai altamente diffuso in moltissimi ambiti della nostra vita. Praticamente nessun settore può fare a meno dell'uso di polimeri proprio perché possono essere utilizzati per un'ampia varietà di scopi [1]. Il motivo di questo largo utilizzo è dovuto ad alcuni fattori tra cui costi di produzione e proprietà meccaniche e fisiche. Infatti i polimeri sono materiali economici con un alto grado di resistenza all'azione di agenti esterni. Anche in medicina stanno trovando ampio uso. Alcuni polimeri sono inerti nei confronti dei tessuti del corpo, e ciò li ha resi un indispensabili nella fabbricazione di dispositivi medici, sistemi di trasfusione di sangue, siringhe, articoli per la cura, attrezzature di laboratorio, imballaggi, cateteri, tubi di drenaggio, sonde, confezioni di farmaci, montature e lenti [2]. Per polimero si intende una macromolecola, cioè una molecola dall'elevato peso molecolare, costituita da un gran numero di unità ripetitive dette monomeri. Questi possono essere tutti uguali oppure diversi tra loro, e in quel caso il polimero prende il nome di copolimero, ma in entrambi i casi i monomeri sono legati tra loro attraverso legami covalenti.

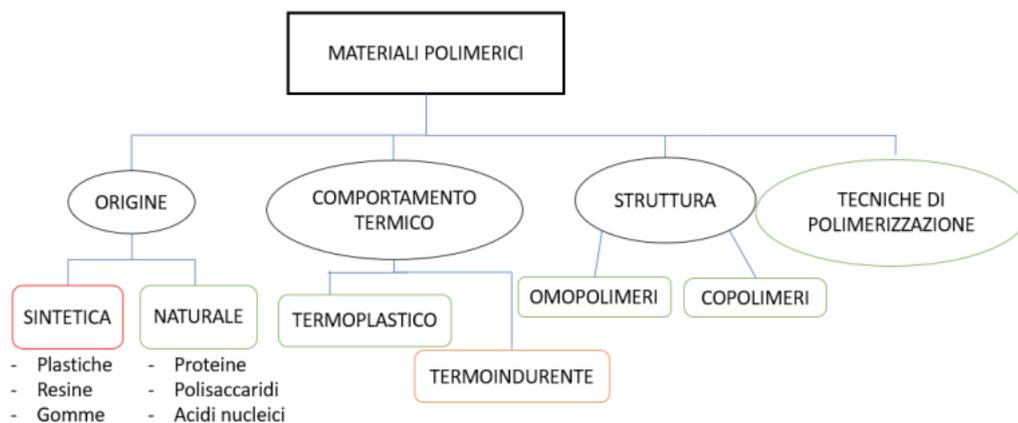


Figura 1: Schema riassuntivo delle tipologie di polimeri.

I polimeri si possono classificare in base a vari parametri, l'insieme di questi andranno poi a definire quale sarà il comportamento finale del materiale. I polimeri

possono essere distinti in base all'origine:

- naturali cioè sintetizzati da organismi viventi, come ad esempio amido, glicogeno e cellulosa.
- sintetici cioè prodotti attraverso una serie di reazioni di sintesi organica in laboratorio.

È di particolare interesse studiare i polimeri sintetici perché, essendo fabbricati in laboratorio, possono essere progettati in modo tale da avere le caratteristiche ottimali per i loro scopi. Le proprietà dei polimeri possono essere adattate per soddisfare esigenze specifiche, modificando il tipo di monomero, la sequenza dei monomeri costituenti il copolimero o la disposizione spaziale delle catene di monomero [2][3]. Le catene di monomeri possono formare un polimero di tipo:

- lineare, cioè sviluppato lungo una direzione preferenziale.
- ramificato se le catene si sviluppano in più direzioni.
- reticolare se è formato da catene lineari ancorate reciprocamente mediante legami trasversali, formando quindi un reticolo tridimensionale compatto.

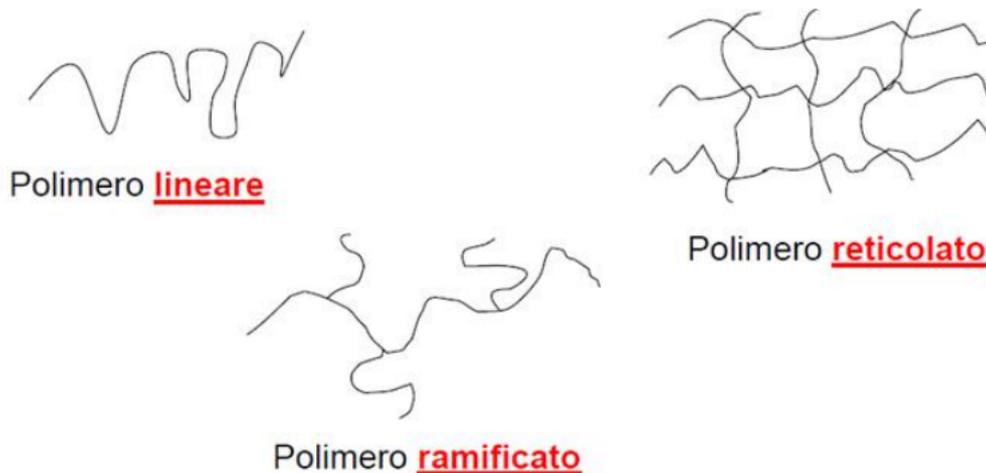


Figura 2: Tipologie di strutture polimeriche.

Anche il comportamento termico è di particolare interesse, si possono dividere i polimeri in due classi: termoplastico e termoindurente. Per polimero termoplastico si intende un polimero che può passare alternativamente dallo stato fuso, per riscaldamento, allo stato solido, per raffreddamento. I polimeri termoplastici sono i polimeri aventi una struttura lineare o ramificata ma non reticolare. I polimeri termoindurenti invece non possono essere fusi senza andare incontro a carbonizzazione. Questa classe di polimeri ha una struttura reticolare, infatti sono proprio le interazioni nel reticolo che rendono il polimero infusibile e insolubile, perciò non sono polimeri considerati

riciclabili. In base a come le catene polimeriche saranno disposte nello spazio, dopo la loro sintesi, possiamo ottenere dei polimeri amorfi o semi-cristallini. Nei polimeri amorfi le catene sono orientate in modo casuale formando una struttura a “gomitolo”. Invece, nei polimeri semi-cristallini, le catene si dispongono in “pacchetti” ordinati in cui le interazioni tra di esse sono molto forti, le zone cristalline sono intervallate da zone amorfe. I polimeri amorfi sono facilmente attaccabili da agenti esterni, questa caratteristica può essere sfruttata per progettare polimeri biodegradabili, molto utilizzati in ambito medico.

1.2 Polimeri biodegradabili e biorisorbibili in medicina

I polimeri riassorbibili possono essere definiti come polimeri che subiscono la degradazione o la dissoluzione delle loro molecole costituenti nel corpo. Sono quindi polimeri costituiti da monomeri assorbibili dall'organismo legati con legami degradabili attraverso processi biologici. Sono di particolare interesse in ambito medico dove possono essere utilizzati per suture, impianti ossei temporanei, scaffolds per la medicina rigenerativa ma anche come nanoparticelle per il drug delivery [4]. I polimeri biodegradabili e riassorbibili vengono utilizzati in ambito medico dagli anni '60, anni in cui si iniziarono ad utilizzare polimeri riassorbibili composti da acido poliglicolico (PGA), seguiti dai polimeri a base di acido polilattico (PLA) e polidossanone [5].

Questi polimeri vengono eliminati dal corpo tramite dissoluzione, assimilazione ed escrezione attraverso percorsi metabolici. Il processo di idrolisi scompone il polimero in unità più piccole e i suoi prodotti di degradazione vengono espulsi mediante il ciclo dell'acido citrico o per escrezione renale diretta [6].

Il processo di degradazione polimerica, sia di polimeri riassorbibili naturali che sintetici, può essere di tipo idrolitico, cioè che avviene attraverso reazione di idrolisi, o enzimatico, con l'intervento di specifici enzimi. La maggior parte dei polimeri sintetici viene degradata attraverso una degradazione di tipo idrolitica, mentre i polimeri naturali per degradazione enzimatica. La degradazione dei polimeri sintetici riassorbibili è più facilmente prevedibile perché la concentrazione di molecole di acqua sono costanti in condizioni fisiologiche. Mentre i polimeri naturali si basano sulla degradazione enzimatica, rendendo questo processo imprevedibile per via dei livelli di enzimi che differiscono da tessuto a tessuto e da paziente a paziente [7]. Anche la modifica chimica di questi polimeri può influire in modo significativo il loro tasso di degradazione.

I polimeri naturali possiedono diversi vantaggi intrinseci come la bioattività, la capacità di presentare ligandi che si legano ai recettori delle cellule e la suscettibilità alla degradazione proteolitica (degradazione mediante la quale le cellule degradano le proteine). La bioattività intrinseca di questi polimeri naturali ha i suoi lati negativi, questi includono: una forte risposta immunogenica associata alla maggior parte dei polimeri, problematiche dovute alla loro purificazione e alla possibilità di trasmissione

di malattie. I biomateriali sintetici invece sono biologicamente più inerti, hanno proprietà prevedibili e uniformità da lotto a lotto. Hanno il vantaggio di poter essere progettati e fabbricati su misura per specifiche applicazioni per cui sono privi di molti degli svantaggi dei polimeri naturali [8].

Questa categoria di polimeri rientra nella definizione di biomateriale cioè un materiale progettato per interfacciarsi con un sistema biologico per trattare, migliorare o sostituire un tessuto, un organo o una funzione del corpo [9].

Il prerequisito essenziale per qualificare un materiale come un biomateriale è la biocompatibilità, intesa come la capacità di un materiale di ottenere dal sistema biologico una risposta appropriata alla specifica applicazione [10]. Questa definizione suggerisce che il biomateriale non deve essere passivo ma deve avere un ruolo funzionale e, per far ciò, deve indurre una risposta dall'ambiente in cui è stato messo a contatto.

La risposta del sistema biologico ad un biomateriale dipende da una miriade di fattori che vanno dal chimico, fisico fino alle proprietà biologiche del materiale e alla forma e struttura dell'impianto [8].

L'Organizzazione internazionale per la standardizzazione descrive la valutazione biologica dei dispositivi medici all'interno di un processo di gestione del rischio [11]. Oltre ai test chimici, fisici e meccanici, i test biologici si basano su metodi di test in vitro, ex vivo e su modelli animali. Tuttavia, i risultati di quest'ultimo dovrebbero sempre essere considerati con cautela, in quanto non si può concludere inequivocabilmente che la stessa risposta biologica si verificherà anche se utilizzata nell'uomo. Inoltre, le risposte biologiche non dipendono solo da l'applicazione, ma può anche dipendere dalla storia clinica individuale del paziente [12]. Considerando i punti citati sopra si può stilare una lista di proprietà che un biomateriale biodegradabile deve avere:

- non deve provocare una risposta infiammatoria o tossica prolungata al momento dell'impianto nel corpo.
- il tempo di degradazione del materiale dovrebbe corrispondere al processo di guarigione o rigenerazione.
- deve avere proprietà meccaniche adeguate all'applicazione indicata e la variazione delle proprietà meccaniche durante la degradazione dovrebbe essere compatibile con il processo di guarigione o rigenerazione.
- i prodotti di degradazione devono essere non tossici e in grado di essere metabolizzati ed eliminati dal corpo.
- deve avere permeabilità e lavorabilità adeguate per l'applicazione prevista [8].

In questo articolo si andrà a considerare il PLGA, un particolare polimero riassorbibile e biodegradabile che rispetta le proprietà e le caratteristiche sopra citate.

1.3 Nanoparticelle

Con il termine nanoparticella (NP) si identificano delle particelle formate da aggregati atomici o molecolari con un diametro dell'ordine di poche centinaia di nanometri. Le nanoparticelle possono essere formate da vari materiali e assumere forme regolari (tubulari, sferiche o filamentose) o irregolari. Inoltre, possono esistere allo stato disperso o in forma fusa, aggregata o agglomerata [13]. Le nanoparticelle possono essere preparate con polimeri o materiali organici (nanoparticelle organiche) e/o con elementi inorganici (nanoparticelle inorganiche) e questa loro versatilità è proprio alla base della loro scelta per lo sviluppo di questo lavoro di tesi.

Il settore biomedico è quello in cui queste tecnologie trovano maggiori applicazioni, dall'uso medico dei nanomateriali (ad esempio, attraverso i nanofili), alla formulazione di nuovi sistemi per la somministrazione dei farmaci (attraverso nanoparticelle nei drug delivery systems), ai biosensori nanotecnologici nella diagnostica o ancora, al possibile utilizzo futuro della nanotecnologia molecolare. Infatti, un importantissimo fattore trainante dello sviluppo delle nanotecnologie è la comprensione dei processi biologici che avvengono su nanoscala [14]. Gli organismi viventi sono costituiti da cellule, mediamente del diametro di 10 micron; tuttavia, i vari componenti cellulari hanno dimensioni dei sub-micron e dei nanometri. Questo confronto fornisce un'idea delle potenzialità che si hanno nell'utilizzo delle nanoparticelle, intese come piccolissimi strumenti all'interno del macchinario cellulare: ogni cellula può accogliere al suo interno o sulla sua superficie decine se non centinaia di strutture nanometriche che possono essere utilizzate come sonde per peptidi, anticorpi, acidi nucleici e per interagire con prodotti in processi cellulari [15]. Infine, alcune proprietà delle nanoparticelle, come un'aumentata attività chimica, una migliore selettività e l'abilità di attraversare le barriere tissutali, stanno portando allo sviluppo di nuove tecniche in ambito farmacologico. Attraverso le nanotecnologie si potranno stimolare meccanismi di riparazione di tessuti malati o danneggiati, senza ricorrere a trapianti o ad organi artificiali.

1.4 Drug delivery

Il drug delivery è la strategia di veicolazione di una sostanza in maniera precisa verso la zona, tessuto o cellula di interesse per scopi terapeutici. Il fine ultimo è quello di aumentare al massimo la biodisponibilità del farmaco somministrato, evitando precoci processi degradativi del principio attivo e l'interazione con altri target biologici che potrebbero generare controindicazioni. Le strutture utilizzate per veicolare i principi attivi vengono chiamate vettori. Questi sono composti da polimeri biodegradabili che rispecchiano i criteri descritti nel capitolo 1.2. I vettori devono rispettare determinati criteri dato che entrano in contatto con un ambiente biologico:

- devono essere compatibili con un'ampia gamma di molecole terapeutiche.

Capitolo 1 Polimeri biodegradabili

- la biodegradabilità è una caratteristica importante per la selezione dei polimeri necessari per la microincapsulazione e la biodegradabilità dei polimeri può essere ulteriormente sfruttata per la somministrazione di agenti terapeutici per un periodo di tempo desiderato.
- i prodotti di degradazione prodotti da questi polimeri devono essere non tossici. È sempre auspicabile che i prodotti di degradazione dei polimeri siano valutati per un periodo più lungo in termini di tossicità e questo offre l'idoneità clinica per la selezione di tali vettori [16].

Quando le molecole ad attività terapeutica vengono incorporate in sistemi polimerici, vengono presi in considerazione alcuni criteri importanti come l'efficienza di incapsulamento e il tempo di ritenzione che, in ultima analisi, portano a un miglioramento della biodisponibilità delle molecole stesse [17]. È stato inoltre osservato che il farmaco coniugato con un polimero biodegradabile ha un impatto terapeutico di gran lunga superiore anche in termini di somministrazione controllata e mirata. Inoltre, il miglioramento dell'efficacia terapeutica e della somministrazione mirata può essere influenzato dalla dimensione delle particelle, dall'idrofobicità, dalla carica superficiale e dalla modifica della superficie del sistema coniugato. Le dimensioni, la forma e la struttura delle nanoparticelle controllano le loro proprietà fisico-chimiche che svolgono un ruolo molto importante durante il trasporto attraverso le membrane biologiche. È generalmente riconosciuto che la diminuzione delle dimensioni delle particelle aumenta l'assorbimento dei sistemi particellari. Anche la carica superficiale è importante per l'assorbimento delle molecole terapeutiche attraverso la barriera biologica e in generale determina l'interazione delle molecole con le membrane biologiche cariche. La lipofilia è un altro parametro importante per accertare la biodisponibilità dei farmaci e, in poche parole, una dimensione delle particelle più piccola con un adeguato equilibrio idrofilo-lipofilo è sempre preferibile per ottenere la risposta terapeutica desiderata. In questo contesto, le nanoparticelle polimeriche hanno svolto un lavoro notevolmente migliore per migliorare la biodisponibilità di numerosi farmaci [16].

Le nanoparticelle possono essere sensibili a diversi stimoli, questi faranno da *trigger* per il rilascio del principio attivo che trasportano. Le proprietà fisico-chimiche dei polimeri possono trasformarsi in modo intelligente in risposta a tali stimoli. Il tasso di rilascio del farmaco può essere controllato dall'intensità degli stimoli applicati ai vettori fabbricati. Questi materiali polimerici intelligenti possono essere suddivisi in due categorie: polimeri che rispondono a uno stimolo singolo e polimeri che rispondono a due o più stimoli [29]. Lo stimolo singolo che induce protonazione, scissione idrolitica o cambiamento conformazionale molecolare nei nanomateriali polimerici può essere ulteriormente classificato come stimolo esogeno e/o endogeno [18]. Gli stimoli esogeni come temperatura, il campo magnetico, la forza ionica o gli impulsi elettrici possono innescare cambiamenti di conformazione delle catene

polimeriche [19]. Fattori come il pH, la concentrazione di enzimi, il livello di ormoni, il gradiente redox e piccole biomolecole sono riassunti come stimoli endogeni [20].

1.5 PGA e PLA

L'acido polilattico e l'acido poliglicolico sono tra i primi polimeri ad essere usati in ambito medico e, anche al giorno d'oggi, vengono ampiamente usati. L'acido polilattico è il polimero dell'acido lattico, quindi è formato da lunghe catene i cui monomeri sono molecole di acido lattico legate tra loro attraverso legami covalenti di tipo estere. L'acido lattico è uno degli acidi organici naturali più ampiamente utilizzati nell'industria farmaceutica, tessile e della produzione alimentare [21]. Esiste in due forme enantiomeriche, cioè due molecole che sono immagini speculari ciascuna dell'altra ma non sovrapponibili, ma soltanto nella forma L la polimerizzazione dà luogo ad un polimero cristallino che ha temperatura di fusione di 180°C. Altrimenti se l'acido lattico si trova nella forma R allora il polimero avrà una struttura amorfa. L'acido lattico si produce partendo da scarti di lavorazioni di mais o altre fonti amidacee, per poi sottoporli a fermentazione attraverso l'utilizzo di batteri naturali [22] o geneticamente modificati per essere più efficienti [23]. Da un punto di vista progettuale è interessante studiare la produzione di acido lattico tramite fermentazione perché è possibile produrre stereoisomeri otticamente puri utilizzando il giusto ceppo microbico. Come detto in precedenza, stereoisomeri diversi porteranno alla produzione di PLA con gradi di cristallinità molto diversi tra loro, per cui è opportuno progettare in maniera accurata anche la fase di fermentazione in modo da ottenere lo stereoisomero adatto al tipo di polimero che si vuole ottenere. La produzione del PLA può avvenire attraverso tre processi:

- condensazione diretta: reazione nella quale le due parti reagenti delle molecole di acido lattico si legano insieme rilasciando una molecola di acqua.
- polimerizzazione per apertura dell'anello (ROP): reazione nella quale la parte terminale di una catena polimerica attacca i monomeri, che sono nella forma ciclica, allungandosi.
- distillazione azeotropica: distillazione in cui per separare i componenti della miscela si inserisce un terzo componente che formerà una miscela azeotropica (non separabile attraverso distillazione) con la molecola da separare.

Il PLA ha una buona resistenza alla trazione, quindi è stato considerato un biomateriale ideale per applicazioni portanti come i dispositivi di fissaggio ortopedici.

L'acido poliglicolico è un polimero termoplastico il cui monomero è l'acido glicolico, anch'esso è caratterizzato da legami esteri. Il polimero gode di una temperatura di fusione superiore rispetto al PLA, infatti si attesta intorno ai 230°C. A differenza del PLA, l'acido poliglicolico gode di un elevato grado di cristallinità, il che lo rende insolubile in acqua. L'acido glicolico viene estratto dalla canna da zucchero, dalla

barbabietola e dall'uva immatura e viene principalmente utilizzato nell'industria cosmetica e in quella tessile. Il PGA può essere sintetizzato in vari modi ma i più comuni sono:

- condensazione di acido glicolico: attraverso questo processo, che ha come prodotti una catena di acido poliglicolico e molecole di acqua, si ottiene un polimero a basso peso molecolare.
- polimerizzazione ad apertura di anello di glicolide: processo che si avvale di un catalizzatore per far sì che l'anello di acido poliglicolico si leghi all'iniziatore, questa reazione permette di sintetizzare polimeri a più alto peso molecolare rispetto alla condensazione.

Grazie alla sua eccellente capacità di formare fibre, è stato inizialmente studiato per sviluppare suture riassorbibili. La prima sutura sintetica biodegradabile, chiamata DEXONs e approvata dalla Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti nel 1969, era basata sul poliglicolide. L'estrusione, lo stampaggio a iniezione, a compressione e la colata in solvente sono alcune delle tecniche utilizzate per sviluppare strutture a base di poliglicolici per applicazioni biomediche [24]. Tuttavia, l'elevata velocità di degradazione, i prodotti di degradazione acidi e la bassa solubilità limitano le applicazioni biomediche del poliglicolide [8].

Va detto che la degradazione del polilattide (PLA) e del poliglicolide (PGA) avviene principalmente per idrolisi aspecifica e che la velocità di idrolisi è inversamente proporzionale alla cristallinità del polimero [25]. Infatti la degradazione inizia nelle zone amorfe del polimero, queste offrono dei punti di aggancio per le molecole d'acqua quindi un polimero prevalentemente amorfo avrà una velocità di degradazione decisamente maggiore rispetto ad un polimero prevalentemente cristallino.

Il PGA viene degradato in acido glicolico, che viene eliminato dal corpo umano attraverso le urine oppure può essere ulteriormente ossidato in gliossilato e acido ossalico, anch'essi eliminati attraverso le urine. L'acido glicolico è anche un intermedio nel ciclo di ossidazione del carbonio fotorespiratorio; viene convertito in glicina, che viene ulteriormente degradata in anidride carbonica ed espirata attraverso i polmoni.

Il PLA viene degradato in acido lattico, che è un sottoprodotto del metabolismo umano. Normalmente, nell'organismo umano, l'acido lattico deriva dalla disgregazione del glicogeno, degli aminoacidi e degli acidi dicarbossilici. I processi biologici che portano alla sua formazione sono: attività muscolare, metabolismo epatico e sanguigno. L'acido lattico è presente nel circolo sanguigno, mentre è presente nella pelle umana sotto forma di lattato. Il suo metabolismo è stato studiato nei conigli dopo l'iniezione di acido L-lattico marcato con ^{14}C (un isotopo radioattivo del carbonio). La maggior parte viene ossidata nei tessuti ad acido carbonico e successivamente espirata attraverso i polmoni. Solo una piccola parte si può trovare come glucosio e glicogeno. L'acido D-lattico viene prima convertito nell'isomero L nel fegato prima di essere ossidato ad anidride carbonica [26].

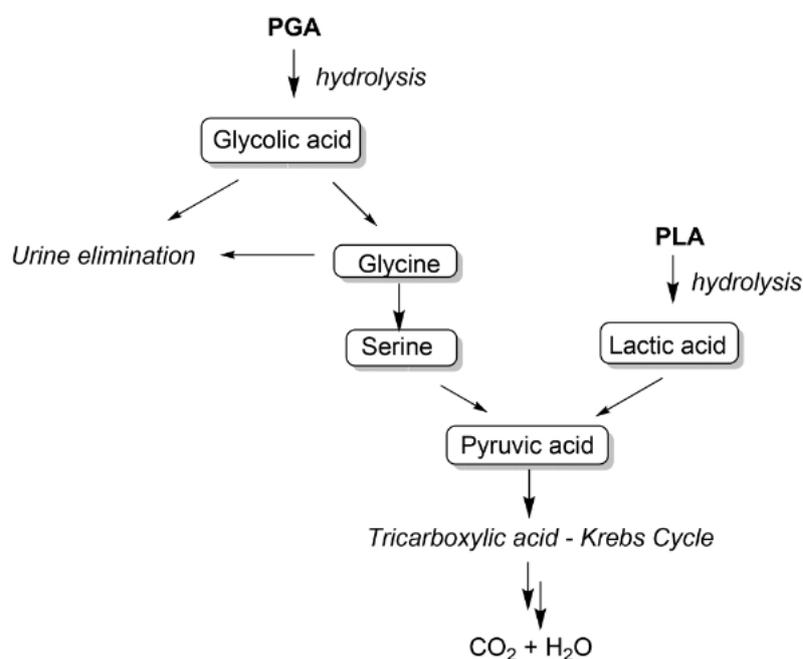


Figura 3: Schema degradativo di PGA e PLA [27].

In particolare, la degradazione di PLA e PGA non produce immediatamente una diminuzione della massa dell'impianto, che viene invece ritardata di mesi o anni, fino a quando il peso molecolare delle catene polimeriche si riduce a tal punto da permettere la loro libera diffusione fuori dalla matrice polimerica. A questo punto, il tessuto circostante non è in grado di eliminare i sottoprodotti acidi di un impianto che si degrada rapidamente, per cui può verificarsi una risposta infiammatoria o avversa [27]. Per superare questo problema, l'incorporazione di sali basici per prevenire un calo del pH durante il processo di degradazione si è dimostrata efficace in esperimenti in vitro [28].

Da recenti studi sulla tossicità di acido lattico e glicolico è emerso che l'escrezione media giornaliera di acido glicolico nelle urine dei bambini (da 3,5 a 13,5 anni di età) è risultata pari a 42 mg [29]. La bassa tossicità dell'acido glicolico si riflette ulteriormente nella bassa tossicità del glicole etilenico, poiché l'acido glicolico è un importante metabolita della degradazione del glicole etilenico nell'uomo. La dose orale letale di glicole etilenico nell'uomo è stimata a 1,6 g/kg di peso corporeo, che corrispondono a 112 g per una persona di 70 kg [30]. I pochi studi condotti con applicazioni subcroniche e croniche di D,L-lattato non hanno mostrato accumulo o effetti cumulativi [27].

L'acido glicolico è stato approvato dalla FDA per l'uso come additivo alimentare indiretto [31]. L'acido lattico è stato approvato per l'uso come additivo alimentare diretto ed è riconosciuto come sicuro per l'uso oltre l'infanzia a concentrazioni che non superano le buone pratiche di fabbricazione. Non è stata specificata una

dose giornaliera accettabile (Dietary Guidelines for Americans) per l'acido L-lattico, mentre per l'acido D-lattico è stata stabilita la DGA da 0 a 0,1 g/kg [32].

Dati questi presupposti sia PGA che PLA si dimostrano ottimi polimeri biodegradabili e biorisorbibili perché rispettano i criteri citati precedentemente. In questo articolo verrà approfondito il copolimero formato dall'unione di PGA e PLA cioè il PLGA.

1.6 PLGA

L'acido polilattico-co-glicolico è il copolimero derivante dalla polimerizzazione di acido lattico e glicolico (Figura 1A). L'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e i copolimeri sono i poliesteri alifatici più diffusi, infatti vengono sintetizzati da oltre 30 anni. La forma levogiro (L-lattide) e quella destrogiro (D-lattide) sono le due forme enantiomeriche del PLA, con la differenza che il PDLA, essendo un polimero amorfo, ha un tasso di degradazione molto più elevato del PLLA. Il PGA, essendo un materiale idrofilo, presenta un elevato tasso di degradazione. La combinazione di PGA e PLA viene solitamente impiegata per regolare il tasso di degradazione [33]. Si ottengono diverse forme di PLGA a seconda del rapporto tra acido lattico e glicolico utilizzato nel processo di polimerizzazione. Per la copolimerizzazione possono essere utilizzati sia L- che DL-lattidi. Inoltre si è osservato che gli omopolimeri sono molto più stabili rispetto ai copolimeri, infatti il 50/50 poli(lattide-co-glicolide) è molto instabile da un punto di vista idrolitico [24]. Infatti il poli(DL-lattide-co-glicolide) 50/50 si degrada in circa 1-2 mesi, il 75/25 in 4-5 mesi e l'85/15 in 5-6 mesi [34].

Il PLGA può essere disponibile in forma amorfa o cristallina e ciò dipende principalmente dalla struttura a blocchi e dal rapporto molare del copolimero. Un'altra proprietà fondamentale del PLGA è la sua temperatura di transizione vetrosa che si colloca tra i 40 e i 60°C [16].

Grazie alle caratteristiche appena citate, il PLGA è stato ampiamente utilizzato anche nei sistemi di somministrazione e rilascio controllato di farmaci. Le nanoparticelle contenenti agenti bioattivi non hanno mostrato reazioni indesiderate a livello locale o sistemico [35].

È stato dimostrato che le proprietà fisiche del PLGA dipendono da molteplici fattori, tra cui il peso molecolare iniziale, il rapporto tra lattide e glicolide, le dimensioni del dispositivo, l'estensione della superficie esposta all'acqua e dall'indice di polidispersità (misura dell'uniformità di distribuzione dei pesi molecolari in un determinato polimero) [36]. Queste proprietà influenzano anche la capacità di essere formulato come dispositivo di somministrazione di farmaci e possono controllare la velocità di degradazione e l'idrolisi del dispositivo. Studi recenti hanno tuttavia rilevato che anche il tipo di farmaco gioca un ruolo importante nel determinare la velocità di rilascio [37].

La degradazione del polimero avviene per idrolisi della catena, in particolare, la reazione dell'organismo al polimero può variare in base al tessuto, di conseguenza la

valutazione tossicologica è strettamente legata all'applicazione. Recentemente, è stato sviluppato un metodo per rilevare il comportamento degradativo delle nanoparticelle di PLGA iniettate per via endovenosa in diversi tessuti di topi. Si è notata una differenza tra la degradazione osservata *in vitro* e quella *in vivo*, inoltre il tasso di degradazione non dipendeva solo dalle dimensioni delle nanoparticelle, ma cambiava anche a seconda del tessuto [38].

A causa dell'idrolisi del PLGA, i parametri che sono tipicamente considerati invariati in una formulazione, possono cambiare nel tempo, come la temperatura di transizione vetrosa (T_g), la percentuale di umidità e il peso molecolare. Ovviamente ciò influisce anche sulla velocità di rilascio del farmaco incorporato e ciò è stato ampiamente studiato [39].

In conclusione, durante la progettazione di nanoparticelle a base di PLGA si dovrà tenere conto degli innumerevoli fattori appena descritti. Per arrivare alla formulazione finale è necessario ricorrere a numerose sperimentazioni, partendo da quella *in silico* fino alla sperimentazione *in vivo*.

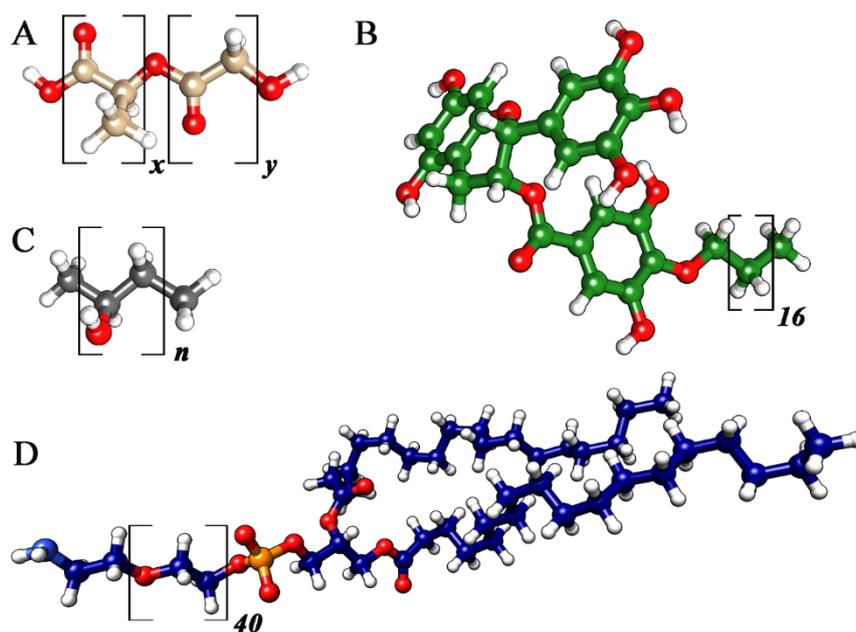


Figura 4: Struttura chimica del PLGA (A), C18-EGCG (B), PVA (C), e DSPE-PEG2000 (D). Gli atomi di H, O, P e N sono stati riportati in bianco, rosso, arancio e azzurro rispettivamente.

Capitolo 2

Epigallocatechina-3-gallato

2.1 Descrizione e azione antiossidante

L'epigallocatechina-3-gallato, abbreviato in EGCG, è una molecola facente parte della famiglia delle catechine ed è la più abbondante catechina presente nel tè verde. Questa molecola presenta una notevole bioattività che va da effetti preventivi contro la tumorigenesi a quelli di prevenzione del cancro e, in generale, delle patologie associate all'età, nonché di regolazione del sistema immunitario ed endocrino [40].

Queste caratteristiche sono dovute alla sua dimostrata attività di *scavenging* dei radicali liberi che permette all'EGCG di avere un'azione protettiva nei confronti dei componenti cellulari che vanno incontro a danno ossidativo.

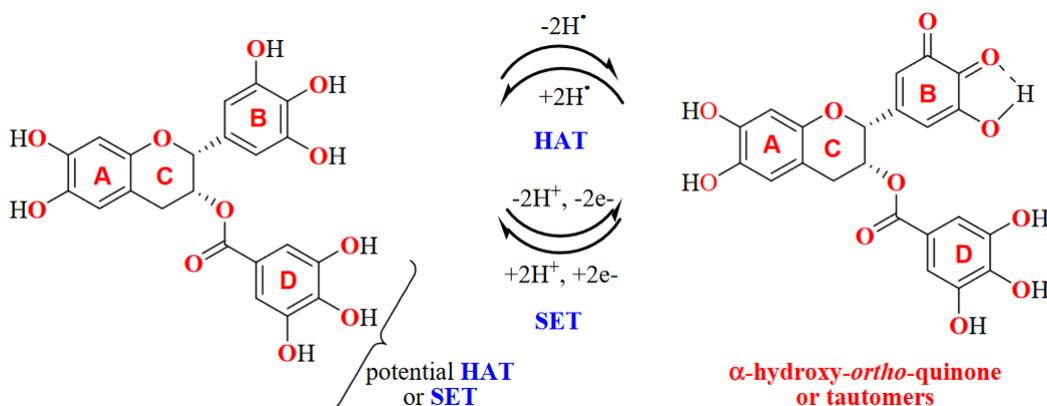


Figura 5: Meccanismo HAT e SET [41].

L'attività antiossidante deriva principalmente dalla reattività degli anelli aromatici B e D idrossi-sostituiti, questi possono neutralizzare i radicali attraverso due meccanismi:

- SET: meccanismo di trasferimento di un singolo elettrone
- HAT: meccanismo di trasferimento di un atomo di idrogeno

Questi meccanismi portano alla formazione di un radicale fenossico che sarà poi stabilizzato dal legame a idrogeno intramolecolare, alla fine della reazione la molecola sarà convertita in α -idrossi-ortoquinone [41].

Nonostante la sua elevata bioattività, l'uso dell'EGCG come farmaco o additivo naturale è compromesso dalla sua labilità in termini di stato ossidativo e dalla sua intrinseca instabilità, che determinano una scarsa biodisponibilità all'interno del sistema biologico, qualunque sia la modalità di somministrazione [42]. La stabilizzazione di EGCG può essere ottenuta con diversi approcci, tra cui l'impiego di agenti riducenti, modifiche strutturali e/o sistemi di rilascio di farmaci [43]. L'applicazione di strategie di derivatizzazione volte a incrementare l'idrofobicità della molecola e l'interazione con la membrana cellulare è considerata un approccio efficace per migliorare l'attività delle molecole bioattive [41].

2.2 Epigallocatechina-3-gallato C-18

Per ottenere una molecola più stabile e permeabile alle membrane, l'EGCG è stato funzionalizzato legando in posizione para dell'anello D una catena alifatica formata da 18 carboni. La posizione del gruppo ottadecilico è stata determinata mediante NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) e supportata da calcoli quantomeccanici di Teoria del Funzionale della Densità Elettronica (DFT) (Figura 4B).

Le proprietà migliorate sono state dimostrate attraverso esperimenti *in silico*, utilizzando come riferimento un liposoma a doppio strato fosfolipidico. Inoltre la sua attività antiossidante è stata studiata utilizzando DPPH (radicale stabile), in questi esperimenti è stato osservato che C18-EGCG riesce ad avere azione antiossidante proteggendo il doppio strato fosfolipidico da stress ossidativo [41].

Capitolo 3

Scopo della tesi

In questo lavoro, l'impatto della concentrazione di C18-EGCG sulle NP PLGA è stato studiato sottolineando l'importanza dell'uso di opportuni stabilizzanti per ottenere nanosistemi stabili colloidali. Sono state preparate sei formulazioni, tre delle quali sono state trattate in presenza di alcol polivinilico (PVA) (Figura 4C), che è uno stabilizzante sterico ampiamente utilizzato [28], mentre altre tre formulazioni sono state considerate aggiungendo DPSE-PEG₂₀₀₀ molecola di ammina (Figura 4D), che è una classe di derivati PEG che è attaccata alla porzione lipidica DSPE. Il lipide PEG è stato ampiamente utilizzato per migliorare i tempi di circolazione dei farmaci incapsulati e ridurre gli assorbimenti non specifici [44]. Sebbene i vettori PLGA-NP abbiano mostrato un grande potenziale, la mancanza di linee guida normative specifiche per la caratterizzazione di tali materiali contrasta i loro usi clinici e le potenzialità di commercializzazione [45]. A questo proposito, per monitorare completamente queste NP, è stato svolto uno studio articolato con diversi approcci. Sono state effettuate simulazioni di Dinamica Molecolare (MD) full-atoms per descrivere i movimenti e le interazioni dei sistemi PLGA/C18-EGCG, inoltre, è stata riportata una chiara descrizione della produzione di NP con una sezione riguardante la caratterizzazione dei sistemi, con una menzione specifica sull'effetto di DSPE-PEG₂₀₀₀ sui PLGA NP. D'altra parte, è stato stabilito un approccio sperimentale per ottenere informazioni come il drug loading, la dimensione delle particelle e la stabilità colloidale. Quindi, la microscopia elettronica a scansione (SEM) [46] e la spettroscopia ATR-FTIR [47] sono state utilizzate rispettivamente per chiarire la morfologia delle NP e le interazioni molecolari tra PLGA e C18-EGCG. L'uso combinato di tecniche sperimentali e computazionali ha fornito ulteriori informazioni sul comportamento sia delle NP PLGA da sole sia dei sistemi polimerici contenenti C18-EGCG, fornendo linee guida per la produzione di NP complesse e affidabili in termini di effetto terapeutico.

Capitolo 4

Materiale e metodi

4.1 Sperimentazione in silico

4.1.1 Meccanica classica

Il primo approccio per ottenere efficienti formulazioni di NP è la sperimentazione *in silico*. Tale approccio permette di simulare il sistema formato da NP e C18-EGCG e consente di avere accesso anche a fenomeni atomistici difficilmente investigabili con tecniche sperimentali. Ci si avvale quindi della chimica computazionale, ovvero la branca della chimica teorica che si occupa dello sviluppo di modelli matematici, basati su nozioni di meccanica classica e di meccanica quantistica, con lo scopo di calcolarne le grandezze fisiche caratteristiche e prevederne le proprietà chimiche. La modellistica molecolare (molecular modeling) è un insieme di tecniche e metodi computazionali derivati dalla chimica computazionale, che ha lo scopo di ottenere, rappresentare e manipolare strutture, reazioni molecolari e tutte quelle proprietà strettamente legate alla tridimensionalità dei sistemi. È possibile trattare il sistema molecolare in esame in due modi: considerando l'atomo come l'unità fondamentale utilizzando la meccanica molecolare (facendo uso delle leggi della meccanica classica o newtoniana), o analizzando ogni aspetto dell'atomo attraverso un modello elettronico esplicito tramite un approccio quanto-meccanico.

Il trattamento di sistemi di grandi dimensioni, ad esempio sistemi con migliaia o centinaia di migliaia di atomi, non può essere effettuato con tutte le tecniche della modellistica molecolare perché sarebbe troppo dispendioso dal punto di vista del tempo e delle risorse computazionali. In questi casi, dato che ci si riferisce a sistemi polimerici, si utilizza la meccanica molecolare, con cui non si considerano le proprietà elettroniche ma i soli aspetti strutturali. Tale approccio è possibile, poiché gli atomi esplicitamente coinvolti in processi biologici (come idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, fosforo, zolfo, e metalli come sodio o magnesio) presentano ben pochi elettroni, e non vi sono esplicite problematiche di tipo elettronico da considerare. A tale scopo si fa uso dell'approssimazione di Born-Oppenheimer che descrive il moto degli elettroni separato da quello dei nuclei rispetto all'equazione di Schrödinger. Quindi la meccanica molecolare tratta i soli nuclei e lascia gli elettroni impliciti. La meccanica molecolare trova la propria estrinsecazione nell'utilizzo di Force Field (o campo di forza), ossia un potenziale che descrive le caratteristiche energetiche che

la molecola genera attorno a sé in un determinato spazio di simulazione: in questo modo è possibile valutare le proprietà dinamiche della molecola in esame rispetto ad un particolare ambiente, in una certa conformazione, o rispetto ad un'altra molecola.

La meccanica molecolare considera gli atomi come delle masse legate tra loro da forze armoniche o elastiche. Tali forze possono essere descritte da funzioni di energia potenziale legate a caratteristiche strutturali quali lunghezze di legame (E_s), angoli di legame (E_b), angoli diedri (E_w) e interazioni di non legame (E_{nb}). L'energia di una molecola è funzione della sua struttura e può essere approssimata ad una somma di contributi energetici:

$$E = E_s + E_b + E_w + E_{nb} \quad (4.1)$$

E è l'energia sterica, essa rappresenta la differenza di energia tra la molecola reale e una molecola ipotetica dove tutti i valori strutturali come angoli e lunghezze di legame sono esattamente uguali al loro valore "ideale" o "naturale". I primi tre termini riguardano l'energia correlata ai legami, l'ultimo termine invece riguarda l'energia di non legame.

4.1.2 Potenziale stretching E_s

E_s è l'energia di stretching, ovvero l'energia relativa alla lunghezza di legame. Viene utilizzata l'equazione del potenziale armonico, cioè la legge di Hooke.

$$E_s = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} K_s (r_i - r_{i0})^2 \quad (4.2)$$

N è il numero totale di legami nella molecola, K_s sono le costanti di forza di stretching, r_i sono le lunghezze del legame reale, r_{i0} sono le lunghezze dei legami naturali.

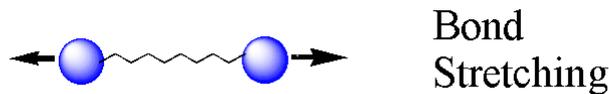


Figura 6: Movimento di stretching atomico.

Se si vuole rendere più accurata la descrizione di questo termine energetico va presa in considerazione anche la funzione di Morse, questo termine di anarmonicità è dovuto al fatto che se la molla viene estesa oltre un certo limite non risponde più in maniera armonica. Si aggiunge un termine cubico a quello quadratico della legge di Hooke.

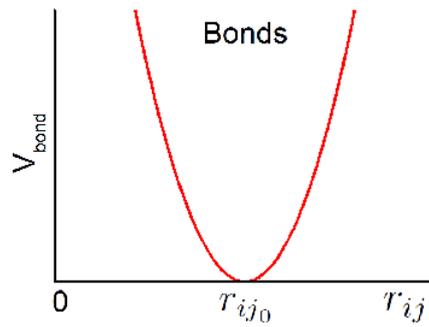


Figura 7: Andamento del potenziale in funzione del movimento di stretching secondo il potenziale armonico.

$$E_s = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} K_s (r_i - r_{i0})^2 + K' (r_i - r_{i0})^3 \quad (4.3)$$

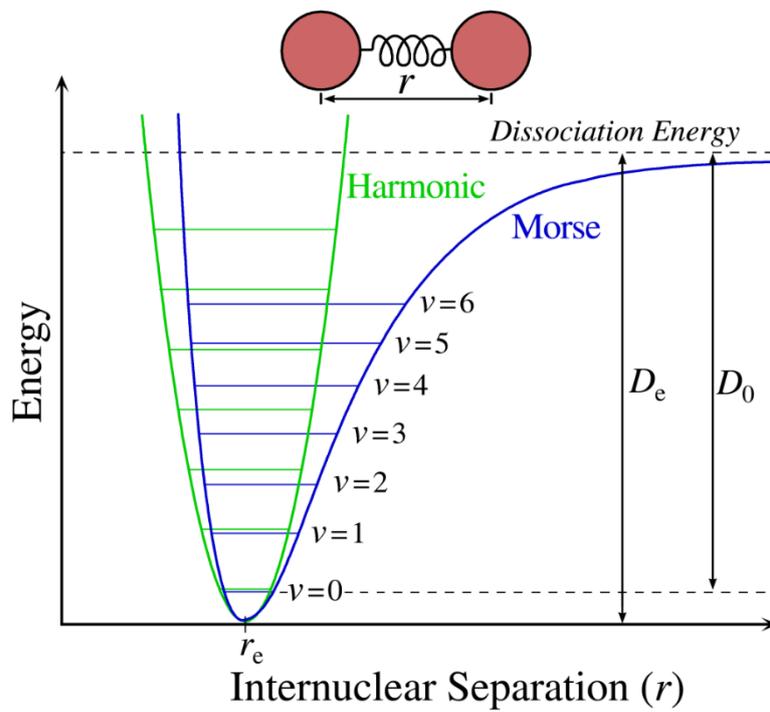


Figura 8: Andamento dell'energia in funzione del movimento di stretching secondo il potenziale armonico (in verde) e di Morse (in blu).

4.1.3 Potenziale di Bending E_b

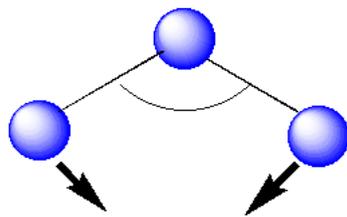
È l'energia di bending. Rappresenta l'energia potenziale dell'angolo di legame.

$$E_b = \sum_{i=1}^M \frac{1}{2} K_b (\theta_i - \theta_{i0})^2 \quad (4.4)$$

M è il numero totale di angoli di legame presenti, K_b sono le costanti di forza di bending, θ_i sono gli angoli di legame reali, θ_{i0} sono gli angoli di legame naturali. I termini E_s e E_b sono legati tra loro e in genere una deviazione dell'uno comporta anche una deviazione dell'altro termine per cui a volte si considera un termine aggiuntivo "cross-term".

$$E_{sb} = \sum_{i < j} \frac{1}{2} K_{ij}^{sb} (r_i - r_{i0} + r_j - r_{j0}) (\theta_{ij} - \theta_{ij0}) \quad (4.5)$$

Un altro termine di correzione è la distinzione del bending *in-plane* dal bending *out-of-plane* per gli atomi ibridizzati sp^2 , cioè se il movimento di bending avviene sul piano della molecola oppure no.



Valence angle
bending

Figura 9: Movimento di bending atomico.

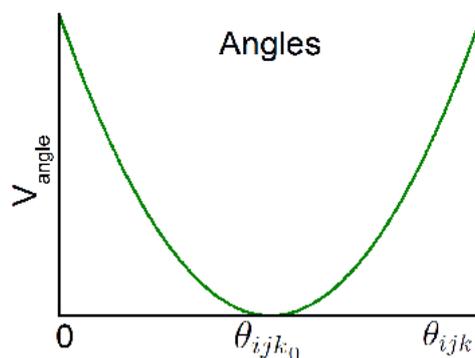


Figura 10: Andamento del potenziale in funzione del movimento di bending.

4.1.4 Potenziale torsionale E_w

È l'energia dovuta alla torsione dei diedri. L'angolo diedro è definito per una serie di atomi A-B-C-D legati covalentemente, come l'angolo misurato dall'asse B-C tra il piano A-B-C e il piano B-C-D. Per definire quest'energia si utilizzano le trasformate di Fourier.

$$E_w = \sum_{\text{diedri}} \left(\frac{1}{2} V_1 (1 + \cos \omega) + \frac{1}{2} V_2 (1 + \cos 2\omega) + \frac{1}{2} V_3 (1 + \cos 3\omega) \dots \right) \quad (4.6)$$

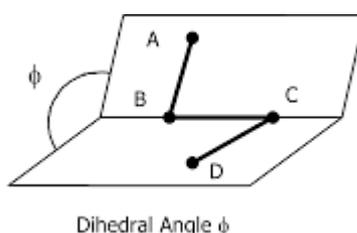


Figura 11: Angolo diedro.

Un'interpretazione fisica di queste costanti è: V_1 riguarda interazioni dipolo-dipolo, V_2 iperconiugazione degli alcani (interazione degli elettroni di un legame *sigma* con un orbitale *p* vuoto o parzialmente riempito) o coniugazione in sistemi insaturi e V_3 termine sterico. I termini V_1 e V_2 sono più consistenti per sistemi contenenti eteroatomi.

Generalmente richiede meno energia distorcere un angolo diedro che piegare un angolo di legame. Perciò una distorsione molecolare mostrerà una maggiore porzione di energia torsionale rispetto ai termini E_s e E_b .

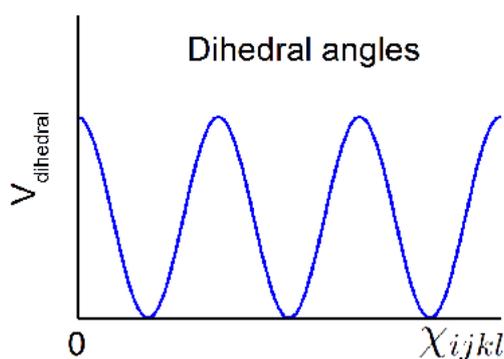


Figura 12: Andamento del potenziale in funzione della torsione dell'angolo diedro.

Quando si hanno sistemi ibridizzati *sp2* le cose si complicano perché il bending *out-of-plane* può distruggere la simmetria del sistema, per cui tali interazioni devono essere trattate a parte.

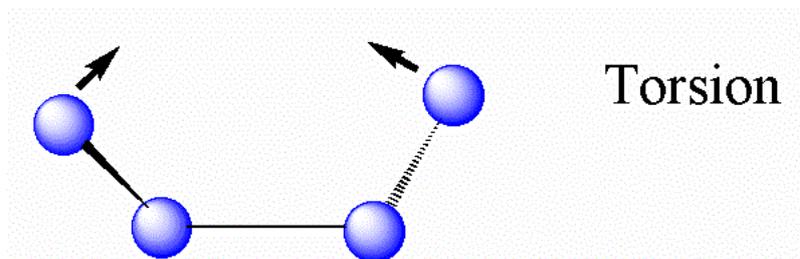


Figura 13: Torsione di un angolo diedro.

4.1.5 Potenziale di non legame E_{nb}

È un termine energetico che comprende tutte le energie di non legame. Può essere suddiviso in due contributi, l'energia di Van der Waals e l'energia elettrostatica.

Il termine di energia potenziale di Van der Waals è legato alle interazioni di non legame tra coppie di atomi ed è funzione della distanza tra i nuclei. Le due funzioni di energia potenziale più usate sono: il potenziale di Lennard-Jones e quello di Buckingham. Il potenziale di Lennard-Jones richiede un calcolo meno oneroso rispetto al potenziale di Buckingham. Considera quelle che sono le interazioni a corto raggio.

$$E_{vdw} = \varepsilon \left[\left(\frac{r_0}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (4.7)$$

ε è la costante dielettrica del mezzo, il termine elevato alla sesta è la parte attrattiva dell'interazione, il termine elevato alla dodicesima è la parte repulsiva dell'interazione.

Il termine elettrostatico viene descritto tramite il potenziale di Coulomb.

$$E_{ele} = \frac{kQ_iQ_j}{4\pi\varepsilon r_{ij}} \quad (4.8)$$

Q_i e Q_j sono le cariche parziali sugli atomi i e j .

Tutti i termini energetici vengono considerati nel loro insieme e formano il cosiddetto Force Field. Il Force Field esprime l'energia potenziale di un sistema di particelle (solitamente, ma non necessariamente, atomi). Le funzioni del Force Field ed i set di parametri sono derivati sia da dati sperimentali che da calcoli quantomeccanici *ab initio* di livello elevato. Per cui ogni atomo viene descritto utilizzando una serie di parametri che riguardano: l'ibridazione, la carica formale sull'atomo, gli atomi vicini con cui è legato. In questa maniera si definisce l'*atomtype*, il quale rappresenta l'ambiente chimico di un atomo.

Il Force Field (FF) utilizzato per le simulazioni di dinamica molecolare è chiamato AMBER.

4.1.6 Analisi conformazionale e minimizzazione dell'energia

L'analisi conformazionale è lo studio delle conformazioni di una molecola e delle sue proprietà e comportamento. La maggior parte delle molecole organiche, ed in

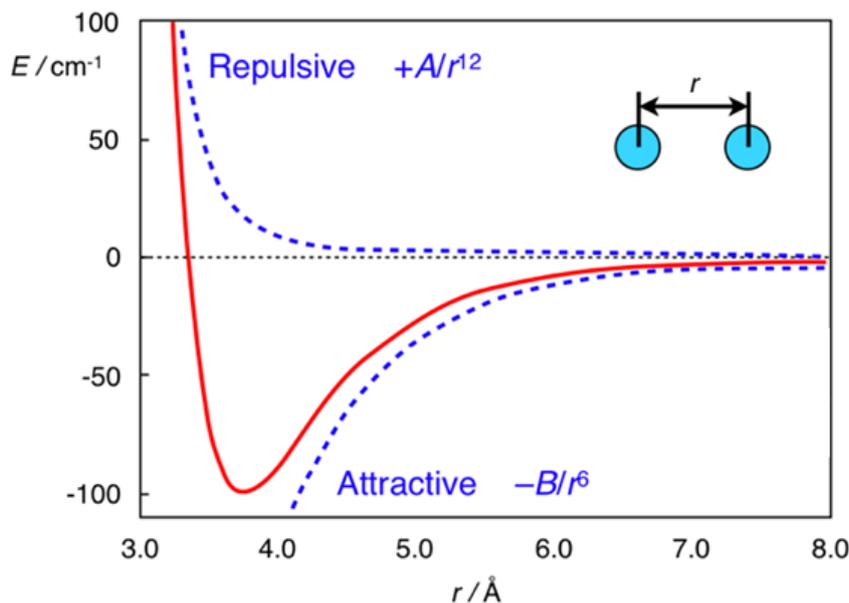


Figura 14: La funzione del potenziale di Lennard-Jones in rosso.

particolare le strutture polimeriche, può assumere più di una conformazione e le varie conformazioni possono essere diversamente popolate.

L'interconversione tra le conformazioni è dovuta alle vibrazioni interne della molecola che provengono da una varietà di moti interni come lo stiramento di legame, il piegamento degli angoli di legame e le rotazioni attorno ai legami semplici, tutti termini energetici opportunamente considerati nei Force Field.

La funzione di energia potenziale di un sistema molecolare può essere descritta come una superficie complessa che presenta un elevato numero di dimensioni. Tale superficie presenta un unico punto di minimo assoluto, o globale, e più minimi locali; in questi punti le derivate prime della funzione di energia potenziale rispetto alle coordinate sono pari a zero, e tutte le derivate seconde sono positive. Nella superficie si trovano anche i punti a sella, che sono punti di transizione e i punti di massimo, corrispondenti a conformazioni molecolari energeticamente improbabili, poiché non stabili. La minimizzazione dell'energia è un metodo che viene utilizzato per calcolare lo stato di equilibrio di una molecola o di un sistema supramolecolare, cioè la conformazione assunta al minimo energetico, che può essere un minimo locale o globale. Partendo da una geometria molecolare di non-equilibrio si impiegano delle procedure matematiche che permettono di muoversi lungo la Superficie di Energia Potenziale (PES) e trovare un minimo conformazionale del sistema. Gli algoritmi di minimizzazione normalmente usati in meccanica molecolare sfruttano la conoscenza delle derivate della espressione dell'energia in funzione delle coordinate $E(R)$ per decidere in che direzione muoversi sulla superficie di potenziale (cioè in che modo far variare le coordinate). Le due principali caratteristiche di un algoritmo di minimizzazione sono l'efficienza (trovare il minimo nel minor tempo di

calcolo possibile) e la robustezza (funzionare bene qualunque sia la conformazione di partenza). Gli algoritmi matematici più utilizzati a questo scopo sono: Steepest Descent e Conjugate Gradient, entrambi metodi detti *downhill*.

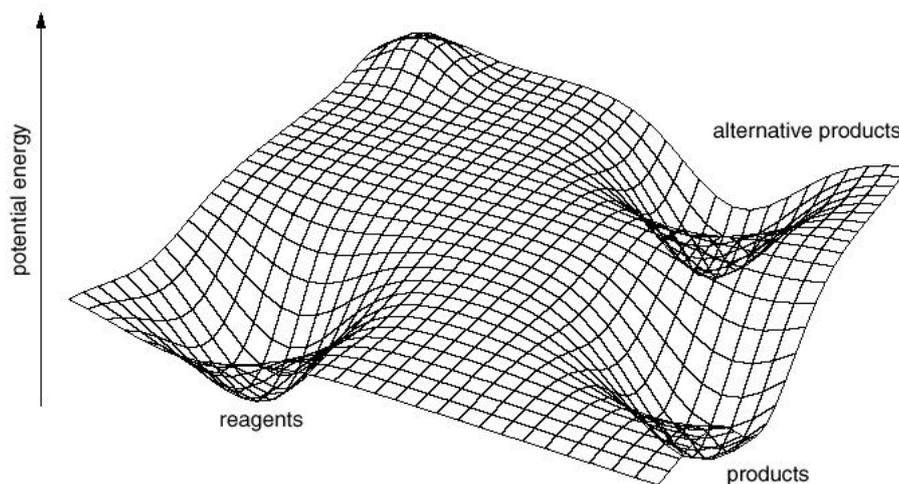


Figura 15: Superficie di energia potenziale (PES).

Lo Steepest Descent non è un algoritmo molto efficiente, ma è robusto e facile da implementare. La ricerca del minimo avviene lungo una direzione delle coordinate (*line search*), la quale è opposta al gradiente. Una volta che viene trovato il minimo lungo questa direzione ne viene creata una nuova opposta al gradiente in quel punto. La procedura viene ripetuta più volte fino così che la derivata prima tenda allo zero, e in questo caso si dice che la minimizzazione sta convergendo. Supponendo che l'energia potenziale possa essere descritta da una superficie bidimensionale, le direzioni lungo cui la minimizzazione procede sono sempre perpendicolari, la precedente con la successiva, per cui questo approccio assume un carattere oscillante, e diviene sempre più inefficiente man mano che raggiunge il minimo. La minimizzazione procede velocemente se la geometria è lontana dal minimo mentre procede lentamente se la conformazione è vicina all'optimum. Il Conjugate Gradient è più lento dello Steepest Descent nelle prime fasi della minimizzazione, ma diviene più efficiente vicino al minimo energetico. Vengono prodotte una serie di *line search* con direzioni mutuamente coniugate. Questo sistema comporta che il gradiente successivo sia ortogonale a tutti i precedenti gradienti, quindi la nuova direzione è coniugata alle precedenti.

Esistono tre procedure fondamentali per compiere un'analisi conformazionale:

- Ricerca sistematica (grid search o systematic search)
- Ricerca statistica (metodo Metropolis Monte Carlo)

- Dinamica molecolare

La ricerca conformazionale può generare un gran numero di dati che devono essere analizzati. Molte delle conformazioni generate sono molto simili, è quindi preferibile essere in grado di selezionare dal set di dati un set di conformazioni rappresentative più piccolo. Questo può essere fatto con l'analisi di cluster che raggruppa insieme oggetti simili da cui estrarre i più rappresentativi.

La strategia della ricerca sistematica consiste nel far variare ad intervalli fissi per tutti i 360° tutti gli angoli diedri della molecola (o un loro sottoinsieme). Vanno considerate tutte le possibili combinazioni tra questi angoli. Ogni conformazione così generata è sottoposta a minimizzazione dell'energia. Il metodo Monte Carlo è un metodo di ricerca stocastico in cui la conformazione di partenza è modificata variando gli angoli diedri intorno a legami semplici di valori casuali. Se la conformazione così prodotta non è stata già trovata in precedenza, è memorizzata. A questo punto si sceglie una nuova conformazione di partenza, e si ripete il procedimento. Essendo casuale, un processo del genere non ha una fine ben precisa. Si può decidere di finire la ricerca quando dopo un certo numero di stadi non si trovano più nuove conformazioni, ma non c'è mai la certezza che non ci siano altre conformazioni a più bassa energia. In ogni caso, per raggiungere una buona probabilità di aver trovato tutte le conformazioni occorre ottenere ciascuna di esse varie volte, e questo ovviamente limita l'efficienza del metodo.

4.1.7 Dinamica molecolare

Attraverso la dinamica molecolare MD è possibile ottenere un elevato numero di conformazioni che la molecola può assumere. La dinamica molecolare è un altro metodo molto efficiente per esplorare lo spazio conformazionale di una molecola. Infatti simula il comportamento reale della molecola, questa tende a sistemarsi in conformazioni a bassa energia, ma avendo un certo moto termico è in grado di superare la barriera di energia che separa una conformazione dall'altra. La procedura normalmente utilizzata è di effettuare la simulazione di dinamica molecolare, memorizzando ad intervalli regolari la conformazione assunta dalla molecola. Queste conformazioni sono poi usate come punti di partenza per la successiva minimizzazione dell'energia. L'insieme delle coordinate atomiche molecolari nella successione temporale della simulazione rappresentano l'evoluzione del moto atomico nel tempo, ovvero la traiettoria della simulazione. Per effettuare, condurre e analizzare le traiettorie di dinamica molecolare si possono utilizzare vari tipi di algoritmi, il GROMACS è un pacchetto di software contenente vari algoritmi che consentono di effettuare la dinamica molecolare.

4.1.8 Basi teoriche della dinamica molecolare: L'equazione del moto di Newton

La dinamica molecolare (MD) risolve la semplice equazione del moto di Newton, per cui si parla di simulazioni di dinamica molecolare classica.

$$F_i = m_i a_i(t) \quad (4.9)$$

$$F_i = -\left(\frac{dE}{Dr_i}\right) \quad (4.10)$$

$$-\left(\frac{dE}{Dr_i}\right) = m_i \left(\frac{d^2 r_i}{dt^2}\right) \quad (4.11)$$

L'equazione classica del moto è deterministica, quindi conoscendo le coordinate e le velocità al tempo t_0 è possibile calcolare le due variabili al tempo t_1 , per cui è possibile seguire la traiettoria. Per seguire una traiettoria e quindi conoscere le coordinate al trascorrere tempo si possono utilizzare vari tipi di algoritmo come: Verlet, Leap-Frog, Velocity Verlet e Beeman.

4.1.9 Ensembles

Risolvendo l'equazione del moto si generano una serie di punti nello spazio multidimensionale in funzione del tempo. Con un sistema di N particelle si ha uno spazio di $6N$ dimensioni. Un unico punto nello spazio multidimensionale descrive lo stato del sistema. Un ensemble è una collezione di punti nello spazio che soddisfa le condizioni di un particolare stato termodinamico. Sono tre gli ensemble comunemente usati nella MD, sono descritti da tre variabili termodinamiche che sono mantenute costanti.

- The constant-NVE or microcanonical ensemble (sono mantenuti costanti volume e energia totale)
- The constant-NVT or canonical ensemble (sono mantenuti costanti volume e temperatura)
- The constant-NPT or isothermal-isobaric ensemble (sono mantenute costanti pressione e temperatura)

4.1.10 Condizioni periodiche di contorno

Le condizioni periodiche al contorno sono una serie di condizioni al contorno usate per simulare grandi sistemi.

Una cella unitaria o un box di simulazione sono delle unità di spazio che racchiudono il sistema da analizzare, il box è periodico nel senso che viene replicato uguale a sé stesso lungo le tre direzioni x , y e z ; tutto ciò che esce dal box rientra dalla faccia opposta alla stessa velocità. Il box deve essere grande abbastanza da impedire la

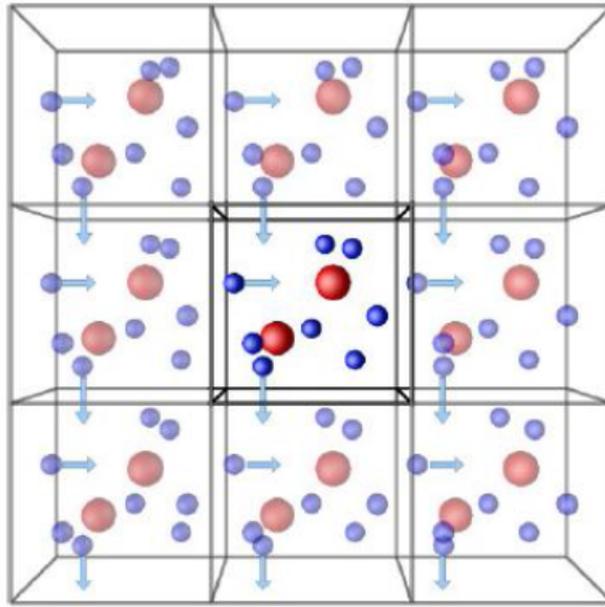


Figura 16: Rappresentazione delle condizioni periodiche al contorno (PBC).

creazione di artefatti, cioè il sistema durante la simulazione non dovrà superare i margini del box.

4.1.11 Coupling della temperatura e della pressione

Il GROMACS usa tre principali algoritmi per il coupling della pressione che sono Berendsen, V-rescale e Nosè-Hoover.

- Berendsen: viene utilizzato per la fase di equilibrizzazione, non genera il corretto ensemble termodinamico per questo viene definito weak-coupling (coupling debole della temperatura) [48]
- V-rescale: è una modificazione del Berendsen che assicura una corretta distribuzione dell'energia cinetica. I vantaggi sono gli stessi riscontrati nell' utilizzo del Berendsen, ed in più produce un corretto ensemble canonico [49]
- Nosè-Hoover: è utilizzato per la fase produttiva della simulazione, poiché garantisce un corretto ensemble termodinamico [50]

Per quanto riguarda il controllo della pressione, gli algoritmi utilizzati dal GROMACS sono due:

- Berendsen: anche in questo caso viene utilizzato per la fase di equilibrizzazione [48]
- Parrinello-Rahman: viene utilizzato in associazione col Nosè-Hoover e permette un corretto ensemble in NPT. Può essere gestito in maniera isotropica, semi-isotropica e anisotropica. Nella simulazione isotropica, lungo gli assi x, y

e z, il controllo della pressione è gestito omogeneamente, le dimensioni del box vengono scalate omogeneamente lungo le tre direzioni (come nel caso di polimeri in soluzione). Nel semi-isotropico la pressione viene gestita in maniera indipendente nel piano x-y rispetto all'asse z (ad es. per la simulazione di proteine in membrana o di sistemi lipidici anisotropi come le membrane cellulari) [51]

4.1.12 Modelli di solvente

Simulare la corretta solvatazione dell'ambiente per il sistema molecolare significa cercare il miglior modello esplicito da usare per l'acqua. Esistono diversi modelli dell'acqua, in cui variano i parametri geometrici.

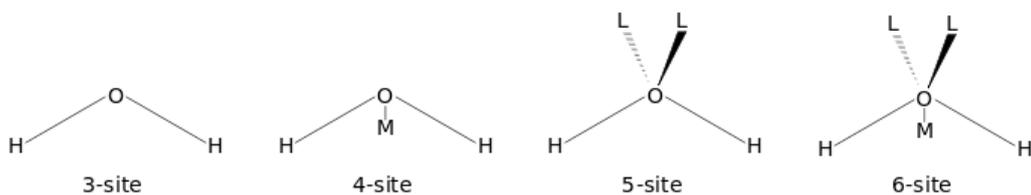


Figura 17: Modelli rappresentativi dell'acqua.

Il modello *TIP3P* rappresenta un buon compromesso tra accuratezza e costo computazionale. Il modello presenta tre siti di interazione, corrispondenti ai tre atomi della molecola d'acqua. A ogni atomo è associata una carica puntuale, e l'atomo di ossigeno ha inoltre assegnati i parametri di Lennard-Jones. I modelli a 4, 5 e 6 siti considerano esplicitamente gli elettroni di non legame dell'ossigeno di una molecola di acqua, sono molto accurati ma richiedono elevati costi computazionali, per cui si utilizzano solo nel caso di piccoli sistemi biochimici e chimici.

4.1.13 Lo scoring

Al termine delle simulazioni di dinamica molecolare, vengono valutate le energie di tutti i complessi polimerici trovati al termine della fase di produzione, in modo da individuare il complesso con la più bassa energia. Così, il punto fondamentale di un metodo computazionale efficiente è avere uno schema di punteggio in grado di valutare un gran numero di soluzioni e discriminare i complessi che si legano in maniera corretta rispetto a tutti quelli generati. Un criterio basato esclusivamente sulla complementarità geometrica non permette di discriminare bene tra complessi. Le interazioni tra strutture poliedriche, molecole di solvente e molecole di farmaci avvengono tramite legami idrogeno, interazioni di Van der Waals, ponti salini e contatti elettrostatici.

Le variazioni di entropia e di entalpia dipendono da un lato dalle variazioni che si verificano a livello del solvente, e dall'altro dal soluto. Per quanto riguarda il solvente, la desolvatazione dovuta alla formazione del complesso può riguardare le parti polari

e cariche sulle superfici dei sistemi polimerici, oppure può avere lo stesso effetto sulle parti non polari. Il contributo per le parti cariche e polari è sfavorevole dal punto di vista entalpico perché le interazioni che il polimero forma con le molecole di solvente sono generalmente più forti rispetto a quelle che si formeranno tra polimeri. Le parti apolari daranno un contributo favorevole perché aumenta l'entropia grazie alle molecole d'acqua rilasciate e si formeranno interazioni più favorevoli nel complesso, dall'altro lato ci sarà anche un contributo sfavorevole per la formazione di una cavità nel solvente che contenga il soluto.

Per quanto riguarda il soluto, si ha una variazione dell'entropia dovuta alla formazione del complesso, da un lato si ha perdita di entropia rotazionale e traslazionale, ed anche la perdita di entropia conformazionale dovuta alla restrizione degli angoli diedri, quindi il contributo è sfavorevole. Il termine entalpico è invece legato all'energia interna (conformazionale) del complesso.

4.1.14 Settaggio del sistema

Durante il periodo di tesi sono stati considerati differenti sistemi polimerici nanoparticellari con un copolimero derivato dall'utilizzo di due monomeri di acido polilattico (PLA) ed acido poliglicolico (PGA). Tale copolimero (PLGA) presenta il 75% di unità monomeriche di PLA amorfo ed il restante 25% di PGA. Tali sistemi sono stati posti in un box di simulazione di 52 nm^3 ed ognuno di essi è stato opportunamente solvatato con 896.452 molecole di acqua e 0.15 M di NaCl per ricreare le condizioni fisiologiche. Questo sistema è stato considerato per tre differenti simulazioni di dinamica molecolare. Nella prima simulazione è stata considerata l'attività del polimero a contatto con il solvente, in relazione al contatto con i fluidi biologici. Nelle successive due simulazioni sono state introdotte 16 e 34 molecole di C18-EGCG. La scelta del numero specifico di molecole di farmaco da aggiungere è relativa alla volontà di ricreare specifiche condizioni sperimentali in cui si aggiungono quantità pari a 1:5 e 1:2 in rapporto peso/peso tra C18-EGCG e PLGA. È stata determinata l'efficienza di incapsulamento nelle simulazioni contando il numero di molecole di farmaco intrappolate dal polimero in relazione al numero totale di molecole di farmaco nel sistema. Le catene di polimero sono state modellate utilizzando CharmmGUI, ovvero una suite che permette, tramite la funzione Building Polymer, di generare strutture polimeriche più o meno complesse, considerando con molta precisione il grado di cristallinità desiderato e quindi la tatticità del polimero stesso. Sono state introdotte unità polimeriche di lunghezza variabile, allo scopo di simulare gli eventi di polidispersività normalmente osservati in ambito sperimentale e durante i processi di lavorazione. Tutti i sistemi sono stati sottoposti a simulazioni di dinamica molecolare di 200 ns, e le traiettorie atomistiche generate sono state analizzate per determinare le peculiari proprietà dei sistemi in relazione alle evidenze sperimentali.

4.2 Caratterizzazione AFT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è un metodo di analisi non distruttivo che permette lo studio dei materiali attraverso l'analisi delle vibrazioni dei legami chimici eccitati dalle radiazioni infrarosse. Ogni tipo di legame assorbe una determinata lunghezza d'onda che ne causa il cambiamento del momento di dipolo. Il numero di picchi derivano dal numero di tipologie di gruppi funzionali presenti nel materiale mentre l'intensità dei picchi è correlata alla variazione del momento di dipolo.

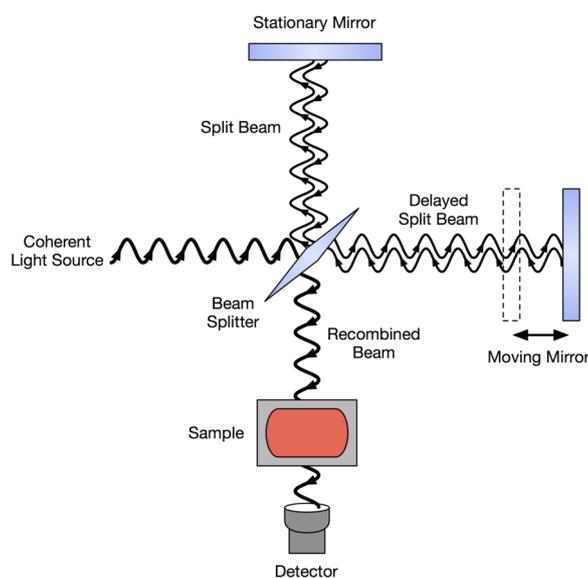


Figura 18: Spettroscopia infrarossa

Le tipologie di vibrazione dei gruppi funzionali si possono dividere in moti *in plane* (come stretching simmetrico, asimmetrico, deformazione e rocking) oppure *out of plane* (wagging e twisting). Queste tipologie di vibrazioni sono riassunte in Figura 19.

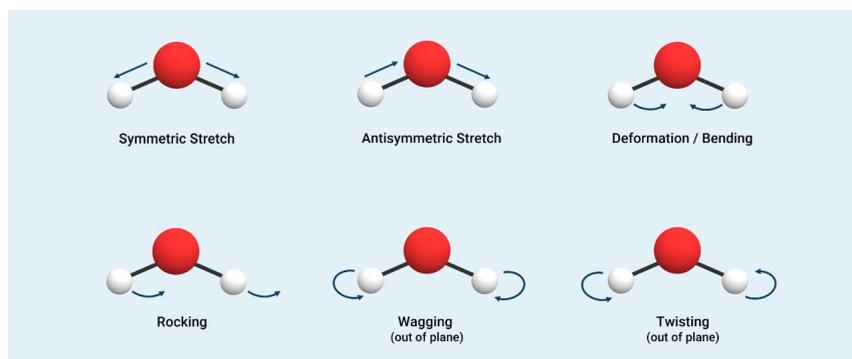


Figura 19: Tipologie di vibrazioni dei gruppi funzionali eccitati dalla radiazione infrarossa.

Lo spettroscopio utilizzato per studiare il C18-EGCG analizza nel campo del medio infrarosso cioè con un range di lunghezze d'onda che va dai $2\mu\text{m}$ ai $25\mu\text{m}$.

La riflettanza totale attenuata (ATR) è quindi un metodo di campionamento che sfrutta la penetrazione della radiazione infrarossa in un campione, per acquisire dati sulla sua struttura e sulla sua composizione. L'ATR è una delle tecnologie di campionamento più utilizzate per la spettroscopia FTIR, ideale per l'analisi di materiali solidi e liquidi. La sua grande popolarità è dovuta al fatto che consente di analizzare i campioni così come sono, semplificando l'analisi di pressoché tutte le sostanze, in quanto non è necessaria alcuna preparazione o diluizione dei campioni per ottenere spettri utili. L'ATR è un metodo basato sulla riflessione interna e la lunghezza di cammino per un dato campione dipende dalla profondità a cui l'energia a infrarossi riesce a penetrare all'interno del campione. Al contrario di quanto avviene con la trasmissione (per cui la luce deve attraversare interamente il campione), la lunghezza del cammino di misura è indipendente dallo spessore del campione; questo vuol dire che un campione solido o liquido può avere uno spessore di 10 micron o di 10 cm e che, in qualunque caso, è possibile acquisire uno spettro FTIR utile. La tecnica dell'ATR prevede l'invio di energia luminosa attraverso un materiale ottico (il cristallo, ovvero, il sensore per ATR) che deve avere due caratteristiche principali:

1. deve essere otticamente trasparente alla frequenza dell'energia, in modo che il materiale del sensore non assorba la radiazione o ne assorba poca,
2. il materiale di cui è costituito il sensore per ATR deve avere un indice di rifrazione più elevato di quello del mezzo che lo circonda, così che il dispositivo per ATR agisca come una guida d'onda, riflettendo internamente l'energia luminosa (onda evanescente).

Qualsiasi sostanza a diretto contatto con il sensore (cristallo) viene investita (e analizzata) dall'energia. L'intensità dello spettro ottenuto mediante FTIR dipende fondamentalmente:

- dal numero di riflessioni,
- dalla profondità di penetrazione dell'onda evanescente nel campione,
- dal numero di molecole di interesse presenti nel campione,
- dalla rispettiva assorbività (capacità che ha una sostanza di assorbire una determinata radiazione).

I campioni sono stati analizzati in Riflettanza Totale Attenuata (ATR), depositandoli tal quali sopra un cristallo di selenuro di zinco (ZnSe). L'analisi di spettroscopia infrarossa FTIR è stata effettuata con una risoluzione spettrale di 4 cm^{-1} e 32 scansioni. Su ogni campione sono state effettuate tre acquisizioni. Nelle figure x e y vengono riportati gli spettri medi, rappresentativi per ogni campione.

Capitolo 4 Materiale e metodi

Tutti gli spettri sono stati pre-processati (normalizzati e corretti con la linea di base); lo spettro del background è stato ottenuto in corrispondenza del solo cristallo, con le stesse modalità di acquisizione.

Capitolo 5

Risultati e discussione

5.1 Fabbricazione di NP PLGA/PVA e PLGA/DSPE-PEG₂₀₀₀ ed effetto del guscio lipidico EGCG-C18 sulla dimensione delle particelle

La fabbricazione di nanoparticelle ibride PLGA ingegnerizzate con C18-EGCG come guscio lipidico antiossidante (L_{antiox}), è stata eseguita mediante il metodo ESE singolo in cui il polimero PLGA e le concentrazioni crescenti di C18-EGCG vengono disciolte in solvente organico e aggiunte a una fase acquosa contenente PVA (PNP) o DSPE-PEG₂₀₀₀ (DNP) come stabilizzante, allo scopo di formare un'emulsione olio-in-acqua; una volta che il solvente organico è evaporato, si formano le NP (Figura 20A-B). Tuttavia, questi due stabilizzatori interagiscono in modo diverso con il core PLGA e quindi l'interazione di L_{antiox} con intere NP potrebbe essere molto diversa. Il PVA è un polimero sintetico solubile in acqua e stabilizza la matrice PLGA formando uno strato relativamente compatto che circonda la superficie delle NP [52] (Figura 20A). Nei DNP, durante l'evaporazione del solvente, il DSPE-PEG₂₀₀₀ si auto-assembla attorno al nucleo PNP con le loro code idrofobiche attaccate al nucleo e le loro teste idrofile rivolte verso l'esterno nella faccia acquosa esterna con conseguente formazione di nanoparticelle ibride lipide-PLGA (LPHNPs) [53] (Figura 22B). Il lipide antiossidante è incorporato durante la formulazione delle nanoparticelle PLGA e come per il DSPE-PEG₂₀₀₀, si prevede che la catena di idrocarburi C18 si auto-assembli intorno al nucleo PNP tramite interazioni idrofobiche e che la parte idrofila dell'epigallocatechina-3-gallato si estenda verso la fase acquosa (Figura 20A-B).

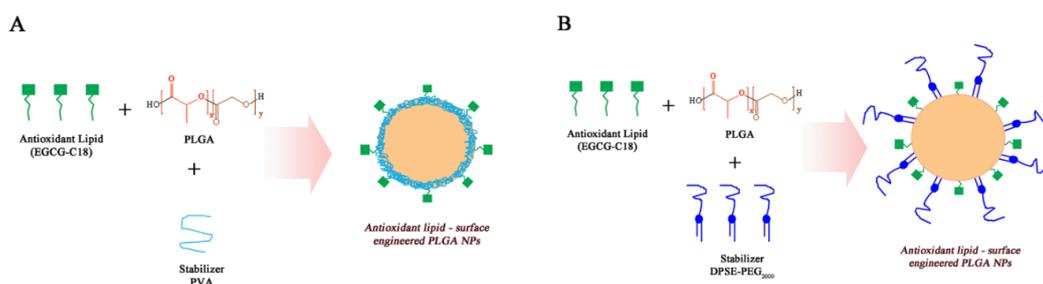


Figura 20: Diagramma schematico della preparazione di PNP (A) e DNP (B)

La composizione complessiva dei PLGA NP è mostrata nella Tabella 1. I PNP hanno mostrato una dimensione delle particelle di circa 190 *nm* mentre i DNP erano di circa 110 *nm* nel diametro idrodinamico (DH). Ciò concorda con lavori precedenti in cui è riportato che la presenza di DSPE-PEG₂₀₀₀ in PLGA porta alla formazione di NP più piccole rispetto alle particelle PLGA-PVA [54] [55].

Nanoparticelle (NPs)	rapporto $L_{\text{antiox}}:\text{PLGA}$ (w/w)	Diametro Idrodinamico (DH) (nm)	PDI	Z potential (mV)
PNP	-	190 ± 5	0.07 ± 0.02	-10 ± 2
PNP-L1	1:15	210 ± 4	0.06 ± 0.02	-12 ± 5
PNP-L2	1:5	252 ± 7	0.3 ± 0.1	-9 ± 4
PNP-L3	1:2	311 ± 18	0.08 ± 0.06	-10 ± 4
DNP	-	112 ± 6	0.06 ± 0.02	-20 ± 4
DNP-L1	1:15	111 ± 3	0.08 ± 0.03	-22 ± 8
DNP-L2	1:5	117 ± 3	0.09 ± 0.01	-29 ± 9
DNP _s -L3	1:2	140 ± 4	0.07 ± 0.02	-23 ± 4

Tabella 1. Composizione e proprietà delle NP PLGA/PVA (PNP) e NP PVA/P407-PLGA/DSPE-PEG₂₀₀₀ (DNP) studiate in presenza di C18-EGCG come lipide antiossidante (L_{antiox}).

L'introduzione del guscio di L_{antiox} attorno alle NP PLGA/PVA ha influenzato il diametro idrodinamico (DH) della dimensione delle particelle ed è stato osservato un aumento dose-dipendente raggiungendo, al più alto rapporto $L_{\text{antiox}}:\text{PLGA}$ (1:2, PNP-L3), un DH di 300 *nm* con pochi precipitati, visibili ad occhio nudo. Invece, il DH del DNP rimane pressoché costante e solo per il DNP-L3 è stato osservato un aumento di circa 30 *nm* nella dimensione delle particelle. La microscopia elettronica a scansione (SEM) eseguita su NP vuote e ingegnerizzate con C18-EGCG ha confermato le misurazioni DLS (Tabella 1) ed è stato osservato un progressivo aumento del diametro medio. Come mostrato in Figura 21, nel PNP-L3 c'erano la presenza di alcune NP con una dimensione delle particelle di circa 700-800 *nm* (Figura 21C)

Capitolo 5 Risultati e discussione

mentre una distribuzione dimensionale più uniforme è stata osservata per tutti i DNP ingegnerizzati con C18-EGCG (Figura 21D-E-F).

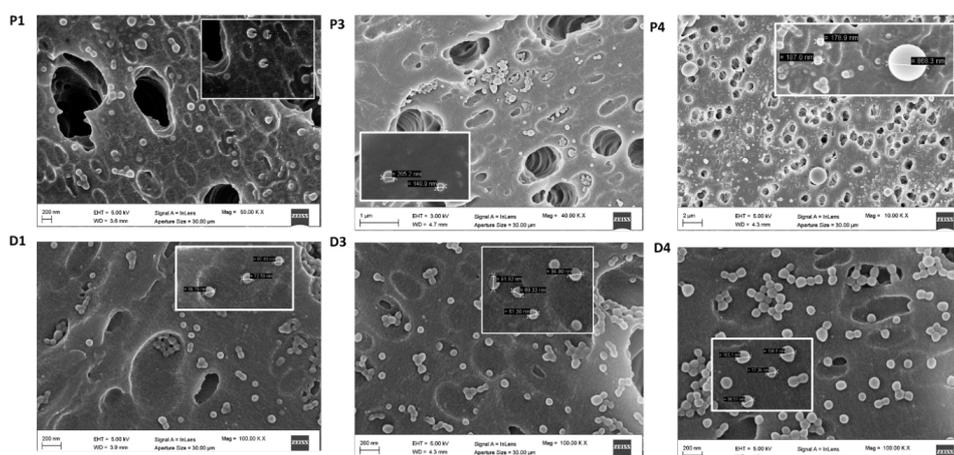


Figura 21: Immagini SEM di nanoparticelle PLGA prodotte in presenza di PVA e DSPE-PEG₂₀₀₀ come stabilizzatore. (A) PNP, (B) PNP-L2, (C) PNP-L3 e (D) DNP, (E) DNP-L2, (F) DNP-L3 sono stati analizzati dopo 24 ore di preparazione.

Per comprendere meglio il motivo delle differenze osservate nella dimensione delle particelle, sono state effettuate simulazioni MD per studiare sia i fenomeni di autoassemblaggio che di adsorbimento di C18-EGCG sulla superficie PLGA in presenza e in assenza di DSPE-PEG₂₀₀₀. I sistemi ottenuti dopo 200 *ns* di simulazioni MD sono stati verificati e studiati in dettaglio (Figura 24). Tutti i sistemi hanno mostrato una morfologia sferica simile, e questo risultato risulta in linea con l'evidenza SEM. È stata rilevata un'importante differenza nelle dimensioni poiché l'aggiunta di C18-EGCG sembrava aumentare la dimensione delle nanoparticelle e questo effetto dipendeva dalla concentrazione, raggiungendo le dimensioni più elevate nel PLGA: C18-EGCG nel rapporto 1: 2 w/w. D'altra parte, l'inclusione di DSPE-PEG₂₀₀₀ ha comportato un'evidente riduzione della dimensione delle NP. Sulla base di questi due fenomeni, il sistema con la più alta quantità di C18-EGCG incluso DSPE-PEG₂₀₀₀ ha mostrato le stesse dimensioni del sistema PLGA puro. Questa tendenza è stata la stessa rilevata con approccio sperimentale, denotando un affidabile autoassemblaggio di componenti per prevedere il comportamento delle NP risultanti.

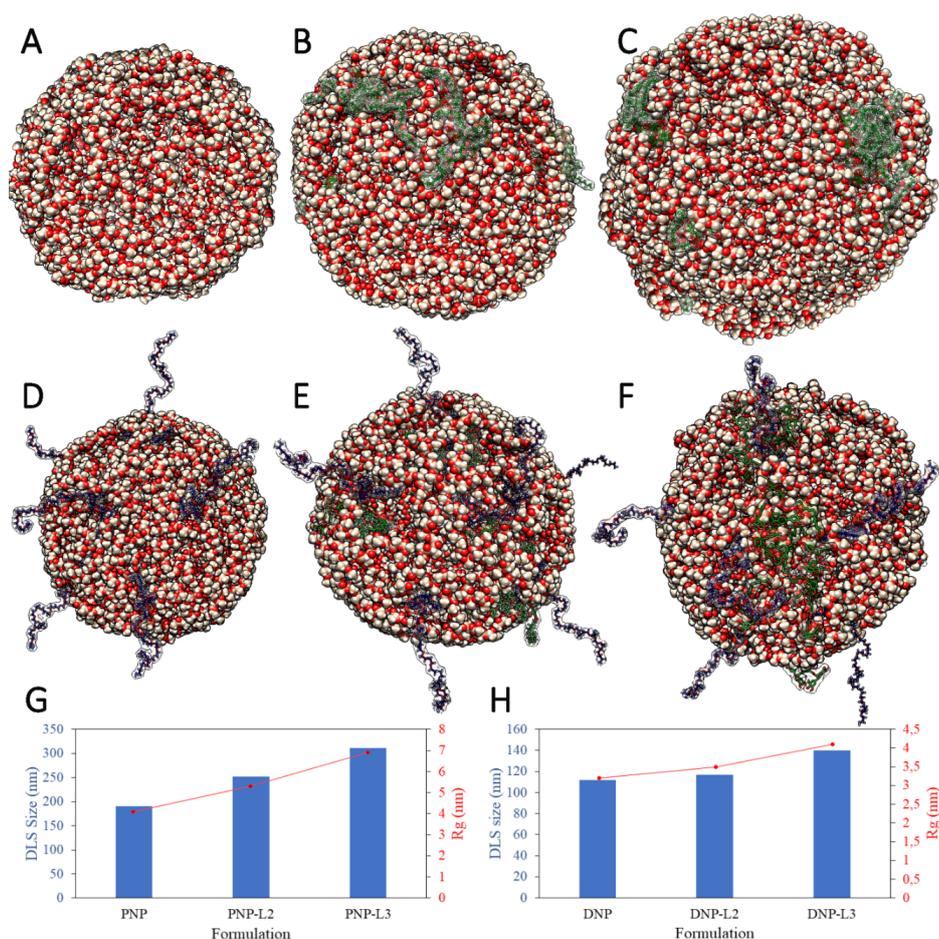


Figura 22: strutture rappresentative del PNP puro (A), PNP-L2 (B), PNP-L3 (C), DNP (D), DNP-L2 (E), DNP-L3 (F). Gli atomi di C, O e H di PLGA sono riportati in sfere marroni, rosse e bianche, mentre le molecole C18-EGCG e PEG sono evidenziate rispettivamente in verde e blu. Correlazione tra dimensione NP (da DLS) e Rg (da MD) per formulazioni basate su PNP (G) e DNP (H)

Le dimensioni delle particelle ottenute sperimentalmente sono state considerate in correlazione con il raggio di rotazione calcolato, che descrive come i componenti delle NP sono distribuiti attorno all'asse di rotazione lungo le traiettorie MD. Più in dettaglio, i valori di dimensioni elevate dei sistemi basati su PNP sono correlati a valori Rg elevati (Figura 22G), inoltre, questi valori riflettono comportamenti dissimili in funzione della presenza di C18-EGCG. Infatti, l'Rg più basso è stato rilevato per il PNP (4,9 nm), mentre è stato osservato un aumento per il PNP-L2 (5,3 nm). Infine, i valori di Rg sono nuovamente aumentati passando a 5,9 nm per i sistemi PNP-L3 (4,12 nm). D'altra parte, poiché i sistemi basati su DNP hanno mostrato dimensioni inferiori, anche i valori Rg diminuiscono (Figura 22H). Piccoli valori di Rg indicano che i DNP sono relativamente compatti e adottano una struttura piegata lungo tutta la loro traiettoria. Nonostante ciò, è stato nuovamente rilevato un effetto della concentrazione di C18-EGCG, con un aumento dei valori di Rg da 3,2 in assenza di

derivato catechinico, passando per 3,5 nm in DNP-L2 e raggiungendo 4,1 nm per DNP-L3. Anche in questo caso le variazioni delle dimensioni delle particelle si sono riflesse sui valori di Rg calcolati.

5.2 Interazione del guscio lipidico antiossidante C18-EGCG con PLGA

Al fine di osservare e comprendere quanto il lipide antiossidante C18-EGCG interagisce con i polimeri PLGA, è stata eseguita l'efficienza di incapsulamento, l'AFT-IR e l'analisi dell'interazione dalle simulazioni MD.

L'efficienza di incapsulamento (%EE) nelle NP è stata determinata dopo 24 ore di preparazione. Come mostrato nella Tabella 2, in tutti i tipi di NP, è stato riscontrato che l'EE% diminuisce dalla concentrazione di EGCG-C18 più bassa a quella più alta. Tuttavia, le formulazioni DNP-L2 e DNP-L3 hanno mostrato una maggiore capacità di trattenere il L_{antiox} e l'EE% è risultata superiore del 20% rispetto a PNP-L2 e PNP-L3, rispettivamente. Pertanto, il Drug Loading (DL), che si riferisce alla quantità totale di C18-EGCG interagito/intrappolato rispetto al peso totale delle NP, è molto più alto quando DSPE-PEG₂₀₀₀ è stato utilizzato come stabilizzante. Pertanto, l'energia libera di legame dell'interazione C18-EGCG/PLGA è stata calcolata utilizzando l'approccio standard Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA), che è un metodo di simulazione dell'energia libera efficiente e affidabile per modellare il riconoscimento molecolare. Monitorando i valori lungo l'intera traiettoria MD, PLP-L2 e PNP-L3 hanno mostrato rispettivamente -41,2 kcal/mol e -30,4 kcal/mol, evidenziando una diminuzione dell'energia di legame aumentando la quantità di C18-EGCG. È interessante notare che, anche se la tendenza era la stessa in presenza di DSPE-PEG₂₀₀₀, i valori di legame ΔG previsti per DNP-L2 e DNP-L3 erano rispettivamente di -56,3 kcal/mol e -44,2 kcal/mol. Ciò significa che l'uso di DSPE-PEG₂₀₀₀ aumenta le interazioni tra PLGA e C18-EGCG, e questo è in linea con l'aumento dell'EE% rilevato dal punto di vista sperimentale.

Nanoparticelle (NPs)	EE%	Lipid _{antiox} (mM)	$\Delta L\%$	ΔG di legame calcolata (Kcal/mol)
PNP	-	-	-	-
PNP-L1	98 ± 2	0.33 ± 0.02	7	-
PNP-L2	65 ± 5	0.64 ± 0.3	14	-41.2
PNP-L3	53 ± 3	1 ± 0.2	23	-30.4
DNP	-	-	-	-
DNP-L1	91 ± 2	0.3 ± 0.03	6.4	-
DNP-L2	86 ± 5	0.81 ± 0.02	17	-56.3
DNPs-L3	70 ± 4	1.64 ± 0.03	35	-44.2

Tabella 2. Proprietà dei PNP e DNP studiati in presenza di C18-EGCG come L_{antiox} .

In relazione alla superficie delle NP, le molecole C18-EGCG sono state identificate nelle regioni periferiche del polimero PLGA, evitando il nucleo delle NP (Figura 22). Più interessante, in assenza di DSPE-PEG₂₀₀₀, le molecole derivate dalla catechina sono rimaste vicine alla superficie polimerica, ma al di sotto di essa, contribuendo all'aumento delle dimensioni delle NP come già mostrato (Figura 23A). Al contrario, in presenza di DSPE-PEG₂₀₀₀, le molecole C18-EGCG sembravano depositarsi sopra la superficie del polimero esponendo parti del derivato della catechina al solvente (Figura 23B). Di conseguenza, i sistemi basati su DNP sono risultati più piccoli di quelli basati su PNP e C18-EGCG ha mostrato una maggiore capacità di interagire con il solvente quando viene utilizzato DSPE-PEG₂₀₀₀.

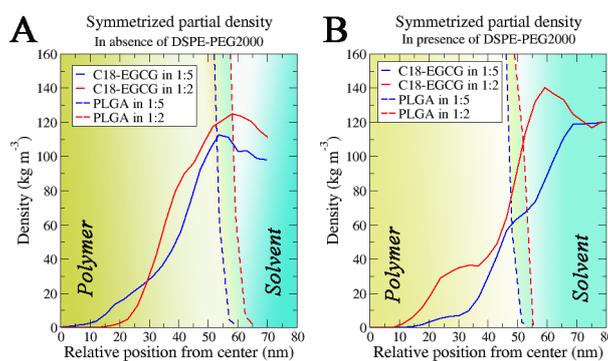


Figura 23: profili di densità di massa di PLGA e C18-EGCG in PNP (a) e DNP (b). Questi grafici riportano le distanze medie dal centro del PLGA, che sono state calcolate considerando gli assi x, y e z, poiché gli NP del PLGA sono piuttosto sferici.

Pertanto, per approfondire la capacità di DNP di incapsulare una maggiore quantità di C18-EGCG rispetto a PNP, è stato studiato il ruolo di DSPE-PEG₂₀₀₀ nell'interazione di C18-EGCG con la matrice PLGA. Quando incluse, le molecole lipidiche erano sempre posizionate orientando le loro parti stearoliche verso il nucleo PLGA, mentre le loro lunghe catene polari erano posizionate all'esterno del sistema polimerico (Figure 22D-E-F) massimizzando le interazioni con le molecole d'acqua. Ciò ha confermato la presenza di DSPE-PEG₂₀₀₀ sulla superficie del PLGA in uno spostamento orientato per ciascuna molecola lipidica. Un altro comportamento interessante è la mancanza di clusterizzazione e, a questo proposito, le molecole DSPE-PEG₂₀₀₀ sono apparse omogeneamente distribuite nelle parti periferiche del polimero, non mostrando interazioni tra loro, anche considerando l'elevata flessibilità delle catene polari. Da questi risultati si può dedurre che l'aumento del potenziale Z per le NP con DSPE-PEG₂₀₀₀ è proprio causato dal posizionamento delle molecole lipidiche rilevate nelle simulazioni MD (Figura 24A). In relazione alle molecole C18-EGCG, è stata rilevata un'elevata tendenza alla clusterizzazione in assenza di DSPE-PEG₂₀₀₀, d'altra parte, sono stati osservati spostamenti più ordinati quando il lipide era incluso. Questo fenomeno è dovuto ad una massimizzazione delle interazioni apolari tra le

catene alifatiche delle molecole C18-EGCG e quelle di DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figura 24B). Le interazioni dirette tra questi componenti sono state osservate anche monitorando le fluttuazioni quadratiche medie (RMSF) di C18-EGCG. Come riportato in Figura 24C, la parte della molecola tra gli atomi 57585 e 57615 è la frazione catechinica, la parte 57630-57650 è la parte dell'acido gallico e l'intero segmento finale è relativo alla catena C18. L'uso di DSPE-PEG₂₀₀₀ ha diminuito il grado di fluttuazione delle molecole C18-EGCG, inoltre, concentrandosi sui singoli componenti, è stata rilevata un'evidente perdita di fluttuazione per le catene C18 nei sistemi DNP-L2 e DNP-L3. Questo comportamento dipende dalla concentrazione ed è chiaramente dato dalle elevate interazioni apolari tra C18-EGCG e DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figura 24C-D).

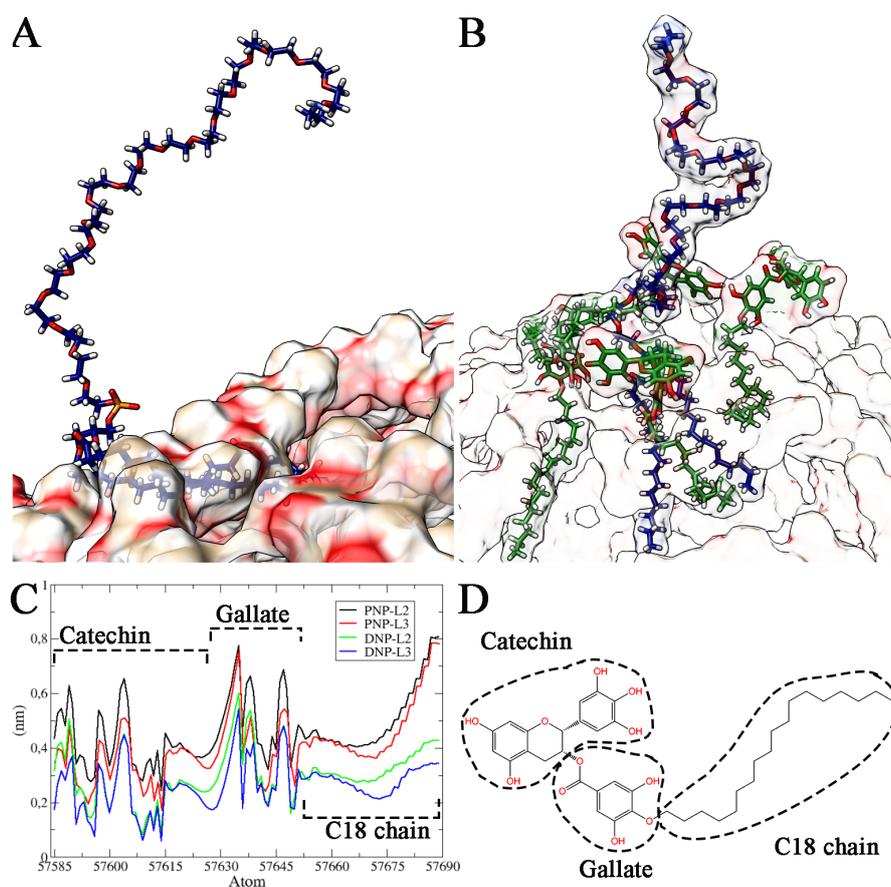


Figura 24: struttura rappresentativa di DSPE-PEG₂₀₀₀ che interagisce con il polimero PLGA (A) e rappresentazione delle molecole C18-EGCG che circondano DSPE-PEG₂₀₀₀ (B); in entrambe le immagini, lipidi, catechine e polimeri sono riportati rispettivamente in bastoncini blu, bastoncini verdi e superficie trasparente. Fluttuazioni quadratiche medie della radice media (C) e struttura 2D (D) di C18-EGCG

Inoltre, la spettroscopia AFT-IR è stata utilizzata per comprovare e dettagliare la caratterizzazione operata tramite le metodiche di simulazione di MD.

La figura 25 riporta gli spettri rappresentativi dei campioni PNP-L2 e PNP-L3,

confrontati con lo spettro rappresentativo di C18-EGCG e della sola matrice polimerica (PNP). Lo spettro del campione PNP-L1, corrispondente alla concentrazione più bassa della catechina, non viene riportato in quanto non significativo dal punto di vista spettrale.

Il trend spettrale dei campioni PNP-L2 e PNP-L3 è molto simile a quello del campione PNP, ad indicare il fatto che il C18-EGCG viene inglobato dalla matrice polimerica per la maggior parte della sua struttura, restando quindi in prossimità della superficie della NP come evidenziato dalle simulazioni MD. La regione compresa tra 1400 e 1800 cm^{-1} , però, mostra le bande caratteristiche della catechina (evidenziate in grassetto), con un'intensità che aumenta linearmente alla concentrazione del derivato. Di seguito viene riportato un elenco delle bande caratteristiche dell'epigallo, con le rispettive attribuzioni [56]:

- 1712 cm^{-1} : stretching del carbonile $C = O$;
- 1626 e 1604 cm^{-1} : stretching del legame $C = C$ dell'anello aromatico;
- 1518 cm^{-1} : stretching $C - C$ dell'anello aromatico;
- 1454 cm^{-1} : bending alifatico $C - H$;
- 1341 e 1239 cm^{-1} : bending del gruppo $O - H$;
- 962 e 841 cm^{-1} : vibrazioni $C - H$ (catena alchilica C18)

La zona compresa tra 2800 e 2950 cm^{-1} , inoltre, mostra le bande corrispondenti allo stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi CH_2 e CH_3 , della catena idrofobica del C18. Sulla base delle osservazioni fatte ed in base alla struttura molecolare del composto, possiamo supporre che, se presente a concentrazioni elevate, il C18-EGCG si distribuisce nella superficie delle NP, in particolare, in corrispondenza della catena alchilica, del gruppo carbonilico e dell'anello aromatico ad esso legato. Le bande sopra riportate risultano leggermente spostate rispetto le corrispondenti bande dello spettro dell'epigallo; tale andamento deriva da un'interazione chimica della catechina con i gruppi funzionali superficiali della matrice polimerica.

La figura 26 riporta gli spettri rappresentativi dei campioni DNP, DNP-L2 e DNP-L3, anch'essi confrontati con lo spettro rappresentativo C18-EGCG. Anche in questo caso, lo spettro del campione DNP-L1 non viene riportato, perché non significativo dal punto di vista spettrale.

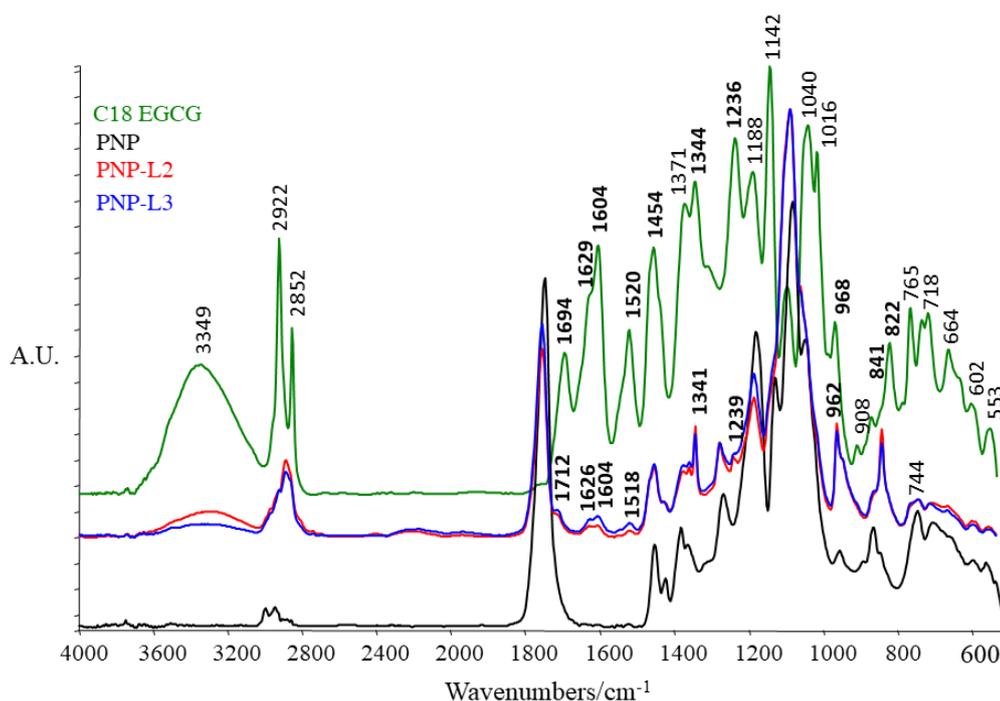


Figura 25: spettri IR dei sistemi PNP confrontati con C18-EGCG.

In questo caso, la correlazione tra gli spettri dei campioni DNP, DNP-L2 e DNP-L3 è piuttosto evidente, indicando il fatto che la porzione alifatica del C18-EGCG viene inglobata dalle NP polimeriche, e questo è ascrivibile alla presenza di DSPE-PEG₂₀₀₀. A differenza di quanto riportato per i campioni precedenti, infatti, le bande caratteristiche del derivato di catechina evidenziabili negli spettri dei campioni DNP-L2 e DNP-L3 sono soltanto quelle riferite all'anello aromatico, ovvero i segnali a 1630, 1602, 1517 e 1452 cm^{-1} , con uno shift di banda indicativo di un'interazione chimica della matrice polimerica con la catechina. Non si riportano evidenze delle bande caratteristiche della funzione carbonilica e della catena alchilica di C18-EGCG, poiché esse rimangono all'interno della matrice polimerica e grazie a forti interazioni apolari.

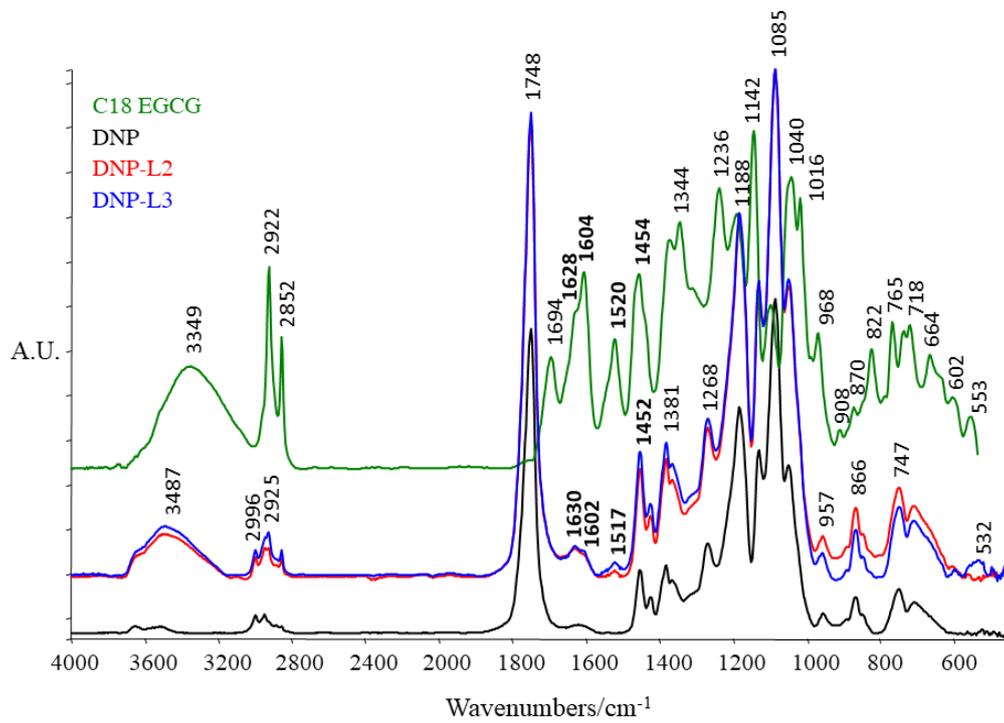


Figura 26: spettri IR dei sistemi DNP confrontati con C18-EGCG.

Conclusioni

Negli ultimi anni i nanocompositi polimerici biodegradabili e biorisorbibili si sono rivelati ottimi vettori per veicolare molecole con diverse caratteristiche. Questo tipo di tecnologia permette di diminuire la dispersione del principio attivo all'interno dell'organismo, e di aumentarne la quantità nel sito bersaglio, determinando quindi una maggiore efficacia del farmaco stesso.

Questo lavoro di tesi è stato incentrato sullo studio degli effetti che possono avere diverse concentrazioni di C18-EGCG su nanoparticelle di PLGA. Sono stati formulati sistemi utilizzando due diversi stabilizzanti, il PVA ed il DSPE-PEG₂₀₀₀, ed in tal modo è stato possibile studiare l'effetto che questi hanno sui nanosistemi e in particolar modo la capacità ed il modo che hanno di stabilizzarli. I sistemi studiati sono quindi formati da PLGA/PVA (PNP) e PLGA/DSPE-PEG₂₀₀₀ (DNP).

Nelle PNP si è osservato un aumento di dimensioni dipendente direttamente proporzionale all'aumento della concentrazione di C18-EGCG, raggiungendo quindi il massimo diametro idrodinamico nella formulazione con concentrazione più elevata di catechina. D'altra parte, nelle DNP, le dimensioni sono rimaste pressoché costanti, con un leggero aumento del diametro nel sistema a più alta concentrazione di principio attivo, ma certamente non in maniera proporzionale alla quantità di derivato inclusa. Analizzando il raggio di rotazione (R_g) ottenuto in simulazione, che descrive la distribuzione dei componenti delle nanoparticelle attorno all'asse di rotazione, si ottengono risultati in linea con le dimensioni osservate al DLS. Si è notato infatti come i valori R_g aumentano all'aumentare della concentrazione di C18-EGCG per le PNP, mentre rimangono costanti per le DNP.

Proseguendo con lo studio, l'analisi dell'efficienza di incapsulamento (%EE) ha evidenziato come quest'ultima, all'aumentare della concentrazione di C18-EGCG, diminuisca. Nonostante il trend, nelle DNP si ottiene una %EE maggiore del 20% rispetto alle PNP. Attraverso l'analisi dei profili di densità di massa, si deduce che nelle PNP le molecole di C18-EGCG tendono ad inserirsi al di sotto della superficie polimerica. Contrariamente nelle DNP, in cui le molecole di C18-EGCG espongono la catena alchilica al solvente, si verifica una esposizione della componente antiossidante sulla superficie del polimero. Questo risultato è stato confermato anche dall'analisi delle nanoparticelle attraverso spettroscopia infrarossa (IR). Analizzando le PNP, si può notare la mancanza delle bande caratteristiche della funzione carbonilica e della catena alchilica di C18-EGCG, in quanto inglobati all'interno della matrice polimerica. Ciò giustifica l'aumento di dimensioni dose-dipendente delle PNP e

la minore interazione con il solvente, portando quindi ad una minore efficienza di incapsulamento.

I risultati ottenuti evidenziano come gli stabilizzanti usati per la fabbricazione di nanoparticelle influenzino il sistema finale in maniera molto significativa. Nello specifico è stata riscontrata una miglior capacità antiossidante delle DNP, ovvero NP combinate all'utilizzo dello stabilizzante DSPE-PEG₂₀₀₀. Difatti, attraverso l'impiego di questo lipide, è stato possibile potenziare le interazioni tra nanosistema e C18-EGCG promuovendo disposizioni delle molecole che siano funzionali allo svolgimento delle attività antiossidanti. In conclusione, questo studio di tesi ha permesso una migliore comprensione delle potenzialità nell'utilizzo del DSPE-PEG₂₀₀₀ in ambiente biologico, e suggerisce linee guida da utilizzare per migliorare le capacità antiossidanti di formulazioni stabili.

Bibliografia

- [1] Vyacheslav Lyashenko Asaad MA. Babker, Svitlana Sotnik. Polymeric materials in medicine. *DOI: 10.21276/sjams.2018.6.1.33.*
- [2] Knowles JC Kim HW Perez RA, Won JE. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. advanced drug delivery reviews. *DOI: 10.1016/j.addr.2012.03.009.*
- [3] Liangji Tang Haiyong A Honglue Tan Tingting Tang Changsheng Liu Shengbing Yang, Jing Wang. Mesoporous bioactive glass doped-poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds with 3-dimensionally hierarchical pore networks for bone regeneration. colloids and surfaces b: Biointerfaces. *DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.052>.*
- [4] Y. Jung S.H. Kim. Resorbable polymers for medical applications. *DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857095602.1.91>.*
- [5] I. Major D. Devine M. Dalton, M. J. Forde. Bioresorbable polymers and their biomedical applications: Preface. *DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857095602.1.91>.*
- [6] A.S. Hoffman. Advanced drug delivery reviews.
- [7] Y. Jung S.H. Kim. *Biotextiles as Medical Implants*. McGraw-Hill.
- [8] Cato T. Laurencin Lakshmi S. Nair. Biodegradable polymers as biomaterials. *DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.*
- [9] D.F. Williams. The williams dictionary of biomaterials. *DOI: <https://doi.org/10.5949/UPO9781846314438>, 1999.*
- [10] European Society for Biomaterials D.F. Williams. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials.
- [11] Iso 10993-1, 2018 biological evaluation of medical devices - part 1: Evaluation and testing within a risk management process.
- [12] Use of international standard. iso 109931, biological evaluation of medical devices - part 1: Evaluation and testing within a risk management process - guidance for industry and food and drug administration staff, june 16, 2016. 2016.

Bibliografia

- [13] OV Salata. Applications of nanoparticles in biology and medicine. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>.
- [14] Whitesides G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt872>.
- [15] T.Andrew Taton. Nanostructures as tailored biological probes. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01973-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01973-X).
- [16] Sneha Singh Venkatesan Jayaprakash Abhimanyu Dev Pradip Jana, Mousumi Shyam. Biodegradable polymers in drug delivery and oral vaccination. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110155>.
- [17] Wenping Zhang Jin Sun Xiaoxue Meng Yimeng Qin Yihui Deng Zhonggui He Guixia Ling, Peng Zhang. Development of novel self-assembled ds-plga hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by p-gp inhibition. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.010>.
- [18] Deng C. Klok H. A. Zhong Z. Cheng R., Meng F. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.084>.
- [19] Skirtach A. G. Delcea M., Möhwald H. Stimuli-responsive lbl capsules and nanoshells for drug delivery. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.010>.
- [20] Genzer J. Müller M. Ober C. Stamm M. Sukhorukov G. B. Szleifer I. Tsukruk V. V. Urban M. Winnik F. Zauscher S. Luzinov I. Minko S. Stuart M. A., Huck W. T. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmat2614>.
- [21] Rubén Morawicki Delmy Diaz Gonzalez. Lactic fermentation of grain sorghum: effect of variety and pretreatment on the production of lactic acid and biomass. DOI: [10.1007/s13197-021-05132-2](https://doi.org/10.1007/s13197-021-05132-2).
- [22] Ashok Pandey Rojan P. John, K. Madhavan Nampoothiri. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. DOI: [10.1007/s00253-006-0779-6](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6).
- [23] Seppo Salminen Atte von Wright Sampo Lahtinen, Arthur C. Ouwehand. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, volume DOI: <https://doi.org/10.1201/b11503>.
- [24] Raju Adhikari Pathiraja Gunatillake, Roshan Mayadunne. Recent developments in biodegradable synthetic polymers. DOI: [10.1016/S1387-2656\(06\)12009-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(06)12009-8).
- [25] Colwell J. M. Gauthier E. Halley P. Bottle S. George G. Laycock B., Nikolic M. Lifetime prediction of biodegradable polymers. DOI: [10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004).

Bibliografia

- [26] Greim H. Summer K. H., Klein D. Toxicological evaluation of the incorporation of polymers and copolymers based on l- and d-lactide and glycolide.
- [27] Anna Finne-Wistrand Daniela Pappalardo, Torbjorn Mathisen. Biocompatibility of resorbable polymers: A historical perspective and framework for the future. DOI: [10.1021/acs.biomac.9b00159](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00159).
- [28] K. A. Athanasiou C. M. Agrawal. Technique to control pH in vicinity of biodegrading pla-pga implants. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-4636\(199722\)38:2<105::aid-jbm4>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199722)38:2<105::aid-jbm4>3.0.co;2-u).
- [29] Clayton J. E Hockaday T. D., Frederick E. W. Studies on primary hyperoxaluria ii. urinary oxalate, glycolate, glyoxylate measurement by isotope dilution methods. PMID: [14279147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14279147/).
- [30] C. D. Casarett Doull's Klaassen. Toxicology: The basic science of poisons.
- [31] D. L. J. Rothschild. The food chemical news guide to the current status of food and color additives.
- [32] The Forty-First meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants.
- [33] R.M. Guedes A.T. Marques A.C. Vieira, J.C. Vieira. Experimental degradation characterization of pla-pcl, pga-pcl, pdo and pga fibres.
- [34] Tipton AJ Middleton JC. Synthetic biodegradable polymers as medical devices.
- [35] Matthew S. Shive James M. Anderson. Biodegradation and biocompatibility of pla and plga microspheres. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>.
- [36] E. M. Topp M. L. Houchin. Physical properties of plga films during polymer degradation. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.30813>.
- [37] Kayla Metzger Karen I. Winey Kathryn Werner Nily Dan Steven J. Siegel, Jonathan B. Kahn. Effect of drug type on the degradation rate of plga matrices. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.009>.
- [38] Joshua J. Reineke Abdul Khader Mohammad. Quantitative detection of plga nanoparticle degradation in tissues following intravenous administration. DOI: <https://doi.org/10.1021/mp300559v>.
- [39] Steven J. Siegel Hirenkumar K. Makadia. Poly lactic-co-glycolic acid (plga) as biodegradable controlled drug delivery carrier. DOI: [10.3390/polym3031377](https://doi.org/10.3390/polym3031377).
- [40] Adolfo Amici Luca Massaccesi Giovanna Mobbili Emiliano Laudadio, Cristina Minnelli and Roberta Galeazzi. Liposomal formulations for an efficient

Bibliografia

- encapsulation of epigallocatechin-3-gallate: An in-silico/experimental approach. DOI: [10.3390/molecules23020441](https://doi.org/10.3390/molecules23020441).
- [41] Emiliano Laudadio Adolfo Amici Dario Rusciano Tatiana Armeni Mattia Cantarini Pierluigi Stipa Cristina Minnelli, Roberta Galeazzi and Giovanna Mobbili. Monoalkylated epigallocatechin-3-gallate (c18-egcg) as novel lipophilic egcg derivative: Characterization and antioxidant evaluation. DOI: [10.3390/antiox9030208](https://doi.org/10.3390/antiox9030208).
- [42] Azadeh Haeri Masoud Faghieh Akhlaghi Marjan Daeihamed, Simin Dadashzadeh. Potential of liposomes for enhancement of oral drug absorption. DOI: [10.2174/1567201813666160115125756](https://doi.org/10.2174/1567201813666160115125756).
- [43] Valcic S. Timmermann B. Alberts D. S. Dvorakova K., Dorr R. T. Pharmacokinetics of the green tea derivative, egcg, by the topical route of administration in mouse and human skin. DOI: [10.3390/antiox9030208](https://doi.org/10.3390/antiox9030208).
- [44] DOI: [10.1166/jbn.2018.2460](https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2460). *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 1 gennaio 2018.
- [45] I. Eisenberger F. von der Kammer A. Praetorius M. Miernicki, T. Hofmann. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions nat. nanotechnol. DOI: [10.1038/s41565-019-0396-z](https://doi.org/10.1038/s41565-019-0396-z).
- [46] Joy D. C. Michael J. Goldstein J. Scott J. H. Ritchie N. W. M., Newbury D., editor. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer.
- [47] Moccia S. Picariello G. Russo G. L. Sorrentino G. Di Stasio M. La Cara F. Volpe M. G. Siano, F. Comparative study of chemical, biochemical characteristic and atr-ftir analysis of seeds, oil and flour of the edible fedora cultivar hemp (*cannabis sativa l.*). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24010083>.
- [48] DiNola A. Haak J. R Berendsen H. J. C., Postma J. P. M. Molecular dynamics with coupling to an external bath. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- [49] Parrinello M. Bussi G., Donadio D. Canonical sampling through velocity rescaling. DOI: [10.1063/1.2408420](https://doi.org/10.1063/1.2408420).
- [50] Nosè S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. DOI: <https://doi.org/10.1080/00268978400101201>.
- [51] Klein M. L. Nosè S. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. DOI: <https://doi.org/10.1080/00268978300102851>.
- [52] Edna Vargas-Reyes Jorge Herrera-Ordóñez Silvia Torres-Rincón René D. Peralta-Rodríguez Jorge C. Ramirez, Sergio E. Flores-Villaseñor. Preparation of pdlla and plga nanoparticles stabilized with pva and a pva-sds

Bibliografia

- mixture: Studies on particle size, degradation and drug release. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101907>.
- [53] Brian T. Luk Zhiqing Pang Che-Ming J. Hu Ashley V. Kroll Chun Lai Yu Weiwei Gaoab Liangfang Zhang Diana Dehaini, Ronnie H. Fang. Ultra-small lipid–polymer hybrid nanoparticles for tumor-penetrating drug delivery. DOI: doi.org/10.1039/C6NR04091H.
- [54] Akihiko Ishida Hirofumi Tani Manabu Tokeshi Yi Bao, Masatoshi Maeki. Preparation of size-tunable sub-200 nm plga-based nanoparticles with a wide size range using a microfluidic platform. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0271050.g002.
- [55] Nicolas Tsapis Sandrine Geiger Véronique Rosilio Ghozlene Mekhloufi David Chapron Baptiste Robin Mohamed Beladjine Valérie Nicolas Elias Fattal Claire Albert, Nicolas Huang and Florence Agnely. Bare and sterically stabilized plga nanoparticles for the stabilization of pickering emulsions. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02558>.
- [56] Deep Pooja Sagarika Gudem Suresh Bhargava Ravi Shukla Ramakrishna Sistla Rasika Radhakrishnan, Hitesh Kulhari. Encapsulation of biophenolic phytochemical egcg within lipid nanoparticles enhances its stability and cytotoxicity against cancer. DOI: [10.1016/j.chemphyslip.2016.05.006](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.006).