Titolo: Nanocompositi biodegradabili a base di polisaccaridi e nanoargille: preparazione, caratterizzazione e studio delle proprietà di rilascio.

Candidato: Emanuele Grifoni

Relatore: Prof. Piero Baglioni [piero.baglioni@unifi.it]

Correlatore: Dott.ssa Francesca Ridi [ridi@csgi.unifi.it]

Considerato che l'alluminio è stato uno dei primi adiuvanti immunologici nonché uno dei più diffusi ancora ai giorni d'oggi, con il nostro lavoro di tesi abbiamo pensato di sfruttare la presenza naturale del metallo all'interno della composizione chimica degli HNT (Halloysite Nanotubes) per la preparazione di una nanocomposito in grado di stimolare il sistema immunitario e di aumentarne la risposta ad un vaccino. Inoltre la cavità interna naturale di dimensioni dell'ordine del nanometro comporta interessanti proprietà dovute all'inerzia di diffusione da e per l'interno del nanotubo. Questa caratteristica permetterebbe al sistema di trasportare e rilasciare nel tempo farmaci o altre molecole di interesse biologico.

Per ottimizzare il nostro sistema e per avere un maggior controllo sul rilascio della sostanza trattenuta, nonché per avere una migliore biocompatibilità, abbiamo posto un'ulteriore barriera intorno al nanotubo costituita da un gel polisaccaridico interagente con la superficie dell'alloisite. In particolare sono stati scelti due polisaccaridi quali acido ialuronico e chitosano. La scelta è stata fatta sia per le loro caratteristiche acido-base opposte (il primo si carica negativamente deprotonandosi e l'altro positivamente protonandosi) sia per il loro già vasto impiego nella preparazione di sistemi biocompatibili.

In particolare l'acido ialuronico è un componente fondamentale per la maturazione delle cellule dendritiche e responsabile della regolazione di numerosi processi infiammatori. Inoltre enzimi litici rilasciati da cellule tumorali sarebbero in grado di degradare il polisaccaride e permettere un rilascio repentino del farmaco solo in presenza del bersaglio garantendone una dispersione nell'organismo minima. In questo modo la funzionalizzazione avrebbe un ruolo di controllo e modulazione del rilascio e allo stesso tempo garantirebbe un supporto a sviluppo e maturazione delle cellule del nostro sistema immunitario.

Allo scopo di valutare le proprietà di delivery dei compositi preparati, le alloisiti sono state caricate con molecole tipicamente utilizzate in letteratura come sistemi modello di farmaci. Per quanto riguarda le sonde fluorescenti impiegate abbiamo usato carbossifluoresceina e rodamina 110 in quanto hanno struttura analoga, ma carica opposta. Eseguendo spettri di fluorescenza prima e dopo il loading si è potuto osservare che i nanotubi inorganici sono in grado di adsorbire dalla soluzione alte percentuali delle due sonde.

Per la funzionalizzazione con chitosano abbiamo riscontrato una buona affinità dovuta ad un'interazione di tipo elettrostatico, mentre per l'acido ialuronico siamo dovuti ricorrere ad una funzionalizzazione di tipo covalente. Inizialmente abbiamo fatto reagire le alloisiti con APTMS ((3-aminopropyl)-trimethoxysilane) sfruttando la reattività dei silani per la superficie silicatica dei nanotubi e in seguito abbiamo provveduto alla formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossile dell'acido ialuronico e l'ammina primaria dell'APTMS per mezzo di una carbodiimide. Non soddisfatti della resa finale, abbiamo effettuato una sintesi alternativa che prevedeva l'impiego di GPTS (glycidoxypropyl-trimethoxysilane). Con questo approccio la resa è risultata incrementata del 100% rispetto a quella precedente, grazie alla presenza dell'anello epossidico, moltopiù reattivo dell'ammina. Il problema dell'eccessiva reattività dell'epossido in soluzioni acquose è stato contenuto svolgendo l'intera reazione in toluene e successivamente in una miscela 2:1 di etanolo-acqua.

Per quanto riguarda le proprietà di rilascio si osserva come sia la percentuale finale di sonda rilasciata sia la velocità con cui viene raggiunto il plateau siano condizionate dalla presenza del polisaccaride. Per il primo dato riscontriamo un'inibizione più o meno marcata del valore massimo rilasciato dal nostro sistema dove presente il polisaccaride. Nel caso dei compositi con acido ialuronico si è osservato che questo polisaccaride non modifica in modo significativo la velocità del rilascio delle sonde, mentre il chitosano induce un rallentamento importante nel rilascio della rodamina 110, mentre inibisce completamente il rilascio della carbossifluoresceina.