

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**Idrotalciti Zn/Al intercalate con molecole
biologicamente attive per il trattamento
combinato di neoplasie**

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Cecilia Martini

RELATORE

Dott.ssa Mariafrancesca Fochi

CORRELATORI

Dott.ssa Greta Varchi

Dott.ssa Claudia Ferroni

Sessione II

Anno Accademico 2016-2017

ABSTRACT

Hydrotalcites (HTlc), also known as anionic clays or layered double hydroxides, represent the only example of lamellar solid with positively charged layers and exchangeable interlayer anions. The present study focuses on the synthesis and characterization of Zn/Al HTlc with formula $[Zn_{0,72}Al_{0,28}(OH)_2] Br_{0,72} \cdot 0,69H_2O$, as excellent materials for designing drug delivery systems due to their biocompatibility, pH-dependent stability and low toxicity. In this regard, in the present work I synthesize and intercalate two different molecules, e.g. norcantharidin (NCTD), an anticancer drug proved for inducing cell cycle arrest at G2/M phase and a phthalocyanine that, upon irradiation with specific activating wavelengths, generates cytotoxic species such as 1O_2 and ROS, inducing cell death (Photodynamic therapy, PDT). The results obtained so far, clearly demonstrate that the two selected compounds are efficiently intercalated within HTlc layers. Moreover, in vitro preliminary studies on a panel of cancer cells lines accounted for a greater cytotoxicity of the two drugs once loaded on HTlc either when administrated singularly or in combination.

Le idrotalciti (HTlc), note anche come argille anioniche o idrossidi doppi lamellari, sono costituite da strati carichi positivamente con intercalati anioni di varia natura. Questo lavoro di tesi ha riguardato la sintesi e caratterizzazione di HTlc nanometriche con formula $[Zn_{0,72}Al_{0,28}(OH)_2] Br_{0,28} \cdot 0,69H_2O$. Grazie allo loro biocompatibilità, stabilità e bassa tossicità, tali composti risultano particolarmente adatti alla veicolazione di farmaci. Pertanto, ho messo a punto la sintesi e intercalazione all'interno delle HTlc di due diverse sostanze: la norcantaridina (NCTD), una molecola organica antitumorale in grado di bloccare il ciclo cellulare in fase G2/M e la ftalocianina tetrasulfonata (ftl), una molecola fotosensibile anionica che illuminata a una specifica lunghezza d'onda, sviluppa sostanze citotossiche, quali specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e ossigeno di singoletto (1O_2), in grado di uccidere le cellule malate. Questi nanocompositi, inoltre, sono stati caratterizzati in termini di capacità di loading e di rilascio nel tempo. Inoltre, sono stati effettuati test in vitro per valutare l'efficacia di questi composti su un panel di linee cellulari tumorali, ed è stato dimostrato che i farmaci caricati sulle HTlc sono più citotossici rispetto alle molecole libere, sia quando somministrati singolarmente che in combinazione.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. Introduzione | 1 |
| 1.1. Nanomedicina | 1 |
| 1.2. Nanoparticelle: le idrotalciti | 2 |
| 1.3. Trattamento combinato dei tumori | 7 |
| 1.4. La norcantaridina | 8 |
| 1.5. La terapia fotodinamica – PDT | 9 |
| 2. Scopo del lavoro | 14 |
| 3. Discussione dei risultati | 15 |
| 3.1. Sintesi delle idrotalciti (HTlc) Zn/Al con la tecnica della doppia microemulsione | 15 |
| 3.2. Idrotalciti con norcantaridina (HTlc@NCTD) | 17 |
| 3.2.1. Sintesi e caratterizzazione | 17 |
| 3.2.2. Studio dei rilasci | 21 |
| 3.3. Idrotalciti con ftalocianina (HTlc@ftl) | 23 |
| 3.3.1. Sintesi e caratterizzazione | 23 |
| 3.3.2. Studio dei rilasci | 25 |
| 3.3.3. Sviluppo di specie reattive all'ossigeno (ROS) | 29 |
| 3.3.4. Sviluppo di ossigeno di singoletto (1O_2) | 30 |
| 3.4. Analisi della citotossicità in vitro | 32 |
| 3.5. Idrotalciti con alluminio ftalocianina (HTlc@ftl-Al) | 35 |
| 3.5.1. Sintesi e caratterizzazione | 35 |
| 3.5.2. Studio dei rilasci | 36 |
| 3.5.3. Sviluppo di specie reattive all'ossigeno (ROS) | 38 |
| 3.5.4. Sviluppo di ossigeno di singoletto (1O_2) | 39 |
| 4. Conclusioni e sviluppi futuri | 40 |
| 5. Parte sperimentale | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1. Idrotalciti (HTlc) Zn/Al | 42 |
| <i>5.1.1. Sintesi</i> | 42 |
| <i>5.1.2. Caratterizzazione</i> | 43 |
| 5.2. Idrotalciti con norcantaridina (HTlc@NCTD) | 44 |
| <i>5.2.1. Sintesi</i> | 44 |
| <i>5.2.2. Caratterizzazione</i> | 45 |
| <i>5.2.3. Rilasci</i> | 45 |
| 5.3. Idrotalciti con ftalocianina (HTlc@ftl) | 47 |
| <i>5.3.1. Sintesi</i> | 47 |
| <i>5.3.2. Caratterizzazione</i> | 48 |
| <i>5.3.3. Rilasci</i> | 48 |
| <i>5.3.4. Specie reattive all'ossigeno (ROS)</i> | 49 |
| <i>5.3.5. Ossigeno di singoletto (¹O₂)</i> | 49 |
| 5.4. Valutazione dell'effetto citotossico in vitro | 50 |
| Riferimenti bibliografici | 53 |
| <i>RINGRAZIAMENTI</i> | 59 |

1. Introduzione

1.1 Nanomedicina

Negli ultimi anni si è assistito a un crescente interesse per la “nanoscienza” ed in particolare per la nanotecnologia, la quale ha portato allo sviluppo di nuovi materiali funzionali di dimensioni nanometriche che trovano applicazione in numerosi settori: dalla medicina, alla fisica, alla chimica, all’elettronica ecc. Infatti, la materia strutturata in forma nanometrica presenta peculiarità uniche in termini di conduttività elettrica, resistenza meccanica e alla corrosione, conducibilità termica, proprietà isolanti ecc.^[1] Tali caratteristiche sono legate al fatto che i nanomateriali presentano un’elevata area superficiale attiva che contribuisce ad amplificare le loro proprietà chimico-fisiche.^[2] In particolare, la crescente rilevanza dei nanomateriali in ambito medico-biologico, ha indotto nel 2000 il *National Institute of Health* (NIH, USA) a coniare il termine “*nanomedicina*”.^[3]

La nanomedicina si basa su tre fasi principali: il trasporto del farmaco, il targeting mirato nei confronti di uno specifico tessuto e il rilascio controllato del farmaco stesso. Prima degli anni ’50 la somministrazione della maggior parte dei farmaci antitumorali avveniva per via orale tramite pillole o capsule; tuttavia, tale sistema di trasporto (drug delivery) risulta spesso inefficace sia perché il farmaco, una volta raggiunto l’ambiente gastrico, viene spesso metabolizzato in componenti inattivi, sia perché trattandosi di un metodo completamente aspecifico, riduce l’efficacia generale del trattamento, inducendo eventualmente l’insorgenza di gravi effetti collaterali.

Un cambiamento paradigmatico nella somministrazione dei farmaci si è verificato con l’introduzione di nuove formulazioni in cui le proprietà delle capsule polimeriche sono state modificate per meglio controllare il rilascio di farmaci. Combinando lo spessore e la composizione della capsula sono stati ottenuti diversi profili di rilascio, che hanno consentito un notevole miglioramento della salute e del benessere. Relativamente alla nanomedicina, si possono distinguere tre generazioni evolutive: la prima, intorno agli inizi del 1950, ha permesso il superamento delle barriere fisico-chimiche, migliorando la scarsa solubilità in acqua dei farmaci e riducendo la diffusione passiva; la seconda ha riguardato il superamento delle barriere biologiche, che complicano la consegna di farmaci a causa della rapida eliminazione dal flusso sanguigno (superamento grazie all’effetto EPR - enhanced permeation and retention); la terza sfrutta le prime due per implementare sistemi

di trasporto più efficaci agendo su diversi parametri quali il controllo delle dimensioni e della forma delle nanoparticelle, l'uso di antenne per il targeting attivo e di stimoli esterni per il controllo mirato del rilascio del farmaco (**Figura 1**).^[4]

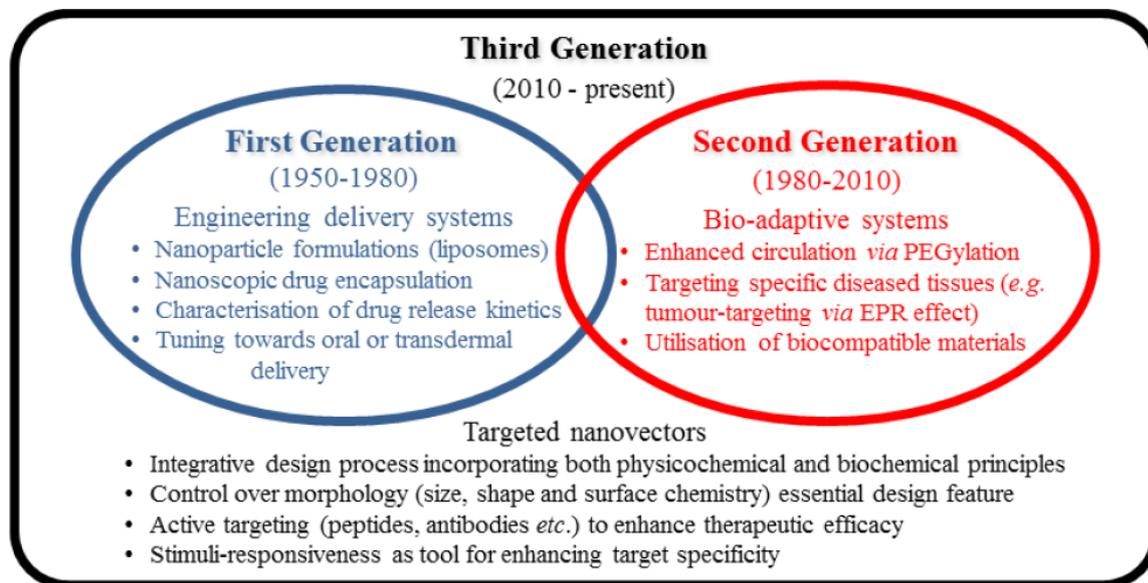


Figura 1. Diagramma che rappresenta lo sviluppo storico della nanomedicina.

1.2 Nanoparticelle: le idrotalciti

Il drug delivery mediato da nanoparticelle costituisce un approccio terapeutico particolarmente promettente nel *settore oncologico*. In particolare, considerata la generale elevata tossicità dei farmaci antitumorali, l'uso di nanoparticelle per il loro trasporto risulta particolarmente promettente per diversi motivi: i) il controllo della farmacocinetica; ii) la separazione della farmacocinetica (a carico della nanoparticella) dall'attività terapeutica (a carico del farmaco rilasciato); iii) la capacità di carico utile; iv) gli effetti di affinità multiple; v) la combinazione di effetti terapeutici.^[5] Fra i vari materiali impiegati per la preparazione di nanoparticelle, le idrotalciti (HTlc), conosciute anche come argille anioniche o idrossidi doppi lamellari, sono risultate particolarmente adatte per la preparazione di nano-oggetti per il trasporto di farmaci, grazie alle loro caratteristiche di biocompatibilità, bassa tossicità, versatilità, basso costo e capacità di intercalare una grande quantità di biomolecole anioniche.^[6,7]

Il termine idrotalcite deriva dal fatto che i primi studi sulla loro struttura furono condotti su un idrossicarbonato di magnesio e alluminio avente formula $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ ^[8,9] e di struttura simile alla brucite, la quale consiste in una pila

di strati tenuti insieme da legami idrogeno e caratterizzata da una carica positiva dovuta alla parziale sostituzione di cationi bivalenti con cationi trivalenti.^[10] Nel caso in cui uno ione Mg^{2+} venga sostituito da uno ione trivalente di raggio simile, come lo ione Al^{3+} , si genera una carica positiva sul foglio idrossilico.^[11] La carica positiva dei piani è compensata da anioni scambiabili disposti tra gli strati che determinano la distanza interstrato e che legano gli strati adiacenti attraverso legami ionici. Le lamelle sono costituite dalla concatenazione di ottaedri i cui centri sono occupati da cationi metallici e i vertici da ioni idrossido. Ogni gruppo OH è coordinato da tre cationi e l'idrogeno è diretto verso la regione interstrato. Questi strati possono essere impilati uno sull'altro attraverso due differenti simmetrie, romboedrica o esagonale (**Figura 2**).^[12]

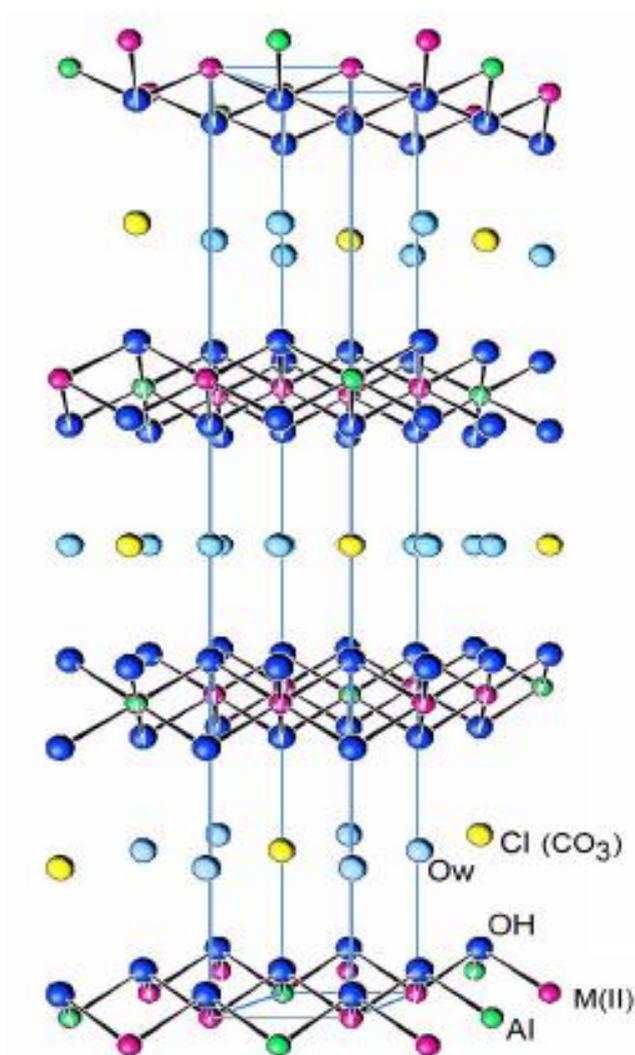
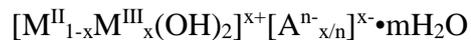


Figura 2. Lamella e struttura di una idrotalcite M^{II} -Al in forma cloruro o carbonato.

La formula generale che descrive questi nanocompositi innovativi indica che è possibile sintetizzare un largo numero di composti con stechiometria differente:



dove M^{II} è un catione bivalente come Mg, Zn, Cu, Mn, Co; M^{III} è un catione trivalente come Al, Cr, Fe, Ga; A^{n-} è un anione organico, inorganico o metallo-organico di carica n ; m indica il rapporto mol/mol di acqua intercalata e x indica il rapporto molare, espresso come $M^{III}/(M^{III}+M^{II})$ e compreso tra 0,2 - 0,4, il quale determina la densità di carica dello strato positivo e la capacità di scambiare l'anione.^[13]

Per elementi naturali il valore di x è generalmente uguale a 0,25 e l'anione carbonato è quello più comune.^[11] La natura degli anioni che interagiscono con la carica positiva degli strati lamellari può essere differente (organici, inorganici o metallorganici) e senza limitazioni; un possibile limite nella preparazione di idrotalciti con anioni diversi dal carbonato è rappresentato dalla contaminazione da anidride carbonica presente nella soluzione acquosa di partenza.

In letteratura sono descritti diversi metodi per la preparazione delle idrotalciti.^[14] In particolare, quelli di seguito elencati sono fra i più diffusi ed efficaci:

- co-precipitazione degli ioni metallici a pH costante usando una soluzione tampone di $NaHCO_3/Na_2CO_3$ o trattando gli ioni metallici con una soluzione di NaOH a pH variabile;
- precipitazione dalla soluzione omogenea usando urea o esa-metilen-tetrammina che dopo idrolisi, genera ammoniacca;
- tecnica sol-gel dove M^{II} e M^{III} sono alcossidi o acetilacetonati idrolizzati a una data temperatura.

Tuttavia, tali metodologie producono un numero relativamente piccolo di nuclei e larghe dimensioni dei cristalliti, pertanto non consentono un controllo preciso delle dimensioni delle nanoparticelle di HTlc e della loro distribuzione.

Recentemente, è stato messo a punto un nuovo metodo, detto metodo della doppia microemulsione, capace di controllare le dimensioni delle HTlc e di ridurle a livelli nanometrici.^[15]

Una microemulsione è definita come un sistema acqua-olio-tensioattivo, otticamente isotropico e termodinamicamente stabile. Si possono distinguere due tipi di microemulsioni:

- Olio in acqua (O/A o O/W): l'olio rappresenta la fase dispersa o discontinua e l'acqua la fase disperdente;
- Acqua in olio (A/O o W/O): trasparente, liquido isotropico che contiene piccole goccioline di acqua disperse nella fase continua di olio (**Figura 3**).^[16]

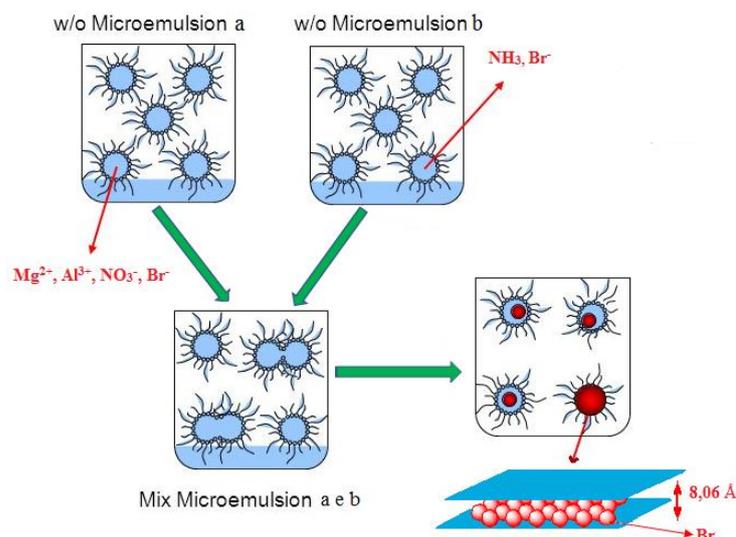


Figura 3. Passaggi coinvolti nella tecnica della microemulsione utilizzata per la sintesi delle HTlc.

Per la sintesi di idrotalciti nanometriche vengono impiegate due microemulsioni inverse w/o. In una microemulsione inversa le molecole di tensioattivo nella miscela acqua-olio si dispongono all'interfase, orientando il gruppo di testa polare verso la fase acquosa e la coda idrocarburica verso quella oleosa, abbassando così la tensione interfacciale presente tra i due liquidi. La fase dispersa nella microemulsione è presente quindi sotto forma di piccolissime goccioline (50-1000 Å) che possono essere pertanto considerate dei nanoreattori utilizzabili per condurre reazioni chimiche e in particolare per sintetizzare nanomateriali inorganici, conferendo loro dimensioni ben definite.

Quando la dimensione del precipitato si avvicina a quella della micro goccia di acqua, le interazioni tra la superficie della particella e i gruppi di testa idrofili del tensioattivo possono fermare la crescita della nanoparticella.

La natura del tensioattivo e le condizioni sperimentali utilizzate sono tra i principali fattori che influenzano la tipologia di questi sistemi organizzati, andando così a modulare le proprietà dei materiali in essi preparati, in particolare le loro dimensioni.

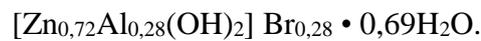
Nelle microemulsioni, la dimensione delle goccioline è influenzata da due importanti parametri, quali: i) il rapporto molare acqua-tensioattivo, R_w :

$$R_w = \frac{n(H_2O)}{n(\text{tensioattivo})}$$

aumentando il contenuto di acqua aumenta il diametro medio delle goccioline e ii) il rapporto molare olio-acqua R_o :

$$R_o = \frac{n(\text{fase oleosa})}{n(H_2O)}$$

Durante il periodo di tirocinio mi sono focalizzata sulla sintesi, attraverso il metodo della microemulsione acqua in olio, di idrotalciti Zn/Al con la seguente formula:



Queste idrotalciti sono considerate eccellenti materiali per la produzione di sistemi di drug delivery grazie alla loro biocompatibilità, stabilità pH-dipendente, capacità di poter intercalare una grande varietà di anioni bio-molecolari e bassa tossicità. Inoltre, grazie alle loro dimensioni, circa 200 nm, le HTlc possono attraversare la membrana cellulare, essere internalizzate tramite endocitosi mediata da clatrina e dissolversi grazie al pH lisosomiale rilasciando il farmaco desiderato all'interno della cellula malata (**Figura 4**).^[17,18] È stato dimostrato che il farmaco intercalato all'interno delle HTlc aumenta la sua biodisponibilità e selettività verso le cellule tumorali.^[19,20]

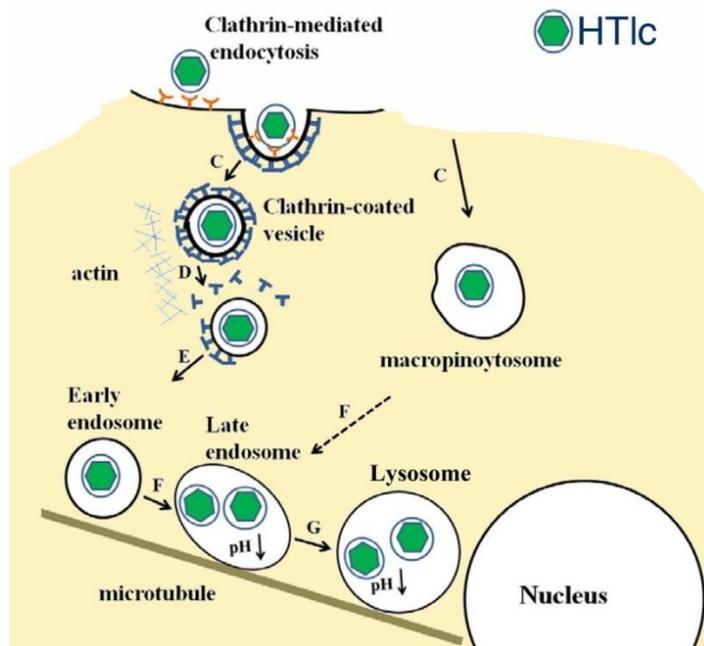


Figura 4. Meccanismo di internalizzazione delle HTlc attraverso endocitosi e rilascio del farmaco mediato dal pH lisosomiale.

1.3. Trattamento combinato dei tumori

Le neoplasie sono patologie molto complesse nelle quali una massa di tessuto cresce in modo incontrollato anche in assenza degli stimoli biologici che l'hanno generata. I meccanismi bio-molecolari e cellulari nonché le mutazioni che caratterizzano il tumore ed il suo microambiente sono molteplici e in molti casi non ancora noti. L'approccio clinico al trattamento dei tumori solidi è diverso a seconda della tipologia, localizzazione e stadio di avanzamento della malattia. Nei casi più aggressivi la pratica clinica prevede sempre più di frequente l'uso di terapie combinate, ossia la somministrazione contemporanea di farmaci diversi in grado di aggredire il tumore in maniera sinergica aumentando in alcuni casi l'aspettativa di guarigione/sopravvivenza.

Sulla base di questa premessa, il mio lavoro di tesi ha riguardato la sintesi di idrotalciti intercalate con due diverse molecole biologicamente attive, la norcantaridina (NCTD) e la ftalocianina tetrasulfonata (Ftl), al fine di verificare l'efficacia del loro uso combinato nei confronti di un panel di linee tumorali.

In particolare, la Norcantaridina (NCTD, **Figura 6**) con formula $C_8H_8O_4$, è una piccola molecola organica, derivante dalla demetilazione della Cantaridina, che agisce da agente chemioterapico per il trattamento dei tumori, soprattutto del fegato, dell'esofago e gastrico bloccando il ciclo cellulare in fase G2/M e portando le cellule stesse all'apoptosi (morte programmata).^[21]

La seconda molecola intercalata è la ftalocianina tetrasulfonata (**Figura 5**), una molecola fotosensibile anionica con formula $C_{32}H_{18}N_8O_{12}S_4$ che viene impiegata nella terapia fotodinamica (Photodynamic therapy, PDT).

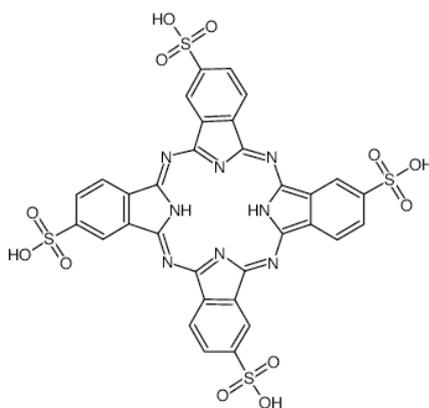


Figura 5. Struttura della ftalocianina tetrasulfonata.

È stato dimostrato che la combinazione della PDT con agenti chemioterapici attraverso approcci nanotecnologici, favorisce un migliore esito terapeutico.^[22,23] In particolare, tale combinazione può potenzialmente indurre immunità antitumorale o far regredire la resistenza al trattamento. Studi recenti dimostrano che la co-somministrazione, in modelli animali di malattia, di un agente fotosensibile ed un farmaco anticancro aumentano l'effetto citotossico generale.^[24]

1.4 La norcantaridina

La cantaridina (**Figura 6A**) è stata isolata da una specie di coleottero blister, *Mylabris phalerata* Pall., inclusa nella famiglia *Meloidae*, che viene utilizzata nella medicina cinese per il trattamento di problemi cutanei, come foruncoli o vesciche da più di 2000 anni.^[25]

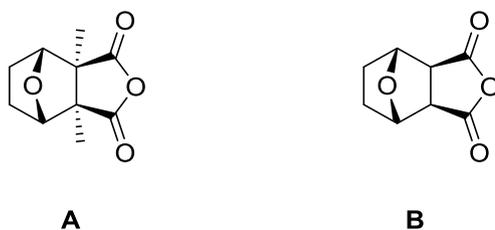


Figura 6. Struttura della cantaridina (**A**) e della norcantaridina (**B**).

Negli ultimi anni la cantaridina è stata identificata come un composto attivo della *Mylabris* con attività anti-tumorale. Tuttavia, l'utilizzo clinico della cantaridina è stato ridotto a causa della sua nefrotossicità e tossicità sul sistema urinario; contrariamente, nel 1996 la Food and Drug Administration (FDA) cinese ha approvato l'uso della forma demetilata della cantaridina, la norcantaridina, per il trattamento di alcuni tipi di tumore.^[26,27] Seppur ad oggi il suo meccanismo di azione non sia stato completamente delucidato, numerosi studi indicano la capacità di NCTD di indurre morte cellulare in diversi tipi di cellule. In particolare, i dati sino ad ora riportati dimostrano che la NCTD agisce prevalentemente secondo i seguenti meccanismi cellulari: i) attivazione della caspasi^[28] con conseguente induzione di apoptosi e diminuzione del rapporto di Bcl-2/Bax,^[29] una famiglia di geni con attività sia anti-apoptotica come la Bcl-2, sia pro-apoptotica come Bax; ii) modificazione delle proteine che fanno parte del ciclo cellulare e che portano all'arresto del ciclo stesso;^[30] iii) arresto della sintesi del DNA;^[31] iv) inibizione dell'invasività tumorale e metastatica; v) attivazione delle protein-chinasi attivate da mitogeno (MAPK) specifiche degli aminoacidi che regolano le funzioni della cellula inclusa la proliferazione,

l'espressione del gene, la mitosi, e l'apoptosi; vi) attivazione della proteina C chinasi.^[32] Inoltre, il trattamento con NCTD comporta anche un'eccellente regolazione del recettore CD95 e del ligando CD95,^[33] detto anche recettore di morte FAS che se attivato da specifici ligandi, induce apoptosi.

1.5 La terapia fotodinamica - PDT

La PDT è una tecnica medica non invasiva che comporta l'utilizzo contemporaneo di una molecola fotosensibile (PS), della luce e dell'ossigeno molecolare endogeno per uccidere le cellule tumorali.^[34] Individualmente ognuno di questi tre componenti non è tossico, ma quando il PS viene irradiato a una specifica lunghezza d'onda questo produce specie citotossiche quali ossigeno di singoletto ($^1\text{O}_2$) e specie reattive all'ossigeno (ROS), che inducono la morte cellulare per apoptosi o necrosi.^[35,36] L'intervallo di lunghezze d'onda utili per attivare la molecola fotosensibile è fra 600-900 nm (PDT window) perché questa radiazione non è assorbita dai cromofori endogeni presenti nell'organismo (luce con lunghezza d'onda inferiore a 580 nm viene fortemente assorbita dall'emoglobina); inoltre, è più penetrante e sufficientemente energetica da permettere la formazione di ROS.^[37]

In genere, le molecole fotosensibili sono poco solubili in acqua e hanno una bassa selettività per le cellule tumorali, per questo motivo l'uso di nanocarriers, quali le idrotalciti, può favorire il loro accumulo nel tessuto tumorale aumentandone l'efficacia.

Il meccanismo di azione della PDT si può sintetizzare nei seguenti passaggi (**Figura 7**):^[38]

- somministrazione del farmaco;
- accumulo nel tumore;
- attivazione delle molecole fotosensibili attraverso irraggiamento ad un'opportuna lunghezza d'onda e conseguente formazione di ROS;
- morte cellulare;

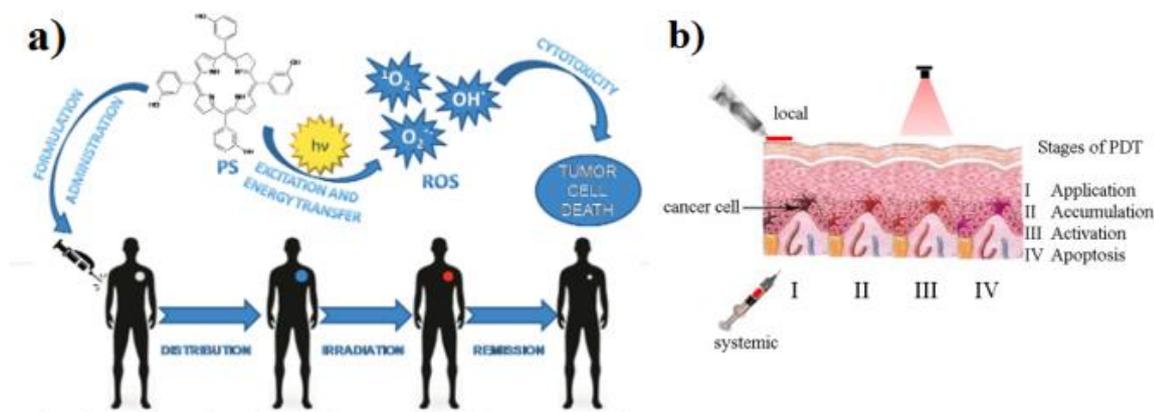


Figura 7. Le due immagini illustrano ambedue il meccanismo di azione della PDT. Nella prima (figura **a**) a livello generale, nella seconda (figura **b**) è evidenziata l'azione a livello cellulare.

La PDT è una modalità di trattamento che combina processi sia fotofisici che fotochimici; infatti, l'eccitazione del PS con la luce (processo fotofisico) è seguito da reazioni fotochimiche che avvengono tra il PS eccitato e i substrati cellulari o le molecole di ossigeno presenti nel tessuto tumorale e nel microambiente circostante.^[39]

Generalmente il PS nello stato fondamentale S_0 ha due elettroni di spin opposto nell'orbitale molecolare a più bassa energia. In seguito all'irraggiamento un elettrone viene eccitato in un orbitale molecolare a più alta energia senza che avvenga il cambiamento di spin, questo viene chiamato stato eccitato di singoletto S_1 . Tuttavia, il PS nel suo stato eccitato di singoletto non può partecipare a reazioni con i substrati cellulari poiché il suo tempo di vita è molto breve (dell'ordine di nano/pico secondi). Il passaggio da S_1 a S_0 può avvenire tramite un processo radiativo (reazione di fluorescenza), o attraverso un processo non radiativo, come conversioni interne e altri processi collisionali o di quenching o tramite *intersystem crossing*.^[40] Quest'ultimo permette alle molecole fotosensibili di passare dallo stato eccitato di singoletto S_1 allo stato eccitato di tripletto T_1 , proibito dalle regole di selezione ma favorito da accoppiamenti spin-orbita. Il T_1 per tornare allo stato fondamentale S_0 dissipa la sua energia tramite processi radiativi come la fosforescenza o processi non radiativi, rilasciando energia sotto forma di calore (**Figura 8**).

Durante la PDT, all'interno dell'ambiente biologico, lo stato eccitato di tripletto, avendo un tempo di vita più lungo (dell'ordine di micro/milli secondi) reagisce direttamente con i substrati cellulari tramite trasferimento di elettroni generando specie citotossiche secondo due diversi meccanismi.^[41,42]

1. **reazione di tipo I:** implica un trasferimento elettronico dalle molecole fotosensibili nello stato eccitato di tripletto a substrati biologici con conseguente formazione di specie radicaliche che, a loro volta, reagiscono con l'ossigeno molecolare per produrre specie reattive all'ossigeno (ROS). Questi intermedi sono altamente reattivi e forti ossidanti, come l'anione superossido $\cdot\text{O}_2^-$, l'acqua ossigenata H_2O_2 e il radicale ossidrilico $\cdot\text{OH}$;
2. **reazione di tipo II:** implica un trasferimento di energia dalle molecole fotosensibili direttamente all'ossigeno molecolare per formare ossigeno di singoletto $^1\text{O}_2$ che ha un ruolo chiave nei processi molecolari alla base del trattamento anticancro tramite PDT.^[43,44]

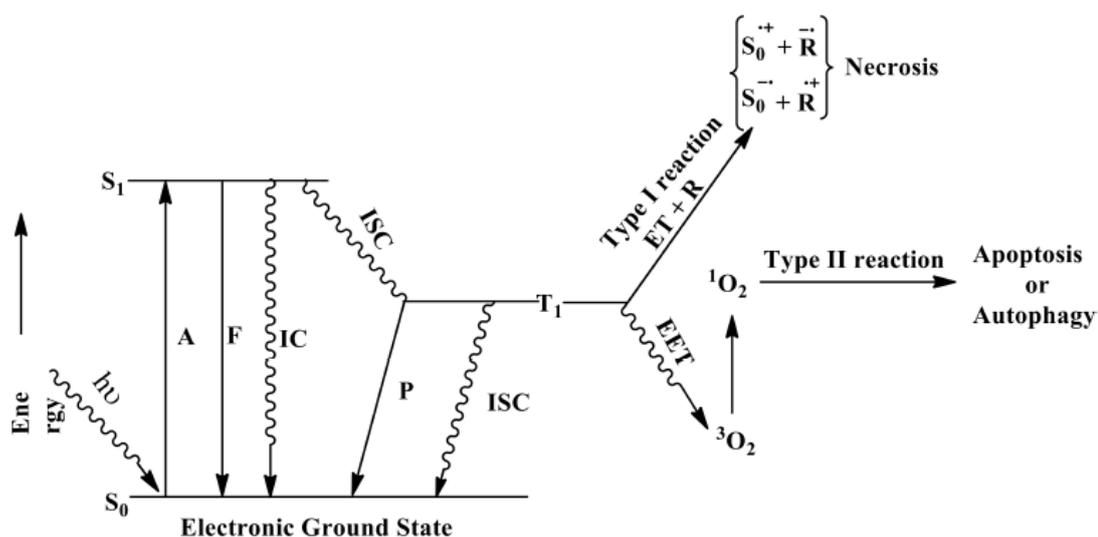


Figura 8. Diagramma di Jablonski modificato che illustra il principio della PDT. A = assorbimento fotonico; F = fluorescenza (emissione); P = fosforescenza; S = singoletto; T = tripletto; IC = conversione interna; ISC = intersystem crossing; EET = trasferimento di energia di eccitazione; ET = trasferimento di elettroni; R = substrato.

L'ossigeno di singoletto è uno stato eccitato dell'ossigeno molecolare, che si forma quando la molecola di ossigeno assorbe sufficiente energia in modo da eseguire un'inversione di spin di uno degli elettroni spaiati insieme ad uno spostamento in un diverso orbitale. Lo stato fondamentale è lo stato di tripletto $^3\Sigma_g^-$ e differisce dallo stato eccitato, che è di singoletto, $^1\Delta_g$ poiché quest'ultimo ha due elettroni accoppiati nell'orbitale di antilegame (**Figura 9**). Può esistere anche un altro stato eccitato di singoletto $^1\Sigma_g^+$, ad energia più elevata, con una configurazione che differisce dall'altro stato eccitato solo per la posizione degli ultimi due elettroni che hanno spin antiparallelo. Quest'ultimo avendo un tempo di

vita molto breve si disattiva facilmente passando allo stato eccitato di singoletto $^1\Delta_g$ a più bassa energia.

La transizione dall'altro stato eccitato di singoletto $^1\Delta_g$ allo stato fondamentale di tripletto è proibita, per questo il tempo di decadimento è lento e ci può essere interazione dell'ossigeno di singoletto con altre specie.^[45]

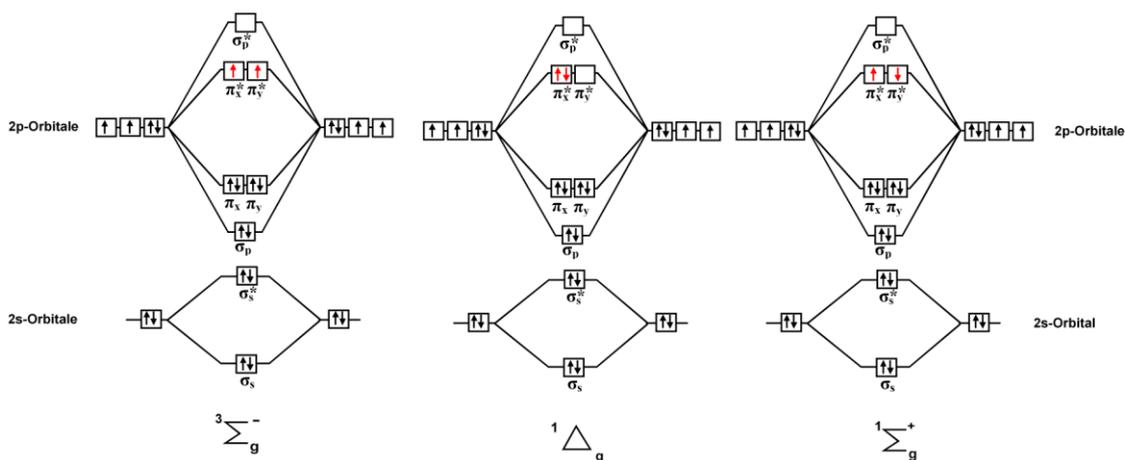


Figura 9. Stati elettronici dell'ossigeno molecolare O_2 .

La PDT uccide le cellule tumorali in due diversi modi: i) direttamente, attraverso apoptosi, necrosi o autofagia; o ii) indirettamente danneggiando la vascolarizzazione tumorale che porta nutrienti e ossigeno alle cellule malate. Questi meccanismi sono indotti da diversi segnali che dipendono dal tipo di molecola fotosensibile che viene utilizzata, dalla dose e localizzazione del PS, dal genotipo delle cellule soggette a PDT, dal livello di ossigeno ecc. Se la molecola fotosensibile si localizza nei mitocondri la cellula muore per apoptosi, mentre se è localizzata sulla membrana plasmatica o nei lisosomi la cellula muore per necrosi, ossia morte cellulare derivante da un trauma cellulare o da uno stress.^[42]

La prima molecola fotosensibile approvata dalla Food and Drug Administration americana (FDA) per il trattamento del cancro, fu il Photofrin, un derivato dell'ematoporfirina che consiste in una miscela di dimeri e oligomeri nei quali le unità porfiriniche sono legate tra loro tramite diversi tipi di legami (estere, etere, C-C). Il Photofrin venne utilizzato per la prima volta nel trattamento delle metastasi cutanee e della recidiva sulla parete toracica del carcinoma mammario. Su un totale di 37 pazienti trattati, 5 diedero una risposta completa (13,5%), 13 mostrarono una risposta parziale e 19 non mostrarono alcun beneficio.^[46]

Il Photofrin viene generalmente somministrato per via endovenosa e l'irraggiamento con luce a 630 nm avviene dopo 24-48 h dall'iniezione. Tuttavia, questa sostanza presenta alcuni importanti limiti; oltre a non essere puro e non ben definito chimicamente, assorbe relativamente poco ad alte lunghezze d'onda, cioè assorbe luce poco penetrante. Inoltre, dal punto di vista clinico, avendo un tempo di "clearance" molto lungo induce fotosensibilizzazione della pelle per lunghi periodi dopo il trattamento (4-8 settimane).

Al fine di limitare gli effetti collaterali legati all'uso di Photofrin, nuove classi di agenti fotosensibili sono state studiate. Fra queste le ftalocianine (Ftl) si sono dimostrate particolarmente efficaci. In particolare, rispetto alle porfirine, le Ftl sono risultate più efficaci in termini di intensità di assorbimento nella regione rossa dello spettro, favorendo pertanto la penetrazione dei tessuti e quindi l'efficacia del trattamento.^[47] Nel 1995, il farmaco Photosens, costituito da una miscela di alluminio ftalocianine a diversi gradi di solfonazione, furono approvate per il trattamento di pazienti affetti da tumore.^[48] I dati di letteratura^[49] unitamente ai risultati sui pazienti, supportano l'ipotesi che le ftalocianine possano avere importanti applicazioni nel trattamento fototerapico di alcune tipologie di tumore; per tale motivo abbiamo scelto questa classe di composti per l'intercalazione nelle idrotalciti.

2. Scopo del lavoro

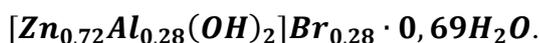
Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato la preparazione di nanocompositi innovativi a base di idrotalciti (HTlc), che sono in grado di intercalare una grande varietà di biomolecole anioniche e risultano particolarmente adatti al trasporto di farmaci grazie alle loro caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità e scarsa tossicità. In particolare, sono state scelte due diverse sostanze da intercalare fra le lamelle cariche positivamente delle HTlc: la norcantaridina (NCTD), un farmaco antitumorale, e la ftalocianina tetrasulfonata (ftl), una molecola fotosensibile che viene utilizzata in terapia fotodinamica (PDT). Queste nanoparticelle sono state caratterizzate in termini di proprietà chimico-fisiche, stabilità, capacità di loading, rilascio nel tempo e quantità di ROS e $^1\text{O}_2$ generati. Inoltre, sono stati effettuati test preliminari *in vitro* su un panel di cellule tumorali per valutare l'efficacia delle singole preparazioni e della loro combinazione. Per la prima volta è stato dimostrato che l'uso combinato, mediato da HTlc, di NCTD e ftl è in grado di inibire sinergicamente la proliferazione di cellule tumorali del colon e del seno.

3. Discussione dei risultati

3.1 Sintesi delle idrotalciti (HTlc) Zn/Al con la tecnica della doppia microemulsione

La sintesi delle idrotalciti nanometriche Zn/Al è stata effettuata mediante la tecnica della doppia microemulsione inversa w/o.^[14]

Tramite tale tecnica sono state ottenute idrotalciti del tipo Zn/Al con la seguente formula generale:



La composizione esatta delle HTlc è stata determinata combinando la spettroscopia di emissione atomica (ICP-OES), che consente la determinazione della frazione molare $Al/(Al + Zn)$ e l'analisi termogravimetrica (TGA) in aria (**Figura 10**).

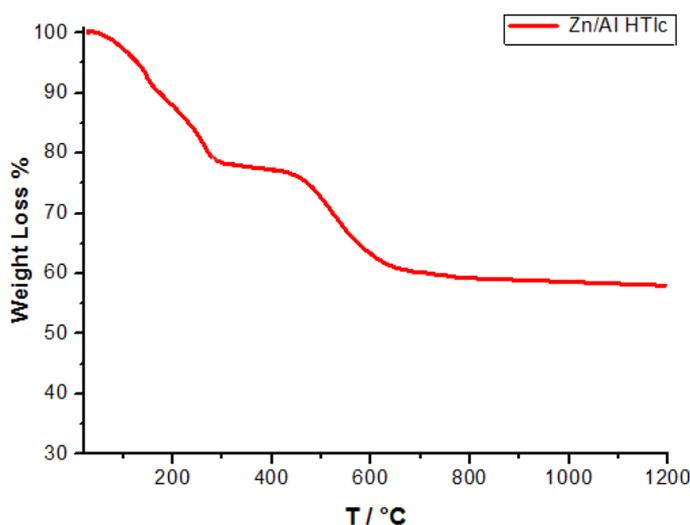


Figura 10. Curva TG delle HTlc Zn/Al. (Condizione operativa: riscaldamento di 10 °C al minuto, flusso di aria).

Come mostrato in **Figura 10**, la curva della TG, che arriva fino a 1200 °C, è costituita da tre regioni ben definite che indicano la perdita in peso del campione (perdita totale: 37% circa). Le due regioni, comprese tra 80 e 300 °C, indicano la perdita di acqua adsorbita sulla superficie, l'acqua co-intercalata, e la deidrossilazione degli strati brucitici (perdita dei gruppi OH posizionati sui vertici). L'ultima regione, compresa tra 300 e 600 °C, è correlata invece alla perdita dello ione bromuro. La curva della TG non va completamente

a zero poiché gli ossidi dei metalli (ZnO e Al_2O_3) necessitano di temperature più alte per bruciare e pertanto rimangono come residui.

Un'altra tecnica utilizzata per la caratterizzazione delle HTlc è la diffrazione a Raggi-X. Il riflesso che dà informazioni sulla natura dell'anione intercalato è quello a circa $10^\circ 2\theta$ in quanto indica la distanza interstrato, ossia la distanza tra il baricentro di una lamella e il baricentro della successiva. Tale riflesso si sposta quindi in funzione del tipo di anione intercalato e in questo caso ha un valore di $8,06 \text{ \AA}$, tipico dello ione bromuro (carbonato $7,76 \text{ \AA}$, nitrato $8,7 \text{ \AA}$, ecc). Altri picchi caratteristici sono quelli intorno a $60^\circ 2\theta$, che indicano la distanza tra i metalli presenti all'interno di una stessa lamella (**Figura 11**). La posizione di questi picchi varia a seconda dei raggi ionici di M^{II} e di M^{III} . Nelle idrotalciti caratterizzate dalla presenza di metalli con raggi ionici elevati, tale riflesso cade ad angoli più bassi, al contrario di quelle con metalli che hanno un raggio ionico più piccolo che spostano la riflessione ad angoli più elevati.

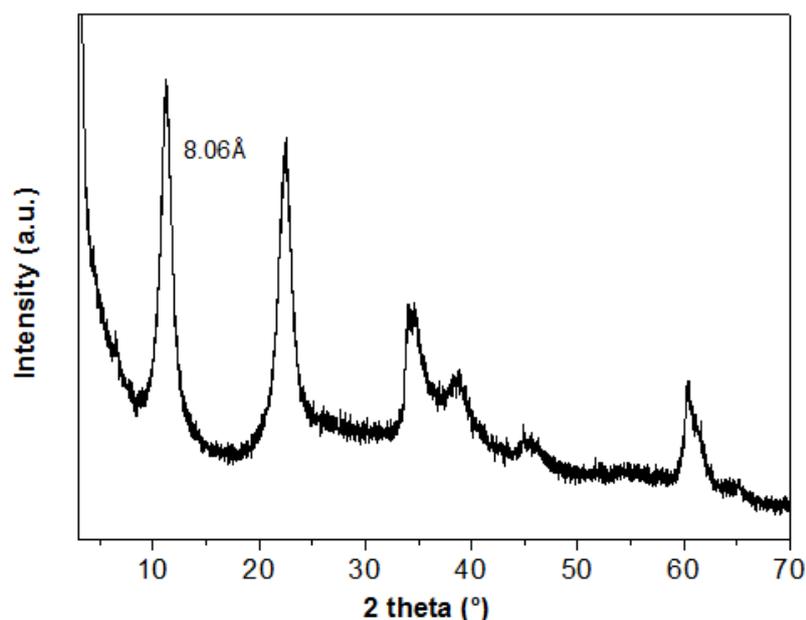


Figura 11. Raggi-X delle HTlc Zn/Al.

La morfologia e l'organizzazione delle HTlc è stata studiata utilizzando il microscopio elettronico a scansione (SEM). Come si può vedere dalla **Figura 12**, le particelle di dimensioni più grandi hanno chiaramente una forma esagonale, a differenza di quelle più piccole che perdono questo tipo di morfologia. Si notano infatti due popolazioni di nanoparticelle di HTlc Zn/Al, una di dimensioni intorno ai 200 nm ed una con dimensioni maggiori intorno a 300 nm.

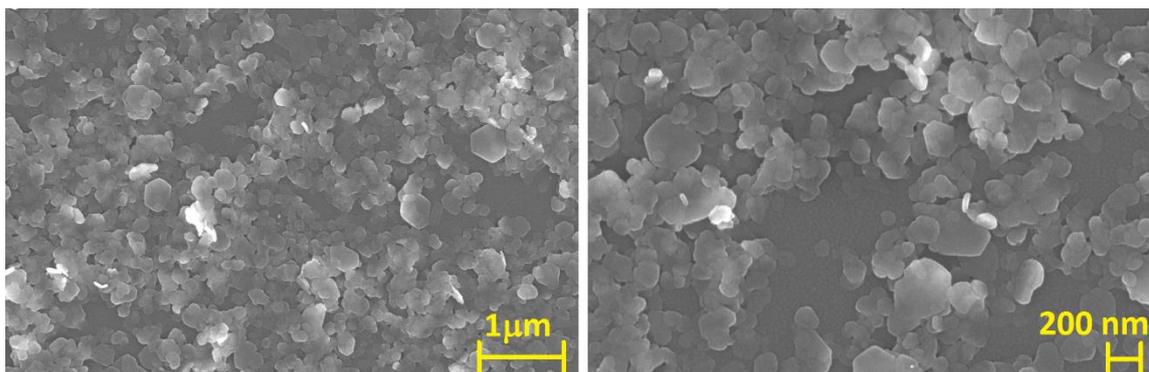


Figura 12. Immagini SEM delle HTlc Zn/Al a diversi ingrandimenti.

3.2. Idrotalciti con norcantaridina (HTlc@NCTD)

3.2.1. Sintesi e caratterizzazione

Per permetterne l'intercalazione nelle HTlc, la norcantaridina è stata trattata con idrossido di sodio 1 M in modo da ottenere la carica negativa in grado di interagire con le lamelle cariche positivamente delle idrotalciti (**Figura 13**).

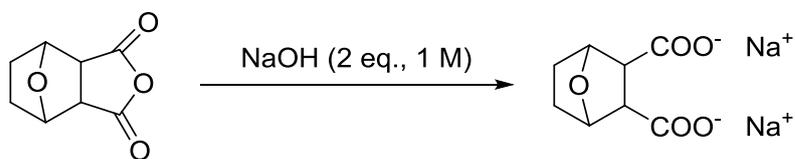


Figura 13. Apertura della NCTD dopo trattamento con NaOH.

La prima prova di intercalazione della norcantaridina (NCTD), identificata con sigla HTlc@NCTD_1, è stata eseguita utilizzando una soluzione di acqua/etanolo v/v 1:1 0,005 M. La composizione di HTlc@NCTD è stata ottenuta con la combinazione delle tecniche ICP (dati non riportati) e TGA.

La curva TG del campione HTlc@NCTD_1, compresa nel range tra 0 e 1200 °C, mostra una perdita di massa totale di circa il 35%. Si possono notare due regioni tra 80 e 250 °C indicanti la perdita di acqua adsorbita sulla superficie, la perdita di acqua co-intercalata, la decomposizione dell'anione carbonato e la de-idrossilazione degli strati brucitici. L'altro flesso tra 300 e 450 °C rappresenta la perdita dell'anione intercalato, in questo caso la norcantaridina. Il restante 65% sono gli ossidi dei metalli (ZnO e Al₂O₃) presenti nelle idrotalciti che a 1200 °C non riescono a bruciare (**Figura 14**).

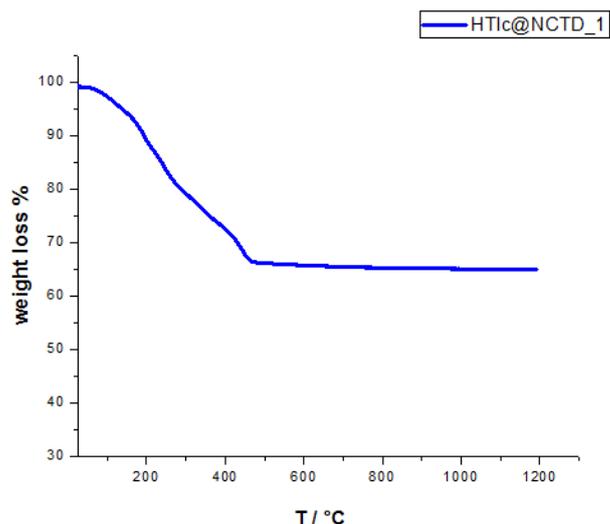


Figura 14. Curva TG del campione HTlc@NCTD_1. (Condizione operativa: riscaldamento di 10 °C al minuto, flusso di aria).

Come si può notare dalla formula sotto riportata (*eq. 1*), le condizioni sperimentali utilizzate per HTlc@NCTD_1 hanno causato la parziale intercalazione del carbonato a discapito della NCTD:



Per verificare l'avvenuta intercalazione della norcantaridina, le HTlc@NCTD_1 sono state caratterizzate tramite Raggi-X (**Figura 15**). Oltre al flesso dovuto alla norcantaridina a 15,5 Å si può osservare infatti un riflesso a 7,63 Å molto intenso dovuto anche al contributo del carbonato.

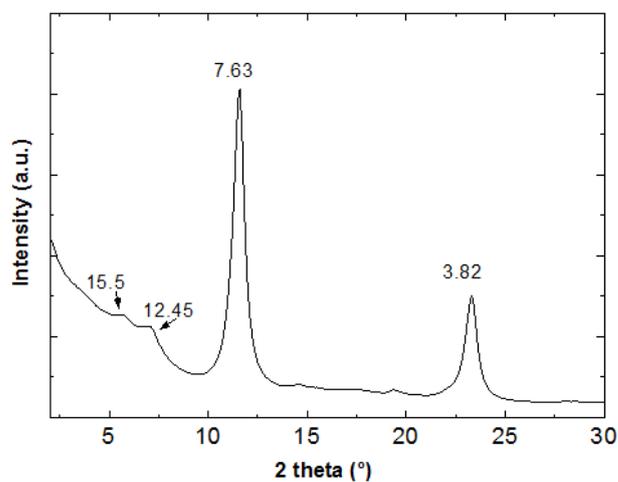


Figura 15. Raggi-X del campione HTlc@NCTD_1.

Al fine di ottimizzare l'efficienza di intercalazione, la reazione è stata ripetuta utilizzando una soluzione più concentrata di NCTD (acqua/etanolo 1:1 v/v 0,05 M) e mantenendo la reazione sotto costante flusso di azoto così da eliminare la possibile interferenza degli ioni carbonato. Questo protocollo ha fornito un secondo batch di materiale identificato con la sigla HTlc@NCTD_2 nel quale NCTD è intercalata in modo quantitativo (eq. 2).



La **Figura 16** rappresenta la curva TGA del campione HTlc@NCTD_2, che non presenta notevoli differenze con quella del campione HTlc@NCTD_1. Si può solo notare, nella zona compresa tra 300 e 450 °C, una maggiore perdita in peso dell'anione intercalato. Nella regione interstrato, infatti, la norcantaridina intercalata risulta essere maggiore poiché come descritto dalla formula (eq. 2), la quantità intercalata è circa il doppio rispetto alle HTlc@NCTD_1. La perdita totale in peso del campione iniziale di HTlc@NCTD_2 è del 42,5%.

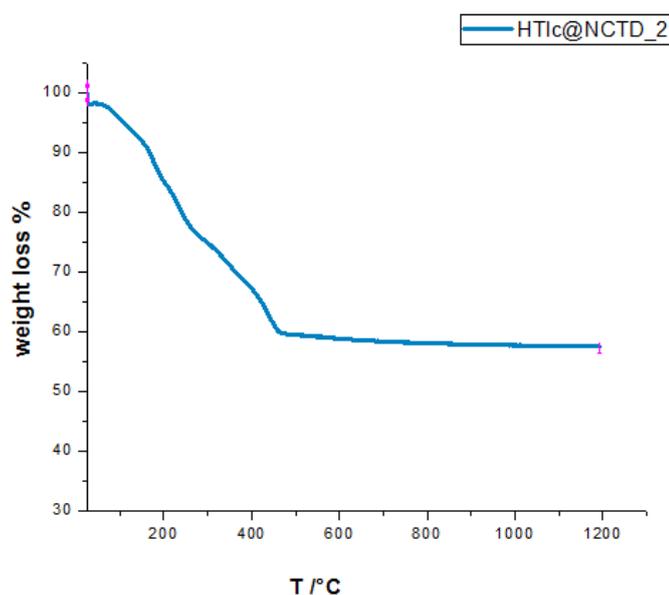


Figura 16. Curva TG del campione HTlc@NCTD_2. (Condizione operativa: riscaldamento di 10 °C al minuto, flusso di aria).

Inoltre, nello spettro Raggi-X del campione HTlc@NCTD_2 (**Figura 17**) si osserva, al contrario delle HTlc@NCTD_1, un picco più definito a 15,03 Å. Nel composto intercalato la distanza interstrato aumenta a 15,03 Å rispetto alla forma bromuro (8,06 Å) indicando

che l'intercalazione è avvenuta con successo. In questo caso il picco del carbonato non è presente, ad ulteriore conferma della formula ottenuta (eq. 2).

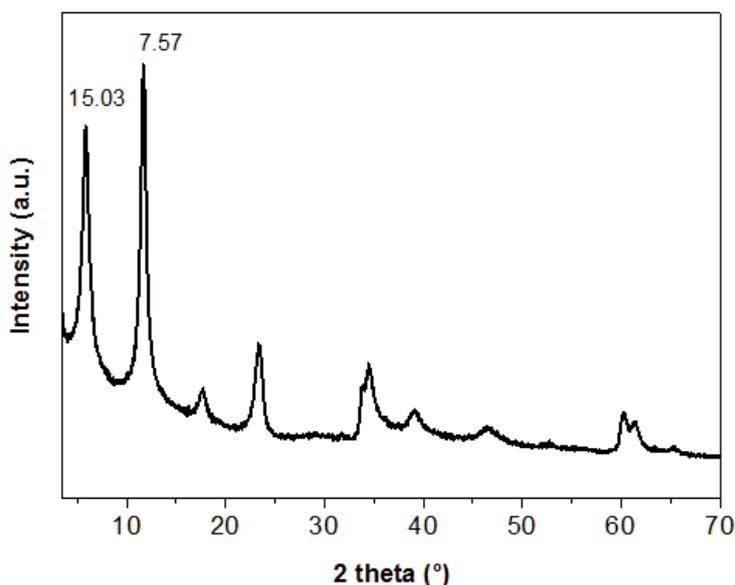


Figura 17. Raggi-X del campione HTlc@NCTD_2.

I dati sopra riportati consentono di stabilire che il contenuto di NCTD nel campione HTlc@NCTD_2 è di 279 mg per grammo di HTlc; al contrario, il contenuto di NCTD per grammo di HTlc nel campione HTlc@NCTD_1 è di 140 mg per grammo di HTlc. Pertanto, tutte le successive analisi e caratterizzazioni sono da intendersi relative al batch HTlc@NCTD_2.

La morfologia e l'organizzazione delle HTlc@NCTD_2 è stata studiata utilizzando il microscopio elettronico a scansione (SEM). Come si può vedere in **Figura 18**, le idrotalciti con norcantaridina formano degli agglomerati, un processo tipico che avviene durante l'intercalazione.^[50] Tuttavia, dalle immagini SEM si può osservare che la dimensione delle singole particelle è di circa 200 nm.

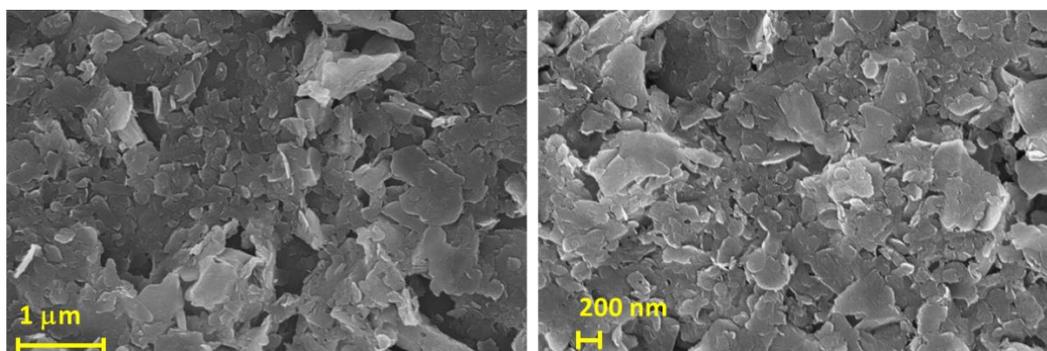


Figura 18. Immagini SEM delle HTlc@NCTD_2 a diversi ingrandimenti.

3.2.2. Studio dei rilasci

L'analisi dei rilasci è stata effettuata mediante risonanza magnetica nucleare. In **Figura 19** si osserva lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O al 10% della forma aperta della norcantaridina libera (**a**) e quello della norcantaridina legata alle idrotalciti (**b**). Non si notano spostamenti di chemical shift dei picchi tra i due spettri e il picco che è stato preso in esame per studiare i rilasci è quello a 2,73 ppm corrispondente agli idrogeni identificati con il numero 1 in **Figura 19**.

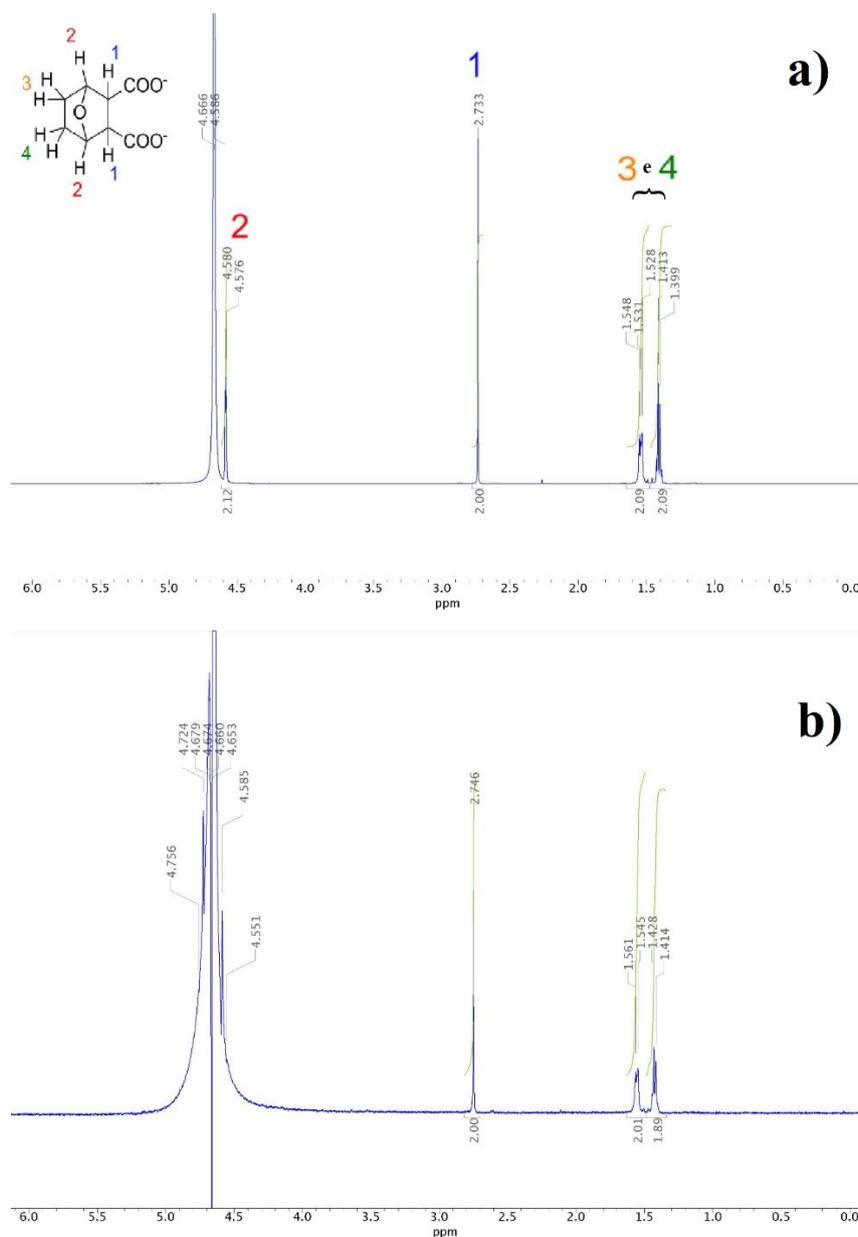


Figura 19. Spettri $^1\text{H-NMR}$ della NCTD libera (**a**) e delle HTlc@NCTD (**b**).

Lo studio mostra che a pH fisiologico (7,4) la NCTD non viene rilasciata dalle nanoparticelle (**Figura 20**). Tuttavia, questo dato potrebbe essere sottostimato a causa della non adeguata sensibilità della tecnica utilizzata (NMR) in relazione alle piccole quantità di composto da rilevare. Contrariamente, a pH 5,5 si è visto che le HTlc@NCTD_2 si sciolgono completamente nell'arco di pochi minuti rilasciando il farmaco. Questo comportamento risulta particolarmente interessante nell'ottica del drug delivery. Infatti, è stato dimostrato che le HTlc vengono internalizzate dalla cellula tramite endocitosi mediata da clatrina per poi accumularsi all'interno dei lisosomi.^[17,18] Sulla membrana lisosomiale sono presenti pompe protoniche che mantengono l'acidità interna a valori di pH pari a 4,5 – 4,8, mentre il valore del pH citoplasmatico è di circa 7. Idealmente, in queste condizioni le HTlc@NCTD potrebbero raggiungere la cellula target senza perdere il loro cargo che sarebbe rilasciato in modo selettivo solo una volta all'interno della cellula stessa.

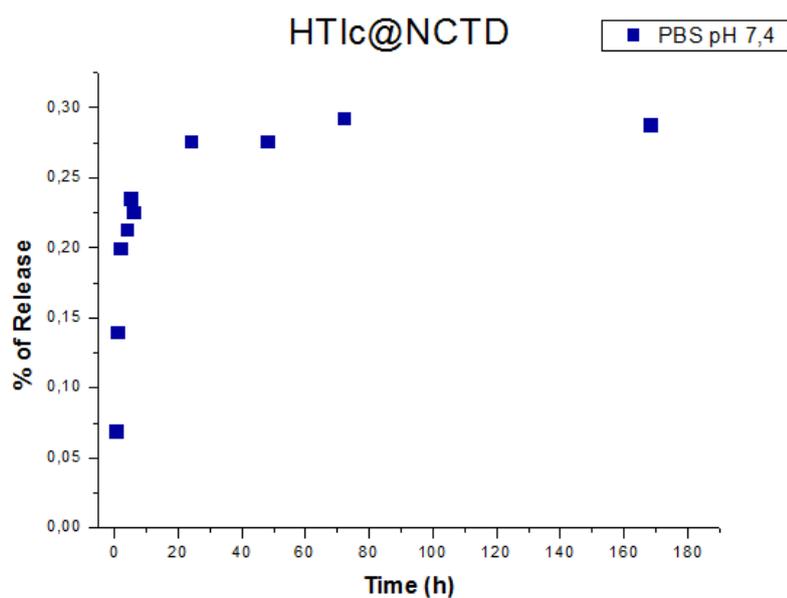


Figura 20. Studio dei rilasci di NCTD in PBS a pH 7,4 per il campione HTlc@NCTD_2.

3.3. Idrotalciti con ftalocianina (HTlc@ftl)

3.3.1. Sintesi e caratterizzazione

Per poter intercalare la ftalocianina tetrasulfonata all'interno delle HTlc, questa è stata dapprima trattata con idrossido di sodio 1 M così da ottenere la carica negativa capace di interagire con la carica positiva delle lamelle (**Figura 21**).

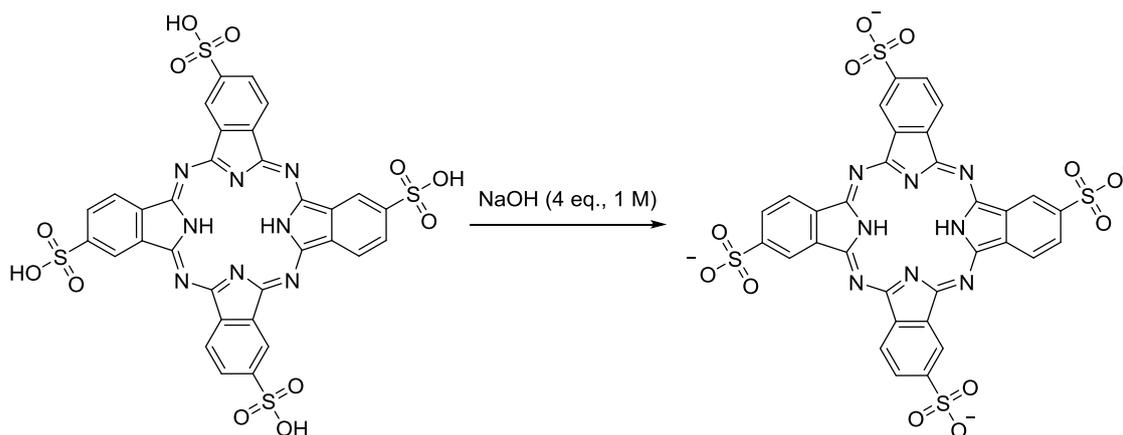


Figura 21. Sintesi del sale sodico di ftl-SO₃H mediante reazione con NaOH 1 M.

La composizione del campione HTlc@ftl è stata ottenuta combinando ICP (rapporto tra metalli $\frac{Al}{Al+Zn} = 0,30$) e TGA ed è risultata come di seguito riportato.



Come si può vedere dalla formula, la presenza del carbonato ha impedito la completa intercalazione della ftalocianina. La quantità di ftalocianina presente per grammo di HTlc è risultata comunque soddisfacente (232 mg).

Per la caratterizzazione delle HTlc@ftl è stata utilizzata la tecnica termogravimetrica in flusso d'aria come mostrato in **Figura 22**. La curva, eseguita in un range di temperatura tra 0 e 1200 °C, mostra una perdita totale in peso del 46,2% del campione iniziale. Le prime due regioni comprese tra 80 e 250 °C indicano la perdita di acqua adsorbita sulla superficie, la perdita di acqua co-intercalata, la decomposizione dell'anione carbonato e la perdita dovuta alla deidrossilazione degli strati brucitici. L'altro flesso tra 300 e 450 °C rappresenta la perdita dell'anione intercalato, in questo caso la ftalocianina. La curva non raggiunge lo zero poiché restano gli ossidi dei metalli di zinco e alluminio (ZnO e Al₂O₃) che non riescono a bruciare a 1200 °C.

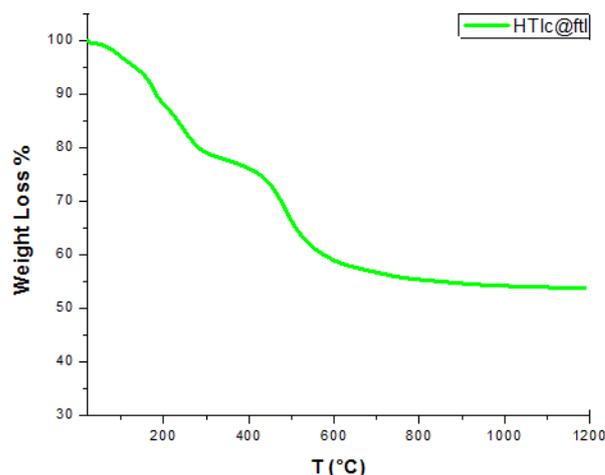


Figura 22. Curva TG del campione HTlc@ftl. (Condizione operativa: riscaldamento di 10 °C/minuto, flusso di aria).

La **Figura 23** mostra i Raggi-X del campione HTlc@ftl. Il picco corrispondente alla distanza interstrato ha un valore di 23,4 Å, maggiore rispetto a quello delle HTlc contenenti NCTD e l'anione bromuro poiché il peso molecolare della ftalocianina è maggiore rispetto ad entrambi. Anche in questo spettro si può constatare la presenza del carbonato come si può notare dall' intenso riflesso a 7,73 Å.

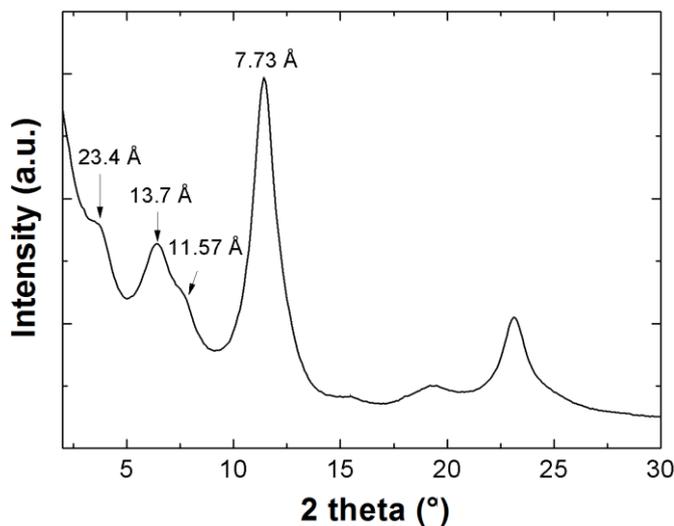


Figura 23. Raggi-X del campione HTlc@ftl.

La morfologia e l'organizzazione delle HTlc@ftl è stata studiata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). In **Figura 24** si può notare la presenza di agglomerati di

nanoparticelle, ancora più intensi rispetto a quelli osservati per le HTlc@NCTD_2. Tuttavia, anche in questo caso si osserva che le particelle singole conservano una dimensione intorno ai 200 nm.

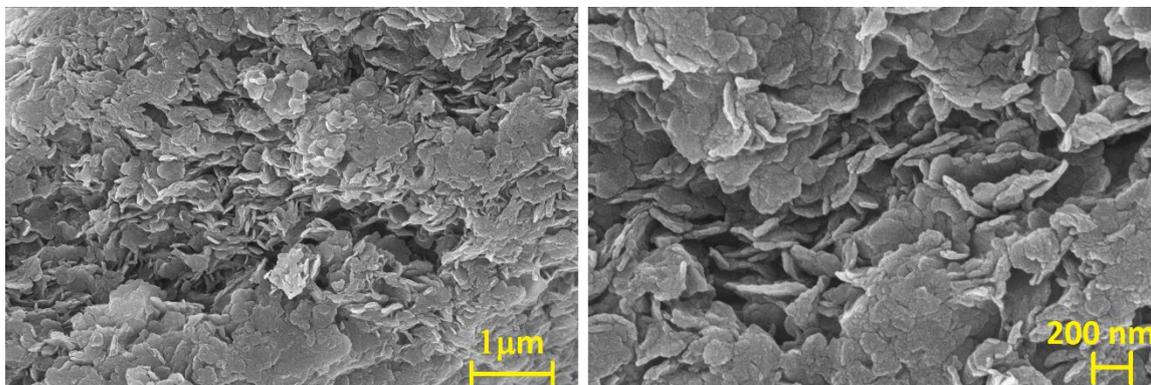


Figura 24. Immagine SEM delle HTlc@ftl a diversi ingrandimenti.

3.3.2. Studio dei rilasci

L'analisi dei rilasci di ftl dal composito HTlc@ftl è stata effettuata mediante spettroscopia di assorbimento. In **Figura 25a** viene mostrato il picco di assorbimento in PBS a pH 5,5, della ftalocianina libera (curva blu) a circa 600 nm e quello della ftalocianina caricata sulle HTlc (curva verde), leggermente spostato verso la regione rossa dello spettro. Questo può essere dovuto alle interazioni che si creano tra la ftl e le HTlc che rendono energeticamente più stabile il composto rispetto alla molecola libera a cui corrisponde una frequenza minore e quindi una lunghezza d'onda maggiore. Anche nello spettro della ftalocianina e delle HTlc@ftl in PBS a pH 7,4 si osserva lo spostamento della banda di assorbimento a lunghezze d'onda maggiori per il composto legato piuttosto che quello libero (**Figura 25b**). Lo studio dei rilasci è stato valutato andando a osservare il comportamento del picco di assorbimento a circa 620 nm.

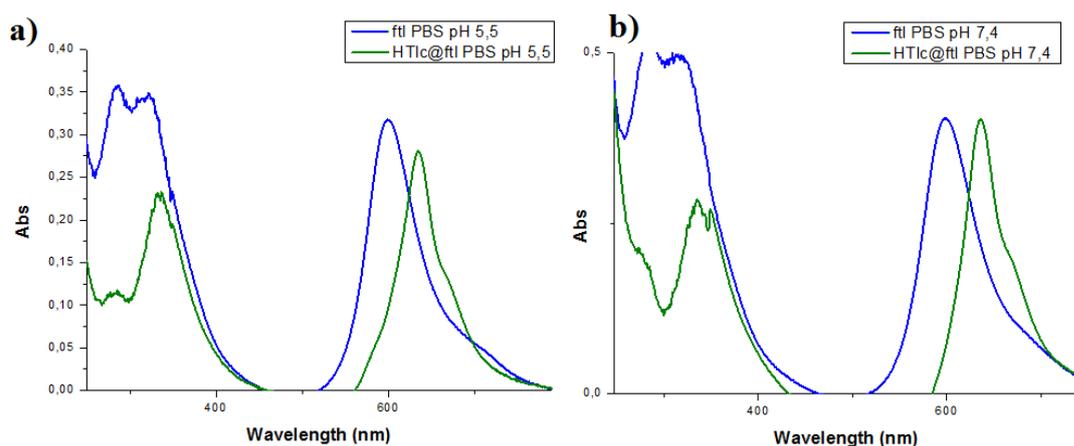


Figura 25. Spettri di assorbimento della ftl libera e delle HTlc@ftl in PBS a pH 5,5 (a) e in PBS a pH 7,4 (b).

La **Figura 26** mostra i rilasci in PBS a pH 7,4 e a pH 5,5 del campione ibrido HTlc@ftl ottenuto. Si può notare che il profilo di rilascio a pH 5,5 è più alto rispetto a quello a pH neutro. Nel primo caso dopo 24 h circa il 60% del farmaco viene rilasciato, mentre nel secondo caso circa il 40%. In entrambi i casi comunque, la maggior parte del farmaco viene rilasciato durante le prime ore, per poi raggiungere un plateau durante il successivo tempo di osservazione. La ftalocianina rilasciata bruscamente entro le prime 24 h potrebbe essere quella posta sulla superficie dei nanocristalli e sui bordi delle regioni interstrato, maggiormente accessibile al mezzo di rilascio.

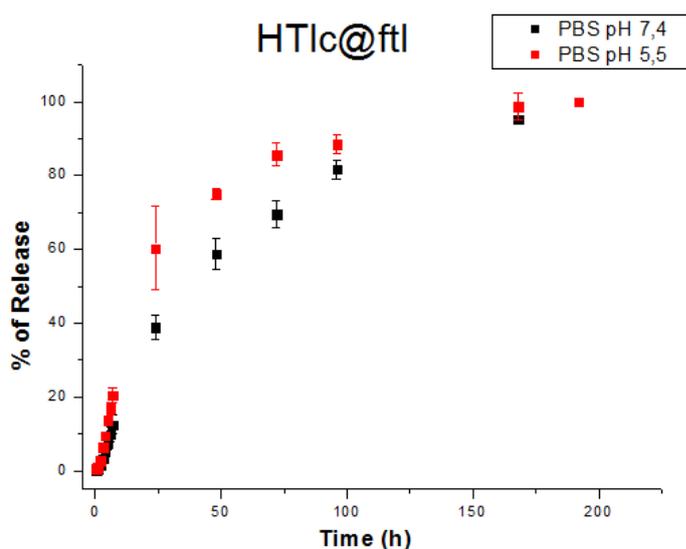


Figura 26. Studio dei rilasci del campione HTlc@ftl in PBS a pH 7,4 (punti neri), e in PBS a pH 5,5 (punti rossi).

Per valutare il meccanismo di rilascio della ftalocianina dalle HTlc sono stati utilizzati differenti modelli cinetici empirici di rilascio (ordine zero, primo ordine e Higuchi). La velocità di ordine zero (eq. 4) descrive sistemi dove la velocità di rilascio del farmaco è indipendente dalla sua concentrazione:

$$Q_t = K_0 t + C_0 \quad (4)$$

Q_t è la quantità di farmaco rilasciato in un tempo t , C_0 è la quantità iniziale di farmaco in soluzione e K_0 corrisponde alla costante di velocità di ordine zero espressa in unità concentrazione/tempo. Per una cinetica di ordine zero il grafico quantità di farmaco rilasciato su tempo sarà lineare.

La cinetica di primo ordine (eq. 5) descrive il rilascio del farmaco dal sistema e la sua velocità è dipendente dalla concentrazione:

$$Q_t = Q_0 e^{-k_f t} \quad (5)$$

dove Q_t è la quantità di farmaco rilasciato in un tempo t , Q_0 è la quantità di farmaco iniziale e k_f è la costante di primo ordine espressa in unità di tempo. Il grafico, corrispondente a questa cinetica, $(\log(C_0 - C_t))$ su tempo sarà lineare ma con pendenza negativa.

Il modello cinetico di Higuchi è basato sulle ipotesi che (i) la concentrazione iniziale del farmaco nella matrice è più alta rispetto alla solubilità del farmaco stesso, (ii) la diffusione del farmaco avviene in una sola dimensione, (iii) le particelle di farmaco sono molto più piccole dello spessore del sistema, (iv) lo *swelling* della matrice e la dissoluzione sono trascurabili e (v) la diffusione del farmaco è costante. L'equazione che descrive questo modello è:

$$Q_t = k_H \sqrt{t} + C_H \quad (6)$$

dove Q_t è la quantità di farmaco rilasciato nel tempo t , k_H è la costante di dissoluzione di Higuchi e C_H è la solubilità del farmaco nella matrice. Il modello di Higuchi descrive il rilascio del farmaco come un processo diffusionale basato sulla legge di Fick. Per decidere il modello cinetico migliore si calcola il valore di R^2 . Come mostrato in **Tabella 1**, sia il campione HTlc@ftl in PBS a pH 7,4 sia quello in PBS a pH 5,5 hanno il miglior valore di R^2 per il modello di Higuchi (0,98 e 0,92). Questo indica che il rilascio della ftalocianina è prevalentemente controllato da un meccanismo di diffusione.

Tabella 1. Parametri e coefficienti di correlazione dei modelli cinetici empirici.

| Sample | Zero-Order $Q_t = K_0 t + C_0$ | | | First-Order $Q_t = Q_0 \exp(-k_f t)$ | | Higuchi $Q_t = k_H \sqrt{t} + C_H$ | |
|---------------------|-----------------------------------|-------|-------|---|-------|---------------------------------------|-------|
| | K_0 | C_0 | R^2 | K_f | R^2 | K_H | R^2 |
| HTlc@ftl- pH 7.4 | 0,56±0,06 | 9±4 | 0,87 | 0,023±0,007 | 0,44 | 8,4±0,3 | 0,98 |
| HTlc@ftl- pH 5.5 | 0,55±0,09 | 17±7 | 0,75 | 0,019±0,006 | 0,42 | 8,6±0,7 | 0,92 |

Tuttavia, al fine di indagare quale tipo di diffusione controlli il sistema occorre applicare modelli semi-empirici al sistema di dati. In particolare sono stati studiati i modelli di Korsmeyer-Peppas e di Peppas-Sahlin. Nel primo modello il valore di n è utilizzato per capire il meccanismo di rilascio ed è descritto dall'equazione seguente (7):

$$Q_t = K_{KP} t^n \quad (7)$$

dove Q_t è la quantità di molecola rilasciata nel tempo t , K_{KP} è la costante di velocità di rilascio e n è l'esponente di rilascio. Il meccanismo di rilascio ha differenti modi di diffusione che dipendono dal valore di n : a) $n < 0,45$ si ha una diffusione di tipo Fickiano, b) $0,45 < n < 1$ si ha una diffusione di tipo anomala (combinazione di diffusione e *swelling* della matrice), e c) $n \geq 1$ si ha una diffusione non-Fickiana.

Il secondo modello (Peppas-Sahlin) descritto dall'equazione 8:

$$Q_t = k_1 t^{0,45} + k_2 t^{0,90} \quad (8)$$

permette di determinare k_1 e k_2 che corrispondono alle costanti cinetiche Fickiane e alle costanti cinetiche di *swelling* della matrice. Se il rapporto $|k_1|/|k_2|$ è maggiore di 1 il rilascio del farmaco è principalmente determinato dalla diffusione di Fick, mentre se il rapporto è minore di 1 il rilascio è determinato dallo *swelling* della matrice.

Come mostrato in **Tabella 2**, il valore di R^2 sia per il campione HTlc@ftl in PBS a pH 5,5 sia per quello in PBS a pH 7,4 è maggiore di 0,90. Il valore di n in entrambi i campioni è compreso tra 0,45 e 1, indicante un tipo di diffusione anomalo (combinazione della diffusione di tipo Fickiano e di *swelling* della matrice).^[51,52] Tuttavia per il campione HTlc@ftl in PBS a pH 5,5 il valore di n è borderline (0,46), e per capire che tipo di meccanismo avviene realmente si osserva il rapporto tra le due costanti (modello di Peppas-Sahlin) che risulta essere di gran lunga superiore a 1 (82,5). Si può quindi

concludere che il meccanismo di rilascio per il campione HTlc@ftl in PBS a pH 5,5 è controllato prevalentemente dalla diffusione Fickiana. Il campione HTlc@ftl in PBS a pH 7,4 ha un valore di n di 0,57 e un rapporto tra le due costanti cinetiche maggiore di 1 (21,2). Entrambi questi parametri indicano che il rilascio della ftalocianina è controllato dalla diffusione di Fick anche per questo campione.

Tabella 2. Parametri e coefficienti di correlazione dei modelli cinetici non-empirici.

| Sample | Korsmeyer-Peppas $Q_t = K_{KP}t^n$ | | | Peppas-Sahlin $Q_t = k_1t^{0,45} + k_2t^{0,90}$ | | | |
|---------------------|---------------------------------------|-----------|-------|--|----------|-------|-------------|
| | K_{KP} | n | R^2 | k_1 | k_2 | R^2 | $ k_1/k_2 $ |
| HTlc@ftl- pH 7.4 | 5,5±1,3 | 0,57±0,05 | 0,97 | 6,7±1,4 | 0,3±0,2 | 0,95 | 21,2 |
| HTlc@ftl- pH 5.5 | 9,9±2,6 | 0,46±0,06 | 0,92 | 11,7±1,9 | -0,1±0,2 | 0,92 | 82,5 |

3.3.3. Sviluppo di specie reattive all'ossigeno (ROS)

La generazione di ROS indotte dall'irraggiamento della sospensione di nanoparticelle di HTlc caricate con la ftalocianina è stata valutata usando la 2,7-diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) come rivelatore chimico (probe). Con questo metodo, la molecola non fluorescente (DCF-DA) viene prima idrolizzata alla specie 2,7-diclorodiidrossifluoresceina (DCFH₂) e poi ossidata nella specie altamente fluorescente (DCF), come mostrato in **Figura 27**, che può essere rivelata attraverso la caratteristica banda di assorbimento a 500 nm, la cui intensità è proporzionale alla quantità di ROS sviluppata.

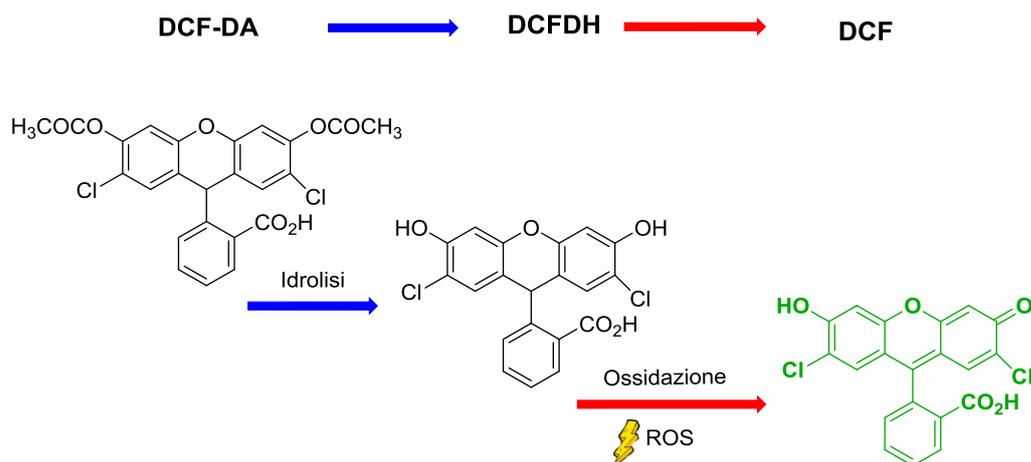


Figura 27. Idrolisi del probe non fluorescente (DCF-DA) a (DCFHD) e ossidazione del probe non fluorescente (DCFHD) al probe fluorescente (DCF) per sviluppo di ROS.

Gli spettri di assorbimento della DCF generata a diversi tempi di irraggiamento delle HTlc@NCTD sono riportate in **Figura 28**. Come si può vedere la quantità di ROS generata aumenta proporzionalmente al tempo di irraggiamento.

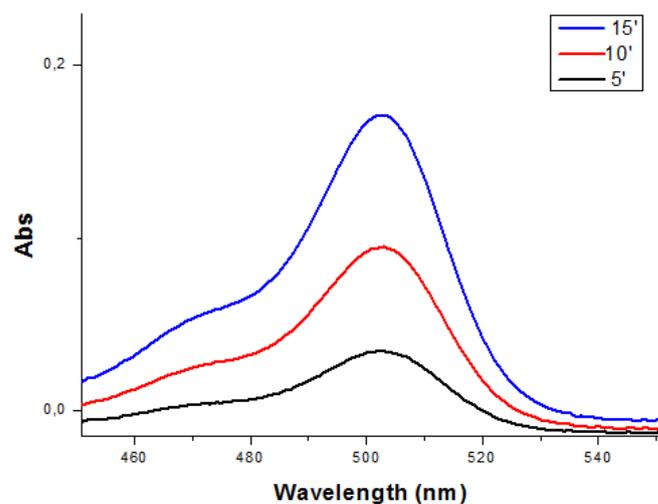
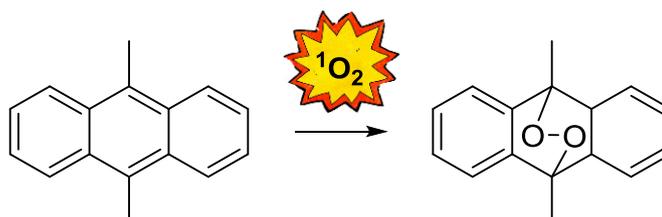


Figura 28. Spettro di assorbimento della DCF del campione HTlc@ftl.

3.3.4. Sviluppo di ossigeno di singoletto (1O_2)

La generazione di 1O_2 , stato eccitato dell'ossigeno molecolare, indotta dall'irraggiamento della soluzione acquosa di HTlc@ftl, è stata determinata con il 9,10-dimetilantracene (DMA), solubilizzato in dimetilformammide (DMF) andando ad osservare la eventuale diminuzione nel tempo del picco di assorbimento del DMA a 378 nm, dovuta all'ossidazione del DMA nella sua forma di endoperossido (**Figura 29**).

9,10-Dimethyl antracene



9,10-Dimethyl antracene
endoperoxide

Figura 29. Ossidazione del DMA nella sua forma di endoperoxido.

Come mostrato in **Figura 30a**, la molecola di ftl non sembra in grado di produrre $^1\text{O}_2$; infatti già dopo un minuto di irraggiamento la produzione di $^1\text{O}_2$ tende a zero. Questo dato è in accordo con dati di letteratura dove si riporta che la resa quantica di ossigeno di singoletto delle ftalocianine è molto influenzata dalla presenza e dalla natura del metallo coordinato agli atomi di azoto (**Figura 30b**).^[47]

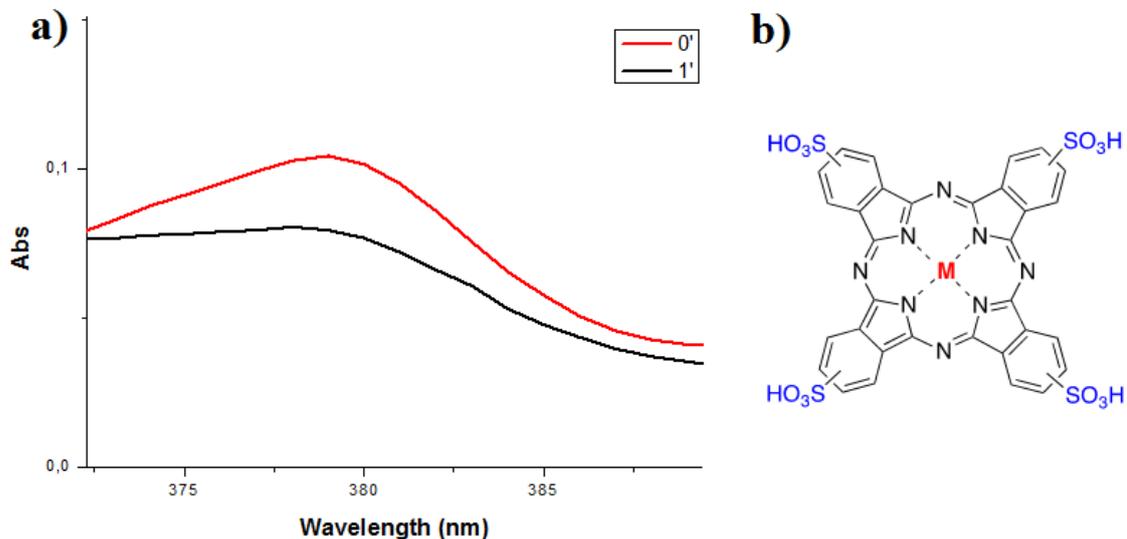


Figura 30. Andamento dell'ossigeno di singoletto nel campione HTlc@ftl (**a**) e struttura della ftalocianina tetrasulfonata (**b**).

In particolare, Kuznetsova ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che passando da ftl ad ftl-Al, la resa quantica di $^1\text{O}_2$, passa da 0,11 a 0,38.

3.4. Analisi della citotossicità in vitro

L'efficacia dell'approccio terapeutico proposto è stata valutata su due linee cellulari tumorali di derivazione tissutale, le cellule MCF7 di tumore mammario e la linea cellulare HTC116 di tumore del colon retto, misurando la citotossicità in vitro della combinazione di HTlc@NCTD e HTlc@ftl mediante il test colorimetrico dell'MTT. Il protocollo sperimentale seguito è riportato in **Figura 31** e prevede che a 24 h dalla semina le cellule vengano trattate ed incubate con i diversi campioni per successive 24 h e quindi irradiate per due ore con una lampada alogena a 500 W (fluenza di 158.4 J/cm²). Una volta terminato l'irraggiamento le cellule vengono incubate al buio per 24 h prima di effettuare il test di vitalità cellulare.

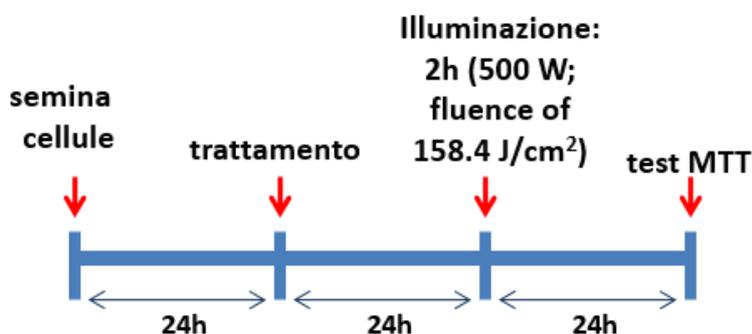


Figura 31. Schema che riassume il protocollo sperimentale per l'analisi della citotossicità in vitro.

In particolare, le cellule sono state trattate con i composti sotto elencati e loro combinazioni al fine di poter definire il contributo delle HTlc sull'efficacia del trattamento e l'eventuale effetto sinergico legato alla combinazione dei due farmaci.

- Ftl
- NCTD
- HTlc@Ftl
- HTlc@NCTD
- Ftl - NCTD
- HTlc@Ftl - HTlc@NCTD

Per chiarezza, nei grafici è stata omessa la curva di tossicità relativa alle sole HTlc, che tuttavia non hanno mostrato alcuna tossicità nei confronti delle cellule alle concentrazioni considerate.

Come si può osservare dalla **Figura 32**, sia NCTD che ftl sono più potenti su entrambe le linee cellulari quando caricate sulle HTlc rispetto alla somministrazione dei composti liberi. I valori di IC_{50} ottenuti in seguito al test MTT e riportati in **Tabella 3** sembrano confermare che la quantità di composto necessaria ad inibire la crescita delle cellule del 50% è minore per i composti caricati sulle HTlc rispetto a quelli liberi.

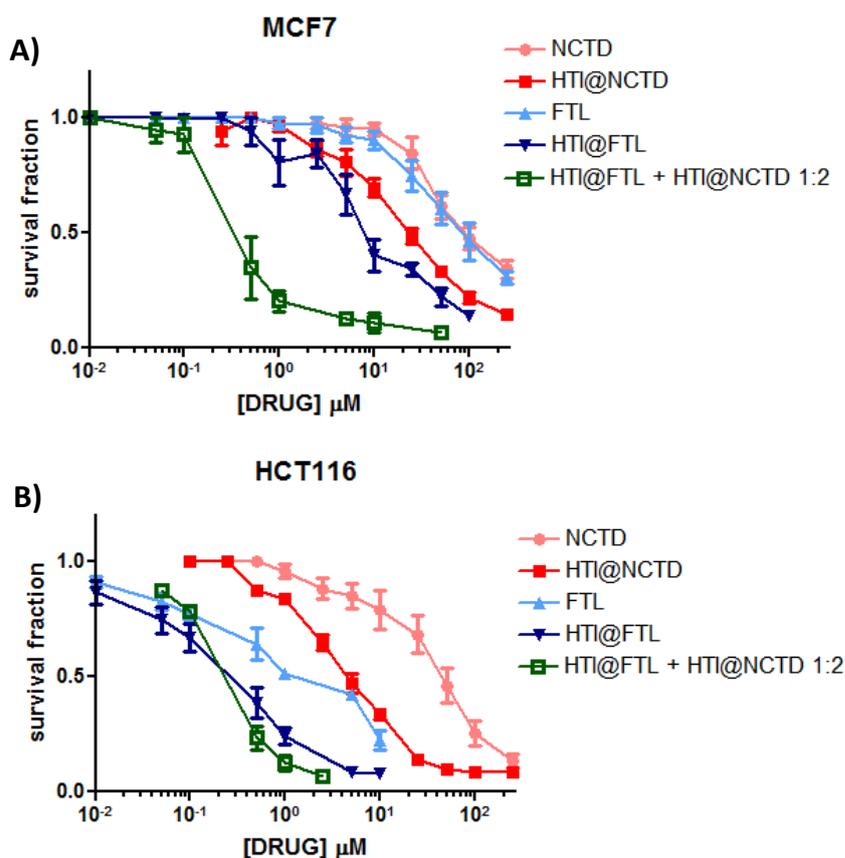


Figura 32. Curve del fattore di sopravvivenza delle cellule MCF7 (A) e HCT116 (B).

Inoltre, analisi preliminari eseguite sui dati ottenuti allo scopo di valutare l'indice di combinazione secondo i criteri stabiliti da Chou e Talalay, che nelle combinazioni di farmaci identificano un effetto additivo per $C.I. = 1$, un effetto sinergico per $C.I. < 1$ e un effetto antagonista per $C.I. > 1$, mostrano che la combinazione HTL@FTL:HTL@NCTD (1:2) ha un effetto sinergico su entrambe le linee cellulari, anche se in modo più efficace sulle cellule MCF7 rispetto alle cellule HCT116, nelle quali alle frazioni di mortalità più basse si osserva un certo grado di antagonismo, come mostrato in **Figura 33**.

Tabella 3. Valori IC₅₀ dei vari composti.

| IC ₅₀ (μM) | MCF7 | HCT116 |
|------------------------|---------------|---------------|
| FTL | 69.38 ± 11.00 | 14.03 ± 2.45 |
| HTL@FTL | 0.624 ± 0.150 | 1.56 ± 1.28 |
| NCTD | 92.66 ± 15.20 | 46.53 ± 11.54 |
| HTL@NCTD | 23.75 ± 2.86 | 4.72 ± 0.41 |
| HTL@FTL:HTL@NCTD (1:2) | 0.34 ± 0.05 | 0.28 ± 0.07 |

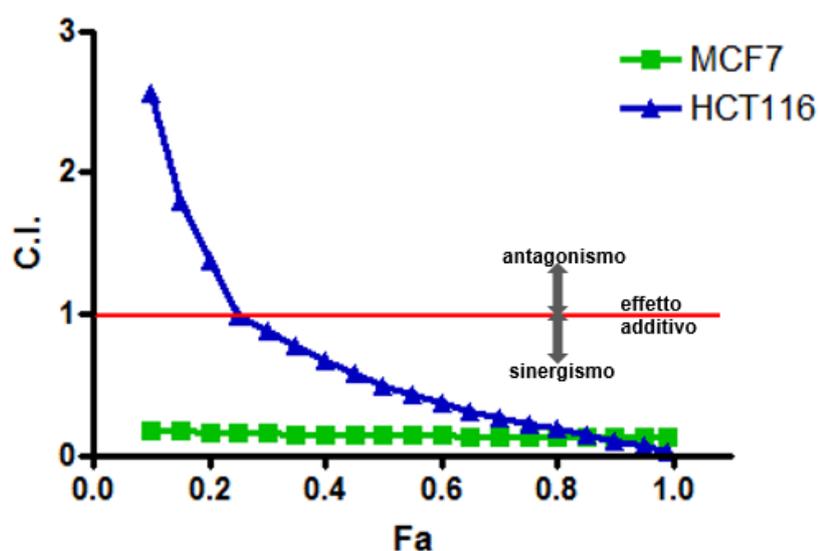


Figura 33. Grafico sull'indice di combinazione (C.I.) per la combinazione HTLc@NCTD:HTLc@ftl (2:1) per le cellule MCF7 e HCT116.

Siccome l'intercalazione della ftalocianina tetrasulfonata (ftl) all'interno delle idrotalciti ha fatto riscontrare diversi problemi sia per quanto riguarda la cinetica di rilascio (la molecola viene rilasciata precocemente ed in modo non controllato, **Figura 26**), sia per quanto riguarda la scarsa generazione di ossigeno di singoletto, abbiamo pensato di intercalare all'interno delle HTLc un secondo tipo di ftalocianina, l'alluminio ftalocianina tetrasulfonata (ftl-Al).

3.5. Idrotalciti con alluminio ftalocianina (HTlc@ftl-Al)

3.5.1. Sintesi e caratterizzazione

La sintesi e l'intercalazione è stata effettuata nelle stesse condizioni utilizzate per la ftl ed anche la formula ottenuta è risultata molto simile (eq. 9):



Anche in questo caso si può notare la presenza dell'anione carbonato. Ciononostante la quantità di ftl-Al per grammo di HTlc è risultata soddisfacente (238 mg).

La caratterizzazione delle HTlc@ftl-Al è avvenuta tramite TG, come mostrato in **Figura 34**. Non si notano differenze dalla curva TG che è stata eseguita per il campione HTlc@ftl. La curva, eseguita in un range di temperatura tra 0 e 1200 °C, mostra una perdita totale in peso del 45,8%. Si possono notare, anche qui, due regioni tra 80 e 250 °C indicanti la perdita di acqua adsorbita sulla superficie, la perdita di acqua co-intercalata, la decomposizione dell'anione carbonato e la perdita di acqua relativa alla deidrossilazione degli strati brucitici. L'altro flesso tra 300 e 450 °C rappresenta la perdita dell'anione intercalato, in questo caso della molecola fotosensibile. Anche in questo caso la curva non arriva a zero poiché la parte inorganica, cioè gli ossidi dei metalli ZnO e Al₂O₃, non riescono a bruciare a quelle temperature.

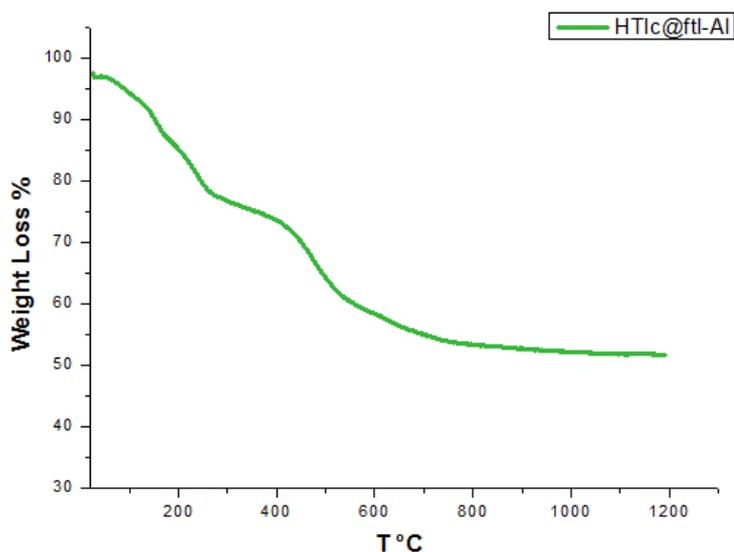


Figura 34. Curva TG del campione HTlc@ftl-Al. (Condizione operativa: riscaldamento di 10 °C/minuto, flusso di aria).

L'analisi a Raggi-X è ancora in corso ma non essendoci differenze sostanziali nel rapporto molare tra i metalli (misurato tramite ICP) e nelle curve TGA si suppone che il campione si sia intercalato allo stesso modo.

3.5.2. Studio dei rilasci

L'analisi dei rilasci ha mostrato che sia in PBS a pH 5,5 che a pH 7,4, circa il 20% di alluminio ftalocianina viene rilasciato nell'arco dei 7 giorni di analisi (**Figura 35**). Il profilo di rilascio è totalmente differente da quello delle HTlc@ftl; infatti, mentre queste ultime rilasciavano il 100% della molecola fotosensibile nell'arco dei sette giorni, le HTlc@ftl-Al rilasciano il composto molto più lentamente ed in modo controllato. In particolare, sia a pH 7,4 che a pH 5,5 la ftl-Al viene rilasciata fino ad un massimo del 20% durante il periodo considerato. Come è noto, in terapia fotodinamica l'agente fotosensibile induce la formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (specie citotossiche) attraverso un trasferimento energetico all'ossigeno circostante, a seguito di irraggiamento con luce a una specifica lunghezza d'onda. Pertanto, non è necessario che la ftalocianina venga rilasciata per poter indurre la formazione delle sostanze (ROS) che sono responsabili della morte cellulare. Al contrario, il fatto che la ftl permanga intercalata nelle HTlc la protegge da eventuali fenomeni di photo-bleaching riducendo inoltre la foto-tossicità sistemica. Alla luce di queste considerazioni, il fatto che dopo 7 giorni solo il 20% di agente fotosensibile sia stato rilasciato rappresenta un dato molto incoraggiante per l'applicazione di questi materiali in terapia fotodinamica.

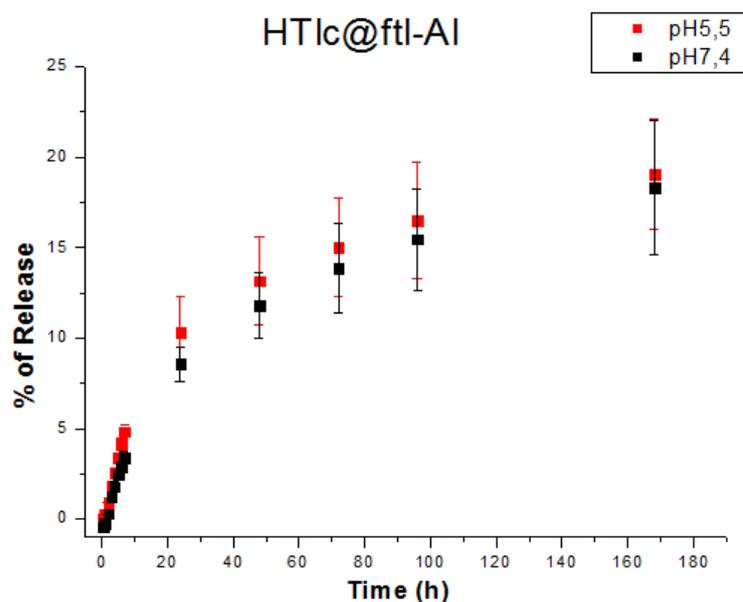


Figura 35. Studio dei rilasci delle HTlc@ftl-Al in PBS a pH 7,4 (curva nera), e a pH 5,5 (curva rossa).

Anche per questo campione sono stati studiati i modelli empirici e semi-empirici per valutare il meccanismo di rilascio della ftalocianina. I risultati ottenuti sono molto simili a quelli del campione HTlc@ftl.

Infatti, come si può vedere in **Tabella 4**, il valore di R^2 maggiore per entrambi i campioni è stato ottenuto dal modello Higuchi (0,98 pH 7,4 e 0,96 pH 5,5). Per questo motivo si può concludere che il meccanismo di rilascio della ftalocianina è controllato dalla diffusione.

Tabella 4. Parametri e coefficienti di correlazione dei modelli cinetici empirici.

| Sample | Zero-Order $Q_t = K_0 t + C_0$ | | | First-Order $Q_t = Q_0 \exp(-k_f^t)$ | | Higuchi $Q_t = k_H^2 \sqrt{t} + C_H$ | |
|------------------------|-----------------------------------|-------|-------|---|-------|---|-------|
| | K_0 | C_0 | R^2 | K_f | R^2 | K_H | R^2 |
| HTlc@ftl-Al- pH 7.4 | 0,15±0,02 | 3±1 | 0,86 | 0,021±0,007 | 0,41 | 2,1±0,1 | 0,98 |
| HTlc@ftl-Al- pH 5.5 | 0,12±0,02 | 3±1 | 0,80 | 0,023±0,009 | 0,29 | 1,7±0,1 | 0,96 |

In **Tabella 5**, i modelli semi-empirici mostrano il tipo di diffusione. Il valore di R^2 è in entrambi i campioni maggiore di 0,95. Il valore di n è 0,54 per il campione HTlc@ftl-Al in PBS a pH 7,4 e 0,47 per HTlc@ftl-Al in PBS a pH 5,5. Per entrambi i campioni, quindi, il meccanismo di rilascio è controllato prevalentemente dalla diffusione di Fick, confermato inoltre dal rapporto tra le due costanti cinetiche nel modello di Peppas-Sahlin che è molto più grande di 1.

Tabella 5. Parametri e coefficienti di correlazione dei modelli cinetici non-empirici.

| Sample | Korsmeyer-Peppas | | | Peppas-Sahlin | | | |
|------------------------|-------------------|-----------|-------|-----------------------------------|--------------|-------|-------------|
| | $Q_t = K_{KP}t^n$ | | | $Q_t = k_1t^{0,45} + k_2t^{0,90}$ | | | |
| | K_{KP} | n | R^2 | k_1 | k_2 | R^2 | $ k_1/k_2 $ |
| HTlc@ftl-Al- pH 7.4 | 1,6±0,3 | 0,54±0,04 | 0,97 | 1,9±0,3 | 0,07±0,04 | 0,96 | 26,9 |
| HTlc@ftl-Al- pH 5.5 | 1,8±0,3 | 0,47±0,04 | 0,96 | 2,1±0,3 | -0,001±0,003 | 0,96 | 2030,8 |

3.5.3. Sviluppo di specie reattive all'ossigeno (ROS)

La generazione di ROS indotte dall'irraggiamento della sospensione di nanoparticelle di HTlc caricate con l'alluminio ftalocianina è stata valutata usando la 2,7-diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) come rivelatore chimico (probe). Anche in questo caso, la molecola non fluorescente (DCF-DA) viene prima idrolizzata alla specie 2,7-diclorodiidrofluoresceina (DCFH₂) e poi ossidata nella specie altamente fluorescente (DCF), come detto sopra, che può essere rivelata attraverso la caratteristica banda di assorbimento a 500 nm, la cui intensità è proporzionale alla quantità di ROS sviluppata. In **Figura 36**, si può vedere come anche le HTlc@ftl-Al generano una quantità di ROS sempre maggiore in funzione del tempo di irraggiamento.

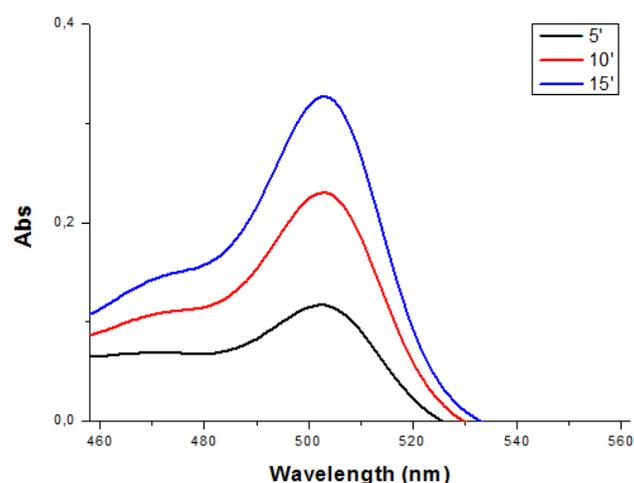


Figura 36. Spettro di assorbimento della DCF del campione HTlc@ftl-Al.

3.5.4. Sviluppo di ossigeno di singoletto (1O_2)

La generazione di 1O_2 , stato eccitato dell'ossigeno molecolare, indotta dall'irraggiamento della soluzione acquosa di HTlc@ftl-Al, è stata determinata con il 9,10-dimetilantracene (DMA), solubilizzato in dimetilformammide (DMF). Si è osservata la diminuzione nel tempo del picco di assorbimento del DMA a 378 nm, dovuta all'ossidazione del DMA nella sua forma di endoperossido. In questo caso, si osserva una diminuzione del picco a 378 nm dipendente dal tempo d'irraggiamento (**Figura 37**), contrariamente a quanto evidenziato nel campione HTlc@ftl dove si spegneva dopo un minuto.

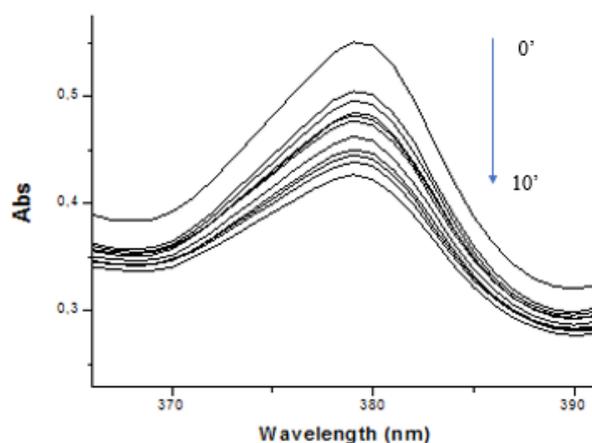


Figura 37. Andamento dell'ossigeno di singoletto nel campione HTlc@ftl-Al.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi è descritta la sintesi e intercalazione di idrotalciti Zn/Al (HTlc) con un farmaco antitumorale, la norcantaridina (NCTD) e una molecola fotosensibile, la ftalocianina tetrasulfonata (ftl), che viene utilizzata nel trattamento fotodinamico dei tumori. Sia la NCTD che la ftl sono state intercalate efficacemente all'interno delle HTlc ottenendo nanoparticelle di dimensioni intorno ai 200 nm. Lo studio dei rilasci sul campione HTlc@NCTD in PBS a pH 7,4 ha dimostrato che, in tali condizioni, il farmaco non viene rilasciato; al contrario, in ambiente acido di PBS pH 5,5, il composto viene rilasciato completamente nell'arco di pochi minuti a causa della dissoluzione della matrice. Lo studio del profilo ed il meccanismo di rilascio della ftalocianina dalle HTlc ha mostrato che sia a pH fisiologico (7,4) sia in ambiente acido (pH 5,5) l'agente fotosensibile viene rilasciato precocemente ed in maniera incontrollata. Il meccanismo di rilascio del farmaco è stato analizzato secondo modelli matematici empirici e semi-empirici, dimostrando che il rilascio è controllato dalla diffusione Fickiana. Inoltre, le analisi effettuate per valutare la capacità di HTlc@ftl di produrre ROS, ha rivelato che la quantità di ROS generata può essere controllata/modulata in base al tempo di irraggiamento. Al contrario, l'analisi della produzione di ossigeno di singoletto (1O_2) mostra che la ftl non è in grado di produrre quantità significative di 1O_2 , anche in accordo con precedenti dati di letteratura. Infine, la citotossicità di HTlc@ftl e HTlc@NCTD è stata studiata su un panel di linee cellulari tumorali, valutando la loro efficacia sia quando usati singolarmente che in combinazione. I risultati da noi prodotti dimostrano che entrambi i composti, una volta caricati sulle HTlc, sono più potenti dei prodotti liberi su entrambe le linee cellulari considerate: MCF7 (cellule del tumore del seno) e HCT116 (cellule del tumore al colon retto). Inoltre, i dati ottenuti rivelano che trattando le cellule con una combinazione 2/1 di HTlc@NCTD/HTlc@ftl rispettivamente, si osserva un effetto citotossico sinergico sulle MCF7 che raggiunge un IC_{50} di 0,34 μM ; tale effetto si osserva anche sulla linea di tumore del colon retto HCT116 ma sulle frazioni a mortalità più elevata (IC_{50} 0,28 μM).

Poiché i dati di rilascio e la produzione di ossigeno di singoletto delle HTlc@ftl non sono stati particolarmente incoraggianti, ma tenuto conto dei promettenti risultati ottenuti in vitro, si è deciso di utilizzare un secondo agente fotosensibile per l'intercalazione nelle HTlc. In particolare, anziché la ftalocianina tetrasulfonata, è stata utilizzata l'alluminio ftalocianina tetrasulfonata (ftl-Al). Questa ha mostrato un profilo di rilascio più controllato

nel tempo, secondo la diffusione di Fick, rilasciando circa il 20% della molecola nell'arco di 7 giorni e una generazione di $^1\text{O}_2$ dipendente dal tempo di irraggiamento.

In generale, dai risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi si evince che le idrotalciti Zn/Al possano funzionare efficacemente per il trasporto di NCTD e flt aumentando l'efficacia dei singoli composti nei confronti di diversi tipi di tumore. In particolare, l'uso di questo approccio per il trattamento combinato (chemio/foto-terapico) di alcune tipologie di tumore potrebbe portare ad un miglioramento dell'aspettativa di vita dei pazienti oncologici.

In futuro, si prevede di (i) trovare un metodo alternativo e più sensibile per studiare il profilo di rilascio della norcantaridina; (ii) di studiare le HTlc@ftl-Al dal punto di vista biologico per determinare la loro tossicità ed efficacia su linee cellulari tumorali e (iii) di verificare l'eventuale sinergismo con le HTlc@NCTD per un utilizzo in terapia multimodale.

5. Parte sperimentale

5.1. Idrotalciti (HTlc) Zn/Al

5.1.1. Sintesi

Le idrotalciti Zn/Al sono state sintetizzate con il metodo della doppia microemulsione acqua in olio. In questo tipo di microemulsioni si usano molecole surfactanti cationiche che evitano la complicazione di dover eliminare il tensioattivo dalle particelle ottenute e inoltre permettono di ottenere HTlc in forma bromuro, un buon precursore per intercalare altre specie anioniche, anche di larghe dimensioni, mediante scambio ionico.

Le due microemulsioni sono di identica composizione ma con differente fase acquosa:

- a) - bromuro di cetiltrimetiammonio (CTABr) come surfactante (12,5 g, 0,034 mol);
 - n-butanolo come co-surfactante (15,5 mL, 0,169 mol);
 - isottano come fase oleosa (36,2 mL, 0,219 mol);
 - soluzione salina di metalli zinco (0,4 M) in forma di $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e alluminio (0,125M) in forma $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ come fase acquosa;
- b) - bromuro di cetiltrimetilammonio (CTABr)
 - n-butanolo
 - isottano
 - soluzione di ammoniaca (1,25 M) come fase acquosa.^[10]

Esse vengono preparate in due palloni diversi e lasciate sotto agitazione per circa 15 minuti. Quando diventano trasparenti, la microemulsione **b** viene aggiunta alla **a** e vengono lasciate sotto agitazione in un bagno d'olio a 70 °C per 15 h circa.

Successivamente, il precipitato ottenuto viene raccolto per centrifugazione a 12000 rpm per 5 minuti (centrifuga Allegra 64R, Beckman Coulter) e viene lavato più volte con una miscela di cloroformio/etanolo 1:1 v/v (3x30 mL) e con acqua decarbonata (5x30 mL). Si lascia, infine asciugare il precipitato in stufa a 60 °C per un'intera notte ottenendo una polvere di colore bianco (**Figura 38**).

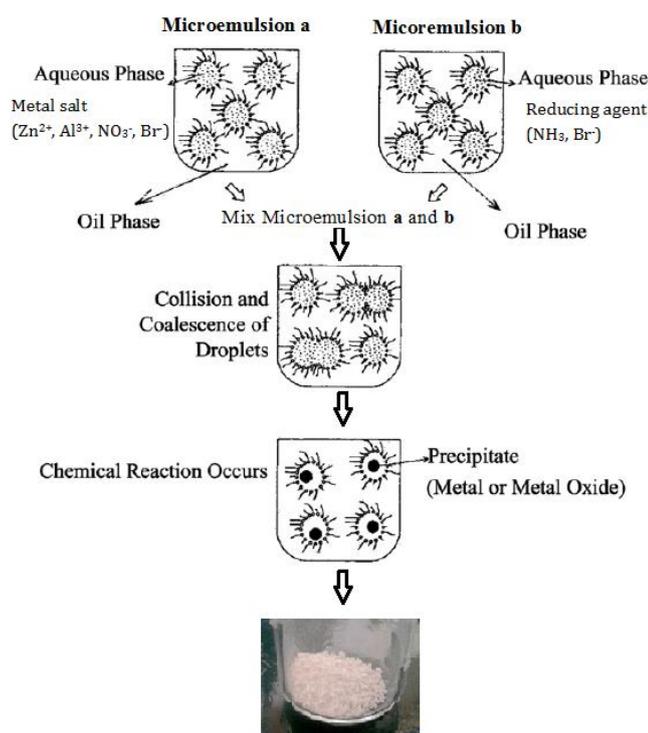


Figura 38. Tecnica di microemulsione utilizzata per sintetizzare le HTlc.

5.1.2. Caratterizzazione HTlc

La morfologia e le dimensioni delle idrotalciti sono state studiate tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) Philips XL30 che si basa sul principio dello scattering degli elettroni quando colpiscono la soluzione di nanoparticelle. Una gocciolina della dispersione, sciolta in acqua, acetone o una miscela di metanolo/cloroformio 1:1, è stata depositata su un supporto e il solvente è stato lasciato evaporare a temperatura ambiente. Il campione è stato opportunamente ricoperto da uno strato di oro.

La diffrattometria a raggi-X in polvere è stata eseguita con un dispositivo Philips X'PERT PRO MPD operante a 40 kV e 40 mA, un passo di 0,0170 di grado 2θ e un intervallo di scansione di 20 secondi utilizzando la radiazione $Cu-K\alpha$ e un detector X'Celerator. L'analisi termogravimetrica è stata fatta con un apparato Netzsch STA 449C in flusso di aria e un aumento di temperatura di 10 °C al minuto.

L'analisi dei metalli è stata eseguita tramite spettrometro di emissione ottico accoppiato induttivamente al plasma utilizzando soluzioni preparate dissolvendo i campioni in HNO_3 concentrato e diluiti appropriatamente.

5.2. Idrotalciti con norcantaridina

5.2.1. Sintesi

In un pallone da 50 mL vengono aggiunti 57 mg di norcantaridina (NCTD) in polvere (0,34 mmol), 3,4 mL di acqua decarbonata e 0,7 mL di idrossido di sodio (1 M) per ottenere la relativa forma aperta carica negativamente e quindi adatta all'intercalazione.

Una volta solubilizzata, si aggiungono 0,34 mmol di idrotalciti bianca e i restanti 3,4 mL di etanolo. La soluzione di acqua/etanolo deve essere in rapporto 1:1 v/v a 0,05 M. Tutta la reazione va condotta sotto costante flusso di azoto per evitare che gli ioni carbonato si intercalino al posto della NCTD e va lasciata per due giorni a circa 50 °C sotto agitazione. Il rapporto molare tra $\text{NCTD}^-/\text{Br}^-$ è 1:1.

Una volta terminata la reazione, l'emulsione viene lavata mediante centrifugazioni successive (centrifuga Allegra 64R, Beckman Coulter) con acqua decarbonata (2x30 mL) sempre sotto azoto e con i seguenti parametri:

- rotore: F0650
- tempo: 5 minuti
- temperatura: 25 °C
- ACC/DEC: 7
- rpm: 12000.

Si lascia infine asciugare il precipitato in stufa a 60 °C in modo da ottenere una polvere di colore bianco (**Figura 39**). Il campione è stato identificato con il nome HTlc@NCTD_2.



Figura 39. Idrotalciti con intercalata la Norcantaridina.

È bene sottolineare che la reazione deve essere condotta sotto costante flusso di azoto per garantire la massima efficienza di loading. Infatti, in una precedente preparazione (batch HTlc@NCTD_1) ottenuto utilizzando una miscela acqua/etanolo 1:1 v/v 0,005 M ed un rapporto molare tra NCTD⁻/Br⁻ di 1:2 ma in assenza di flusso costante di N₂, sono state ottenute nanoparticelle contenenti una elevata quantità di ioni carbonato. Pertanto, a meno di diverse specifiche, tutte le sperimentazioni riportate in seguito sono state effettuate sul batch HTlc@NCTD_2.

5.2.2. Caratterizzazione

I campioni ottenuti sono stati studiati tramite Raggi-X con un diffrattometro per polveri Philips X'PERT PRO MPD operante a 40 kV e 40 mA, un passo di 0,017 di grado 2 θ , e un intervallo di scansione di 20 secondi, utilizzando la radiazione Cu-K α e un detector X'Celerator. L'analisi termogravimetrica (TGA) è stata eseguita con un apparato Netzsch STA 449C in flusso di aria e un tasso di riscaldamento di 10°C al minuto. L'analisi dei metalli è stata eseguita con uno spettrometro di emissione ottica accoppiato induttivamente al plasma (ICP-OES) Varian 700-ES utilizzando soluzioni preparate dissolvendo i campioni in HNO₃ concentrato e diluiti appropriatamente.

5.2.3. Rilasci

Per valutare il rilascio del principio attivo, le HTlc@NCTD_2 sono state sospese in PBS a pH 7,4, per simulare le condizioni fisiologiche, e mantenute a 37 °C per tempi diversi. Lo stesso esperimento è stato ripetuto utilizzando PBS a pH 5,5 per simulare il pH dell'ambiente tumorale. Una soluzione di 1,25 mg/mL di HTlc@NCTD_2, sciolte in PBS a pH stabilito, è stata inserita all'interno di una membrana di acetato di cellulosa con cut-off 12-14 KDa che è stata poi immersa in 6 mL di PBS al pH scelto (**Figura 40**).

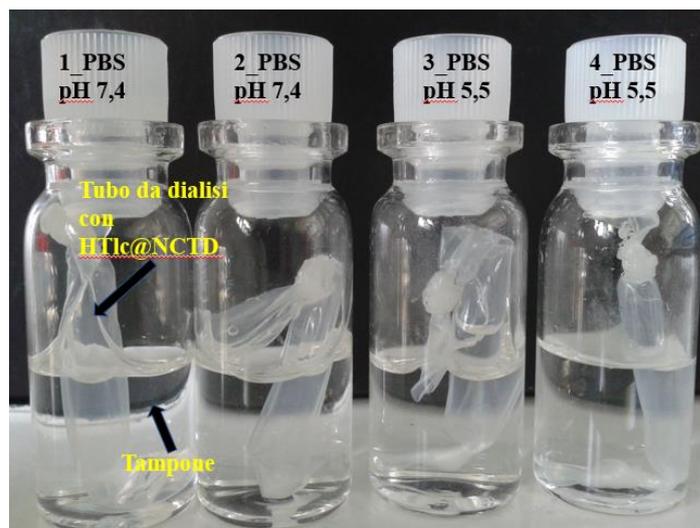


Figura 40. Campioni di HTlc@NCTD_2 per studio dei rilasci in PBS a pH 7,4 e a pH 5,5.

Ad intervalli stabiliti, 1 mL della soluzione in cui sono state immerse le membrane è stata prelevata e sostituita con tampone fresco (1 mL). Ogni prelievo è stato poi analizzato tramite risonanza magnetica (NMR). Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian (500 MHz) ed è stato utilizzato come solvente per gli esperimenti l'acqua deuterata (D₂O) al 10%. I valori di chemical shift (δ) del protone sono assegnati in riferimento ai valori di chemical shift dei composti residui non deuterati dei solventi NMR ($\delta = 4,6$ ppm per D₂O e $\delta = 7,26$ ppm per CHCl₃ etc.). Per dimostrare la linearità sono state preparate 4 soluzioni acquose (10% in D₂O) di saccarosio a concentrazione nota (1, 10, 100, 400 mM). Di queste quattro soluzioni è stato eseguito lo spettro ¹H-NMR e il PRESAT per eliminare il segnale dell'H₂O a circa 4,6 ppm. Prima di eseguire l'esperimento di PRESAT sono stati misurati: il transmitter offset (tof), il tempo di rilassamento longitudinale (T1), il 90° pulse-width (pw90), calcolato come $pw90 = \frac{pw180 + \frac{pw360}{4}}{2}$, e il delay (d1) che corrisponde a cinque volte il T1. Successivamente è stato acquisito un PRESAT con i parametri ottenuti precedentemente e dall'integrale di un picco noto del saccarosio è stata determinata la concentrazione reale, in modo da ottenere una retta con l'asse y [concentrazione misurata] e l'asse x [concentrazione reale]. Dopo aver dimostrato la linearità è stato acquisito lo spettro dello standard della norcantaridina sciolta in PBS al pH scelto e sono stati rimisurati i vari parametri (tof, pw90, T1, d1). Questi ultimi sono stati utilizzati per acquisire gli spettri della norcantaridina ai vari intervalli, per poter infine calcolare la concentrazione e quindi la percentuale di rilascio del farmaco.

5.3. Idrotalciti con ftalocianina

5.3.1 Sintesi

In un pallone da 250 mL vengono inseriti 111,5 mg di ftalocianina tetrasulfonata (ftl), circa 50 mL di acqua decarbonata e 454 μ L di NaOH (1 M). Una volta solubilizzata, si aggiungono 0,454 mmol di idrotalciti e i rimanenti mL di acqua (63,4). La soluzione si lascia sotto agitazione a circa 50 °C per due giorni rigorosamente sotto flusso di azoto. Il rapporto molare tra $\text{ftl}^- / \text{Br}^-$ è di 1:4. Trascorse le 48 h, la soluzione viene lavata in centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter), con acqua decarbonata (3x30 mL) rispettando le seguenti condizioni:

- rotore: F0650
- tempo: 10 minuti
- temperatura: 25 °C
- ACC/DEC: 7
- rpm: 18000.

Si lascia, infine asciugare la soluzione in stufa a 60 °C ottenendo una polvere di colore blu (**Figura 41**). Il nome del campione è: HTlc@ftl.

La sintesi delle HTlc con alluminio ftalocianina tetrasulfonata (ftl-Al), con formula $\text{C}_{32}\text{H}_{16}\text{AlClN}_8\text{O}_{12}\text{S}_4$ è la stessa di quella riportata per la ftl. Il nome con cui è stato identificato questo campione è: HTlc@ftl-Al.

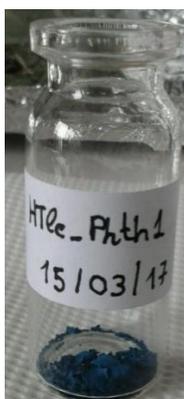


Figura 41. Idrotalciti con ftalocianina intercalata.

5.3.2. Caratterizzazione

I campioni ottenuti sono stati studiati tramite Raggi-X con un diffrattometro per polveri Philips X'PERT PRO MPD operante a 40 kV e 40 mA, un passo di 0,017 di grado 2θ , e un intervallo di scansione di 20 secondi, utilizzando la radiazione Cu-K α e un detector X'Celerator. L'analisi termogravimetrica (TGA) è stata eseguita con un apparato Netzsch STA 449C in flusso di aria e un tasso di riscaldamento di 10 °C al minuto. L'analisi dei metalli è stata eseguita con uno spettrometro di emissione ottica accoppiato induttivamente al plasma (ICP-OES) Varian 700-ES utilizzando soluzioni preparate dissolvendo i campioni in HNO₃ concentrato e diluiti appropriatamente.

5.3.3. Rilasci

Per valutare il rilascio del principio attivo, le HTlc@ftl sono state sospese in PBS a pH 7,4, per simulare le condizioni fisiologiche, e mantenute a 37 °C per tempi diversi. Lo stesso esperimento è stato ripetuto utilizzando una soluzione di PBS a pH 5,5 per simulare il pH tumorale. Sono stati preparati 6 campioni, 3 in PBS a pH 7,4 e 3 in PBS a pH 5,5 da 1,25 mg/mL, e inseriti in una membrana di acetato di cellulosa con cut-off 12-14 KDa. Questi campioni sono stati inseriti in 6 vial contenenti 6 mL di tampone a pH 7,4 e a pH 5,5 a seconda del campione (**Figura 42**).

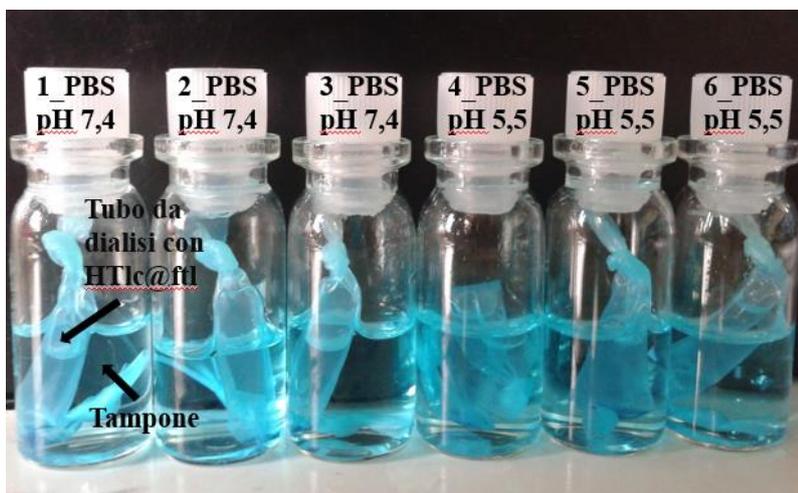


Figura 42. Campioni per studio dei rilasci in PBS a pH 7,4 e a pH 5,5.

Ad intervalli stabili, 1 mL della soluzione in cui sono state inserite le membrane è stata prelevata e sostituita con tampone fresco (1 mL). Ogni prelievo è stato analizzato tramite spettroscopia Uv-Vis mediante spettrofotometro Cary 100 (Agilent Technologies)

valutando l'assorbimento della ftalocianina a 620 nm circa e confrontandolo con una curva di calibrazione precedentemente ottenuta.

Lo stesso procedimento è stato fatto anche con l'altra ftalocianina (ftl-Al) sempre in PBS a pH 7,4 e a pH 5,5.

5.3.4. Specie reattive all'ossigeno (ROS)

Per determinare la generazione di specie reattive all'ossigeno è stata preparata una soluzione di ROS Probe contenente 500 μL di 2,7-diclorofluoresceinadiacetato (H_2DCFDA), sciolta in metanolo (1,09 mM). Questa è stata messa in due mL di NaOH (0,01 M) e lasciata agire per trenta minuti. Sono stati poi aggiunti 10 mL di tampone fosfato a pH 7,4. È stata preparata una cuvetta contenente 100 μL di soluzione acquosa di HTlc@ftl (1 mg/mL), 200 μL di H_2O mQ, 500 μL di tampone fosfato a pH 7,4 e 220 μL di ROS Probe. La soluzione così ottenuta è stata irradiata con una lampada al tungsteno (Philips; 300 W), a 40 cm di distanza, per 5, 10, 15 minuti ed è stato registrato lo spettro UV-visibile tra 220-800 nm andando a leggere la banda di assorbimento a 500 nm, la cui intensità è proporzionale alla quantità di ROS sviluppati.

5.3.5. Ossigeno di singoletto ($^1\text{O}_2$)

La generazione di ossigeno di singoletto è stata determinata usando il 9,10-dimetilantracene (DMA) come probe. Il DMA (1,5 mg) è stato solubilizzato in 2 mL di dimetilformammide (DMF), ottenendo una concentrazione di 3500 μM . Per ottenere una soluzione di 35 μM si è diluita la soluzione 1:100 con DMF (20 μM di soluzione di DMA in 1980 μM di DMF). È stata preparata una cuvetta in quarzo, di spessore 1 cm, contenente 100 μL di soluzione acquosa di HTlc@ftl (1mg/mL) e 600 μL di soluzione 35 μM di DMA+DMF, precedentemente preparata. La soluzione ottenuta è stata irradiata con lampada al tungsteno (Philips, 300 W), a 40 cm di distanza. Lo spettro di assorbimento è stato registrato tra 200-800 nm dopo ogni minuto di irradiazione, per 10 minuti, andando a leggere la diminuzione del picco di assorbanza a 378 nm per un tempo totale di dieci minuti.

5.4. Valutazione dell'effetto citotossico in vitro

L'effetto citotossico dei composti in esame è stato valutato mediante il test dell'MTT,^[53] un saggio colorimetrico che utilizza come indice di vitalità cellulare la capacità dell'enzima succinato deidrogenasi di ridurre il sale di tetrazolio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) a formazano (**Figura 43**), la cui quantità prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di $2,5 \times 10^4$ /mL (HCT116) e 4×10^4 /mL (MCF7) e dopo 24 h sono state trattate con concentrazioni crescenti di farmaco, comprese tra 0,01 e 50 mM per ftl e HTlc@ftl e tra 0,2 e 250 mM per NCTD e HTlc@NCTD e della loro combinazione in un rapporto fisso tra HTlc@ftl e HTlc@NCTD di 1:2. Dopo 24 h di incubazione a 37 °C, il terreno contenente i composti in esame è stato sostituito con PBS e le cellule sono state illuminate per 2 h con una lampada alogena (500 W; fluenza di 158.4 J/cm^2) al termine delle quali il PBS è stato sostituito con terreno di coltura. Dopo altre 24 h di incubazione a 37 °C a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 50 mL di MTT in PBS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro), 2 mg/mL e le piastre sono state incubate a 37 °C, in modo da consentire l'incorporazione e la metabolizzazione del colorante da parte delle cellule vitali. Dopo tre ore il surnatante è stato aspirato e i cristalli di formazano formatosi sono stati solubilizzati mediante l'aggiunta di 120 μL di DMSO in ogni pozzetto. I valori di densità ottica relativa ad ogni pozzetto sono stati determinati alla lunghezza d'onda di 570 nm, utilizzando un lettore spettrofotometrico di piastre (EL800 *Universal microplate reader*, Bio-Tek).

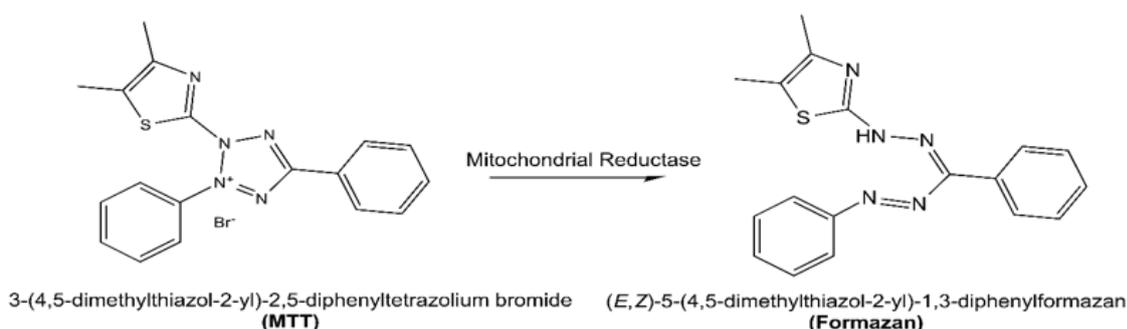


Figura 43. Riduzione del sale MTT a formazano.

Per calcolare il valore dell'IC₅₀, i valori ottenuti dal test MTT sono stati elaborati mediante il metodo descritto da Chou e Talalay,^[54] che si basa sul principio dell'effetto mediano della legge di azione di massa, utilizzando il software Calcsyn.

Riferimenti bibliografici

- [1] D. Peer, J. Karp, S. Hong, O. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 751–760.
- [2] W. C. W. Chan, *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 627–632.
- [3] S. Moghimi, A. Hunter, J. Murray, *FASEB J.* **2005**, 19, 311–330.
- [4] D. S. Williams, I. A. B. Pijpers, R. Ridolfo, J. C. M. van Hest, *J. Control. Release* **2017**, 259, 29–39.
- [5] S. Solaiman, Y. Yamauchi, J. Kim, J. Horvat, S. Dou, G. Alici, L. Ooi, B. Martinac, M. Shiddiky, V. Gopalan, et al., *Nanotechnol. Rev.* **2017**, 6, DOI 10.1515/ntrev-2016-0095.
- [6] S.-J. Choi, J.-H. Choy, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 5547–5554.
- [7] Z. P. Xu, G. Q. Lu, *Pure Appl. Chem.* **2006**, 78, 1771–1779.
- [8] R. Allmann, *Acta Crystallogr.* **1968**, 24, 972–977.
- [9] H. F. W. Taylor, *Mineral. Mag.* **1969**, 37, 338–342.
- [10] F. Bellezza, A. Cipiciani, U. Costantino, M. Nocchetti, T. Posati, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2009, 2603–2611.
- [11] T. Posati, *Nanomaterials in Biotechnology: From Hydroxalcalite-like Compounds to Gold Nanoparticles*, Università degli Studi di Perugia, **2010**.
- [12] A. I. Khan, D. O'Hare, *R. Soc. Chem.* **2002**, 12, 3191–3198.
- [13] V. Ambroggi, L. Perioli, M. Ricci, L. Pulcini, M. Nocchetti, S. Giovagnoli, C. Rossi, *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, 115, 405–415.
- [14] F. Bellezza, M. Nocchetti, T. Posati, S. Giovagnoli, A. Cipiciani, *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, 376, 20–27.
- [15] M. A. B. Francesca, C. Antonio, C. Umberto, M. Fabio, Quotadamo, *Colloid Polym. Sci.* **2006**, 285, 19–25.
- [16] J. Eastoe, M. J. Hollamby, L. Hudson, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, 128–130, 5–15.

- [17] J.-M. Oh, S.-J. Choi, S.-T. Kim, J.-H. Choy, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 1411–1417.
- [18] T. Posati, F. Bellezza, L. Tarpani, S. Perni, L. Latterini, V. Marsili, A. Cipiciani, *Appl. Clay Sci.* **2012**, *55*, 62–69.
- [19] F. Bellezza, A. Alberatni, M. Nocchetti, V. Marsili, A. Cipiciani, *Appl. Clay Sci.* **2014**, *101*, 320–326.
- [20] J.-M. Oh, S.-J. Choi, G.-E. Lee, S.-H. Han, J.-H. Choy, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1617–1624.
- [21] P. Qiu, S. Wang, M. Liu, H. Ma, X. Zeng, M. Zhang, L. Xu, Y. Cui, H. Xu, Y. Tang, et al., *BMC Cancer* **2017**, *17*, 55.
- [22] A. Khdair, Di Chen, Y. Patil, L. Ma, Q. P. Dou, M. P. V Shekhar, J. Panyam, *J. Control. Release* **2010**, *141*, 137–144.
- [23] P. Parhi, C. Mohanty, S. K. Sahoo, *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 1044–1052.
- [24] J. E. Chang, I. S. Yoon, P. L. Sun, E. Yi, S. Jheon, C. K. Shim, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, *140*, 49–56.
- [25] M. Chang, J. Wu, H. Liao, Y. Chen, C. Kuo, *Medicine (Baltimore)*. **2016**, *95*.
- [26] Y.-Z. Fan, J.-Y. Fu, Z.-M. Zhao, C.-Q. Chen, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int* **2007**, *6*, 72–80.
- [27] E. B. Yang, W. Y. Tang, K. Zhang, L. Y. Cheng, P. O. Mack, *Cancer Lett.* **1997**, *117*, 93–8.
- [28] D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *7*, DOI 10.1101/cshperspect.a026716.
- [29] P.-Y. Yang, M.-F. Chen, C.-H. Tsai, D.-N. Hu, F.-R. Chang, Y.-C. Wu, *Toxicol. Vitro.* **2010**, *24*, 766–775.
- [30] P.-Y. Yang, M.-F. Chen, Y.-H. Kao, D.-N. Hu, F.-R. Chang, Y.-C. Wu, *Toxicol. Vitro.* **2011**, *25*, 699–707.
- [31] S. Chen, P. Wan, W. Ding, F. Li, C. He, P. Chen, H. Li, Z. Hu, W. Tan, J. Li, *Int. J. Mol. Med.* **2013**, *32*, 43–50.
- [32] B. Shen, P. He, C. Shao, *PLoS One* **2013**, *8*, DOI 10.1371/journal.pone.0084610.

- [33] F. Peng, Y.-Q. Wei, L. Tian, L. Yang, X. Zhao, Y. Lu, Y.-Q. Mao, B. Kan, S. Lei, G.-S. Wang, et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2002**, *128*, 223–230.
- [34] R. K. Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380–387.
- [35] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.-L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 612–621.
- [36] D. Kharroubi Lakouas, D. Huglo, S. Mordon, M. Vermandel, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *18*, 236–243.
- [37] T. Ozdemir, Y. Lu, S. Kolemen, E. Tanriverdi-Ecik, E. Akkaya, *ChemPhotoChem* **2017**, *1*, 183–187.
- [38] M. A. Calin, S. V. Parasca, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **2006**, *8*, 1173–1179.
- [39] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24*, 259–268.
- [40] X. Li, S. Kolemen, J. Yoon, E. U. Akkaya, *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, DOI 10.1002/adfm.201604053.
- [41] P. G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Sala, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2007**, *21*, 293–302.
- [42] U. Chilakamarthi, L. Giribabu, *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 1–29.
- [43] C. S. Foot, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 659.
- [44] M. Niedre, M. S. Patterson, B. C. Wilson, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 382–91.
- [45] M. C. DeRosa, R. J. Crutchley, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233–234*, 351–371.
- [46] S. Banerjee, A. MacRobert, C. Mosse, B. Periera, S. Bown, M. Keshtgar, *The Breast* **2017**, *31*, 105–113.
- [47] N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, V. M. Derkacheva, O. L. Kaliya, E. A. Lukyanets, *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2003**, *7*, 147–154.
- [48] V. V Sokolov, E. F. Stranadko, N. N. Zharkova, R. I. Iakubovskaia, E. V Filonenko, T. A. Astrakhankina, *Vopr. Onkol.* **1995**, *41*, 134–8.

- [49] S. Duchi, S. Ramos-Romero, B. Dozza, M. Guerra-Rebollo, L. Cattini, M. Ballestri, P. Dambruoso, A. Guerrini, G. Sotgiu, G. Varchi, et al., *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12*, 1885–1897.
- [50] L. Perioli, T. Posati, M. Nocchetti, F. Bellezza, U. Costantino, A. Cipiciani, *Appl. Clay Sci.* **2011**, *53*, 374–378.
- [51] A. Rezaei, A. Nasirpour, H. Tavanai, M. Fathi, *Flavour Fragr. J.* **2016**, *31*, 442–447.
- [52] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, *Acta Pol. Pharm.* **2010**, *67*, 217–23.
- [53] C. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, P.A., Hursey, M.L., R. H. & B. M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, M.R., *Cancer Res.* **1988**, *48*, 589–601.
- [54] T. C. Chou, P. Talalay, *Adv. Enzyme Regul.* **1984**, *22*, 27–55.

RINGRAZIAMENTI

In quest'ultima pagina colgo l'occasione di ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato e sostenuto nel raggiungimento di questo traguardo.

Desidero innanzitutto ringraziare la mia relatrice, professoressa Mariafrancesca Fochi, per la disponibilità e cortesia che ha sempre dimostrato.

Voglio poi ringraziare il direttore dell'ISOF-C.N.R di Bologna, Dott. Roberto Zamboni, per avermi dato la possibilità di svolgere il tirocinio presso questo Istituto.

Un ringraziamento sincero va alle mie due correlatrici, Greta che con la sua professionalità, disponibilità e gentilezza mi ha fornito preziosi consigli, non solo per lo sviluppo di questa tesi ma anche per la mia futura carriera lavorativa e Claudia per avermi guidato pazientemente, consolato nei momenti più difficili e per avermi aiutato a crescere professionalmente. Siete state per me due fari che illuminano la scienza, semplicemente insostituibili!

Ringrazio di cuore Tamara per l'aiuto prezioso durante la stesura di questo lavoro e Annalisa e Giovanna per essere state sempre gentili e pazienti ad esaudire le mie richieste.

Un ringraziamento speciale va a Marzia Gariboldi (Università degli Studi dell'Insubria), senza la sua competenza e disponibilità a testare i miei preparati questo lavoro sarebbe stato incompleto.

Ringrazio inoltre Morena Nocchetti e il gruppo di Perugia (Università degli Studi di Perugia) per il loro essenziale contributo nelle caratterizzazioni dei composti.

Grazie a Paolo per avermi supportata e sopportata in questi ultimi mesi nella stesura di questo lavoro, e a Marco, Andrea, Anna, Alberto per aver reso entusiasmante, piacevole e sereno l'ambiente di lavoro.

Un ringraziamento particolare va a Betta, che da compagna di ufficio si è subito trasformata in amica, collaboratrice, preziosa consulente, dispensatrice di buoni consigli e buon umore.

Demetra, che posso ringraziare con due soli aggettivi: preziosa e unica; insieme a lei, a Giada e a Mara, ho studiato, trepidato prima di un esame ed esultato per il suo

superamento. Con loro ho vissuto la mia vita universitaria che è stata serena, piena di ricordi piacevoli e di momenti indimenticabili.

Grazie ad Arianna, che da coinquilina è diventata una sorella con cui confidarsi su tutte le vicissitudini universitarie e non.

Grazie di cuore a Caterina e a Chiara che, anche da lontano, mi hanno sempre sostenuta e incoraggiata.

Il ringraziamento più grande però va ai miei genitori che mi hanno dato la possibilità di studiare con serenità appoggiandomi in ogni mia scelta, aiutandomi e confortandomi nei momenti difficili.

