

**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

**Studio e preparazione di nano e  
microparticelle proteiche biocompatibili  
caricate con principi attivi per applicazioni in  
industrie farmaceutiche e cosmetiche**

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Michele Casappa

**RELATORE**

Prof.ssa Elisabetta Salatelli

**CORRELATORE**

Dott.ssa Giovanna Sotgiu



## Abstract

Negli ultimi decenni i settori farmaceutico e cosmeceutico hanno aumentato costantemente gli investimenti nella ricerca, in modo da garantire soluzioni terapeutiche ad uno spettro di patologie più ampio possibile. È emersa quindi la necessità di migliorare la veicolazione e l'efficacia dei farmaci, ovvero di sviluppare "Drug Delivery Systems" innovativi. Kerline srl si è affacciata a questo specifico mercato, proponendo l'utilizzo di un materiale cheratinoso, estratto da lana e solubile in ambiente acquoso, per la produzione di sistemi micro e nanoparticellari caricati con composti lipofili. Durante lo svolgimento del tirocinio, sono state ottimizzate le procedure di estrazione di due diverse forme di cheratina, una ad alto peso molecolare e una idrolizzata. Queste sono state poi caricate con alcuni principi attivi (acido azelaico,  $\alpha$ -tocoferolo acetato e tioconazolo) e le particelle ottenute sono state studiate tramite varie tecniche (DLS/PALS, SEM, Spettroscopia FTIR-ATR, UV-Vis e NMR). Complessivamente, le sospensioni colloidali ottenute sono dotate di buona stabilità sia nel tempo che dal punto di vista termico e mostrano quindi l'ottima compatibilità della cheratina con composti di varia natura.

In recent decades, the pharmaceutical and cosmeceutical sectors have steadily increased their investment in research, in order to provide therapeutic solutions for as broad a spectrum of diseases as possible. The need has therefore emerged to improve the delivery and effectiveness of medicines, i.e. to develop innovative "Drug Delivery Systems". Kerline srl has entered this specific market, proposing the use of a keratinous material, extracted from wool and soluble in watery environments, for the production of micro and nanoparticle systems loaded with lipophilic compounds. During the internship, the extraction procedures of two different forms of keratin, one high molecular weight and one hydrolyzed, were optimized. These were then loaded with certain active ingredients (azelaic acid,  $\alpha$ -tocopherol acetate and tioconazole) and the particles obtained were studied using various techniques (DLS/PALS, SEM, FTIR-ATR Spectroscopy, UV-Vis and NMR). Overall, the colloidal suspensions obtained have good stability both over time and thermally and therefore show the excellent compatibility of keratin with various compounds.



## **Abbreviazioni e acronimi**

**DLS:** *Dynamic Light Scattering*

**PALS:** *Phase Analysis Light Scattering*

**FTIR-ATR:** spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata

**SEM:** microscopia elettronica a scansione

**MK:** Cheratina ad alto peso molecolare

**MHK:** Cheratina idrolizzata

**API:** Principi attivi farmaceutici

**AA:** Acido azelaico

**VIT.E:**  $\alpha$ -Tocoferolo acetato (Vitamina E acetato)

**TCZ:** Tioconazolo



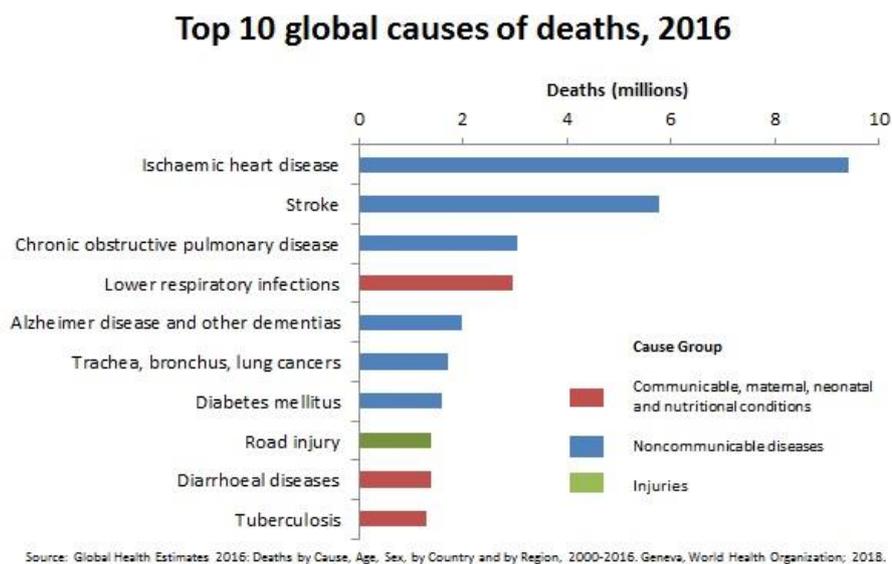
## **Indice**

<b>1. Introduzione</b>	<b>p. 1</b>
<b>2. Scopo della tesi</b>	<b>p. 13</b>
<b>3. Parte sperimentale</b>	<b>p. 15</b>
<b>3.1 Materiali e strumenti di analisi utilizzati</b>	<b>p. 15</b>
<b>3.2 Procedure di estrazione di cheratina</b>	<b>p. 16</b>
<b>3.3 Caratterizzazione delle cheratine estratte</b>	<b>p. 17</b>
<b>3.4 Procedure di preparazione di micro e nanoparticelle di cheratina MK</b>	<b>p. 18</b>
<b>3.5 Procedure di preparazione di micro e nanoparticelle di cheratina MHK</b>	<b>p. 20</b>
<b>3.6 Procedure di caratterizzazione dei DDS</b>	<b>p. 22</b>
<b>4. Discussione dei risultati</b>	<b>p. 25</b>
<b>4.1 Contesto</b>	<b>p. 25</b>
<b>4.2 Analisi di mercato preliminare</b>	<b>p. 27</b>
<b>4.3 Procedure sperimentali e analisi dei risultati</b>	<b>p. 29</b>
<b>5. Conclusioni</b>	<b>p. 55</b>
<b>Appendice</b>	<b>p. 56</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>p. 58</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>p. 62</b>

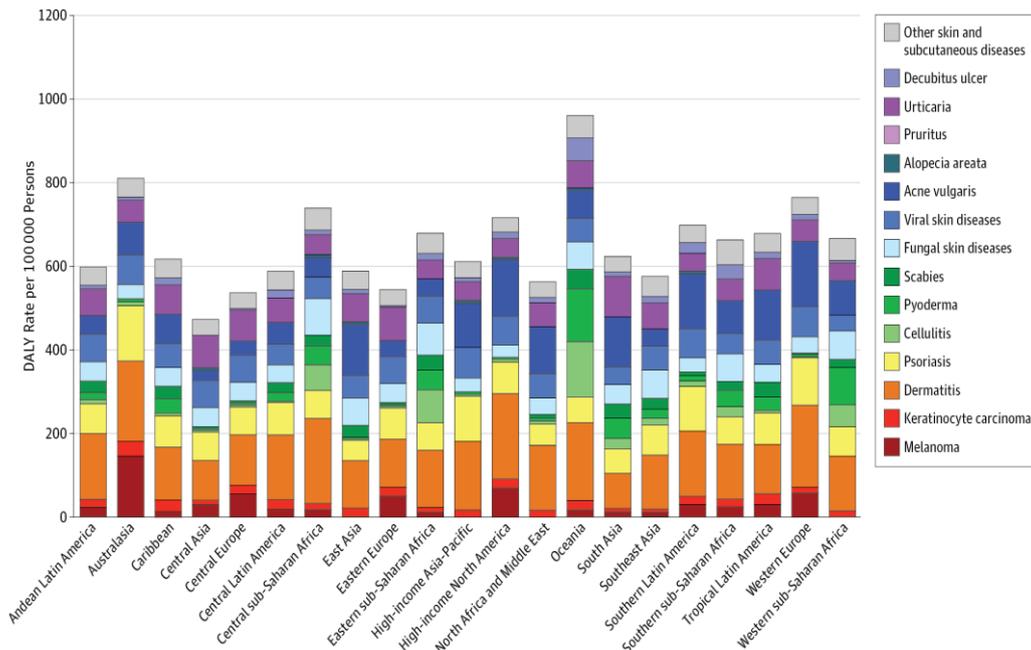


## 1. Introduzione

Lo sviluppo tecnologico esponenziale e gli incrementi progressivi della produzione industriale mondiale hanno radicalmente modificato la società in svariati aspetti. L'aumento dell'offerta dei beni di consumo ne ha accresciuto la domanda, di conseguenza gli ultimi decenni hanno registrato veri e propri miglioramenti (più o meno circoscritti) nella qualità media dell'alimentazione, degli standard di vita, dei servizi etc. Questa tendenza globale è sia causa che effetto della crescita di mercati più specifici, come quello farmaceutico e cosmetico, che sono stati influenzati dalla necessità impellente di garantire soluzioni terapeutiche sia a patologie di grave entità, come testimonia l'alta incidenza di mortalità causata da malattie tumorali e cardiovascolari (Fig. 1) <sup>[1]</sup>, sia ai più blandi, ma largamente diffusi, disturbi fisici, quali dermatiti, disidratazione della pelle etc (Fig. 2) <sup>[2]</sup>.



*Figura 1. Cause di morte globalmente più frequenti. La stima, risalente al 2016, mette in evidenza la netta prevalenza di malattie non contagiose o non dipendenti dalle condizioni di nutrizione. La statistica è calcolata su un totale di 56.9 milioni di morti.*



**Figura 2.** Il grafico riporta il Disability-Adjusted Life Expectancy Rate (DALY, un indicatore della gravità globale di una malattia) dovuto a 15 malattie della pelle. Il valore è calcolato su un campione di 100'000 individui per ogni regione del mondo (21 in totale). In generale si può notare un'elevata e costante incidenza di dermatiti e acne vulgaris, oltre che di funghi generici della cute.

Non è un caso, quindi, che questi settori di produzione siano in costante espansione, nonostante una leggera flessione del trend subita ultimamente dai mercati.

Il mercato globale dei principi farmaceutici attivi (API) è stato valutato 165.74 miliardi di dollari nel 2018 e si stima che salirà a circa 240 miliardi di dollari nel 2024, con un tasso annuo di crescita (CAGR) del 6.1%.

Esso è stato tradizionalmente dominato economicamente da farmaci come anti-infettivi, anti-diabete, antitumorali, contro malattie cardiovascolari, analgesici, e farmaci per la gestione del dolore [3].

Ma, parallelamente, altri settori affini hanno registrato ampi margini di sviluppo. L'industria cosmetica (si consideri anche il solo caso italiano, Fig. 3) [4] e il mercato dei farmaci per applicazioni dermatologiche registrano fatturati in costante crescita, oltre che investimenti ingenti (per il mercato dei dispositivi e dei farmaci dermatologici è stato previsto un CAGR pari al 6.4% per il decennio 2018-2028) [5] e sempre più orientati alla ottimizzazione di prodotti derivati da fonti naturali. Entrambi i mercati, infatti, rispondono alla maggiore sensibilità sia da parte dell'opinione pubblica (e, perciò, dei consumatori stessi) sia da parte degli enti sovranazionali (regolamento europeo REACH<sup>1</sup>) nei confronti di prodotti più stabili e sicuri, e

<sup>1</sup> REACH, ufficialmente regolamento (CE) n. 1907/2006 e acronimo di "Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals", è un'insieme di norme europee redatte allo scopo di migliorare la conoscenza dei

di formulazioni biocompatibili ed ecosostenibili, che evitano quindi l'impiego di componenti dannosi per l'uomo e l'ambiente.

Fatturato dell'Industria Cosmetica (valori della produzione)				
	CONSUNTIVO 2018	PRECONSUNTIVO 2019	VARIAZIONE % 2019/18	PROIEZIONE % 2020/19
<b>Fatturato in Italia</b>	<b>6.770</b>	<b>6.900</b>	<b>1,9</b>	<b>2,0</b>
<i>di cui generato nei canali professionali</i>	742	755	1,7	1,2
<i>di cui generato negli altri canali</i>	6.028	6.145	2,0	2,1
<b>Esportazione (fatturato all'estero)</b>	<b>4.860</b>	<b>5.000</b>	<b>2,9</b>	<b>2,9</b>
<b>Fatturato globale settore cosmetico</b>	<b>11.630</b>	<b>11.900</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>

*Figura 3. Resoconto sul fatturato 2018 e 2019 dell'industria cosmetica italiana. I dati registrati denotano una crescita complessivamente positiva sia nel mercato interno che in quello estero, mostrando la tenuta e la competitività del settore.*

Ne è derivato uno scenario complesso e altamente competitivo, che perciò ha costituito un terreno fertile per l'affermarsi di nuovi trend di mercato. A partire dalla fine del secolo XX le multinazionali del settore farmaceutico hanno iniziato a riconoscere l'importanza della modalità di somministrazione dei farmaci, studiando quindi processi innovativi che permettano di realizzare nuove formulazioni, facilmente brevettabili, caratterizzate da attività biologica migliorata. Infatti il metodo e la forma con i quali viene somministrato un farmaco possono avere un effetto significativo sulla sua efficacia nel prevenirne la prematura disattivazione. Tra i campi di ricerca maggiormente esplorati in tale prospettiva emerge quello delle nanotecnologie<sup>2</sup>, il cui sviluppo si è espresso in numerose applicazioni. Tra queste, la realizzazione di "drug delivery system" (DDS) in grado di garantire una strategia efficace di veicolazione di un agente terapeutico nel corpo ha costituito un punto di svolta per quanto concerne l'elaborazione di formulazioni farmaceutiche. La versatilità di questi sistemi innovativi è stata ben presto applicata in ambito cosmetico e cosmeceutico.

Tra le strutture più tipiche di un DDS vi sono indubbiamente quelle micro/nanoparticellari e la loro formulazione è fortemente dipendente dalla scelta del materiale costituente (Fig. 4). Esso

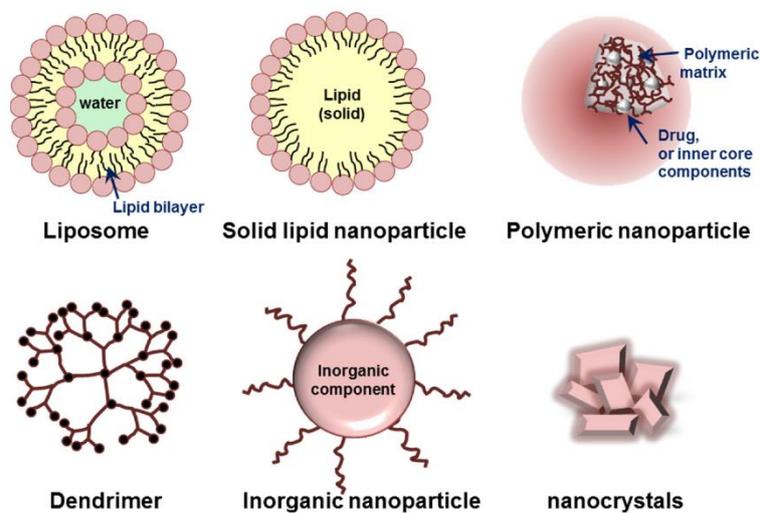
---

pericoli e dei rischi derivanti da prodotti chimici e valutare i rischi associati a questi ultimi attraverso l'istituzione della cosiddetta Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA).<sup>[6]</sup>

<sup>2</sup> Con il termine nanotecnologia si intende quell'insieme di aree applicative della scienza e dell'ingegneria concernente la progettazione e la realizzazione di dispositivi nanodimensionali, ovvero ottimizzati nel range di 1-1000nm. Ad oggi le nanotecnologie hanno trovato largo impiego in vari settori della chimica farmaceutica e della cosmeceutica, stimolando lo sviluppo di prodotti con proprietà innovative.<sup>[7]</sup>

deve rispettare alcuni requisiti fondamentali: disporre di specifiche proprietà fisiche, ovvero resistenza, flessibilità, impermeabilità (almeno fino ad un certo grado), bassa igroscopia, presentare non solo una buona interazione con il principio attivo (grazie a domini idrofili/lipofili), ma anche inerzia chimica nei suoi confronti, per evitarne l'alterazione delle funzioni. <sup>[8]</sup> Altro fattore discriminante è la tipologia di ambiente esterno, ovvero di solventi e soluti presenti in mezzi acquosi/organici o di specie gassose in atmosfera.

In ambito cosmetico, in particolare, i sistemi micro/nanoparticellari devono avere struttura e composizione in grado di penetrare attraverso lo strato corneo e raggiungere i diversi strati della pelle, esplicando la loro azione in quella sede.



*Figura 4. Illustrazione schematica di alcuni sistemi particellari classificati in base ai materiali costituenti e alle caratteristiche strutturali.*

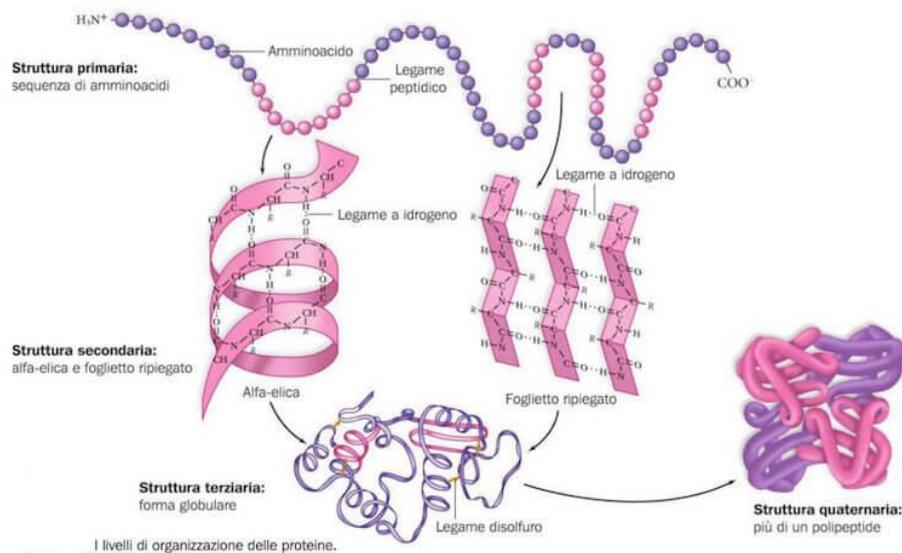
In quest'ottica risulta quindi chiaro come i **biopolimeri naturali** abbiano attirato l'attenzione per via della loro classica biocompatibilità e grande disponibilità in natura. Inoltre, essendo biodegradabili, non si accumulano negli organi come i materiali non biodegradabili (nanotubi di carbonio o nanoparticelle metalliche).

Tra tutti, un particolare interesse, per efficienza di trasporto di farmaci, è dedicato alle **proteine**, macromolecole biologiche costituite da sequenze amminoacidiche. Esse svolgono una vasta gamma di funzioni all'interno degli organismi viventi: nella forma enzimatica fungono da catalizzatori di reazioni metaboliche e hanno un ruolo fondamentale nella replicazione del DNA (come è il caso della famiglia delle DNA polimerasi), sono coinvolte nei meccanismi di risposta agli stimoli e in quelli di trasporto di molecole da un luogo ad un altro; infine possono avere funzioni strutturali e meccaniche (e.g. actina e miosina nei muscoli e le proteine del

citoscheletro che mantengono la forma della cellula). Per la maggior parte le proteine sono costituite da catene polimeriche lineari dei 20 diversi L- $\alpha$ -aminoacidi, detti anche naturali. Tutti gli aminoacidi proteici possiedono caratteristiche strutturali comuni, tra cui un carbonio  $\alpha$  con un gruppo amminico, un gruppo carbossilico e una catena laterale variabile (solo la prolina differisce da questa struttura di base in quanto contiene un anello insolito al gruppo amminico). Ogni aminoacido è legato ad un altro tramite legami peptidici, derivanti dalla reazione di condensazione tra il gruppo amminico di un aminoacido e il gruppo carbossilico dell'altro. Il legame peptidico ha due forme di risonanza che contribuiscono al doppio legame e inibiscono la rotazione attorno al suo asse, in modo che i carboni- $\alpha$  siano approssimativamente complanari. Gli altri due angoli diedri nel legame determinano la forma locale assunta dalla catena principale proteica.

In generale, si possono stabilire quattro diversi livelli di organizzazione strutturale all'interno di una proteina complessa (Fig. 5):

- Struttura primaria, formata dalla sequenza aminoacidica. Determina il numero e la tipologia delle catene.
- Struttura secondaria, che consiste nella conformazione spaziale delle catene, le più comuni delle quali sono quella a spirale, detta a  $\alpha$ -elica, e quella planare, cioè a foglietto- $\beta$ . Entrambe sono il risultato di una stabilizzazione dell'energia libera attraverso legami a idrogeno.
- Struttura terziaria, ovvero la configurazione tridimensionale che la catena proteica assume nell'ambiente in cui si trova. Questa struttura è largamente dipendente da quella primaria, in quanto il suo ripiegamento, dato dalle molteplici interazioni tra i singoli peptidi (forze di van der Waals, legami a idrogeno, ma anche ponti disolfuro tra residui cisteinici), è determinato dalla specifica posizione degli aminoacidi in catena.
- Struttura quaternaria, che deriva dall'associazione di subunità proteiche, sempre tramite legami deboli e/o ponti disolfuro. <sup>[9]</sup>



*Figura 5. Illustrazione dei diversi livelli strutturali tipici di una proteina.*

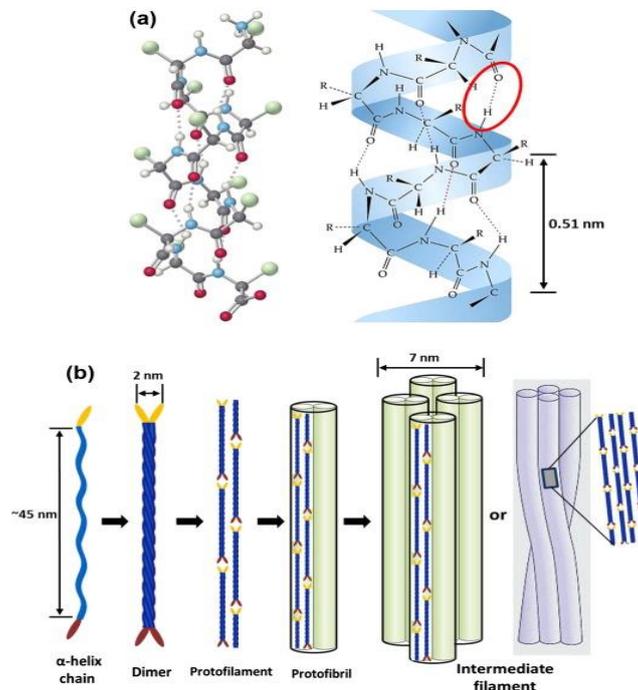
Grazie alle loro caratteristiche strutturali, e in particolare alle diverse pKa dei gruppi carbossilici (valori compresi tra 2 e 5) e amminici (tra 8 e 10), le proteine possiedono cariche positive e negative a valori di pH, rispettivamente, inferiori o superiori ai loro punti isoelettrici (in prossimità del quale le cariche ioniche si equilibrano), facilitando quindi il caricamento di specie chimiche dotate di carica. Inoltre, esse presentano domini idrofobici compatibili con quelle insolubili in acqua. Tuttavia, le micro/nanoparticelle proteiche finora studiate mostrano una certa instabilità in ambiente acquoso e necessitano di modificazioni chimico-fisiche (tipicamente cross-linking), che possono però essere suscettibili a fattori esterni (pH, concentrazione di ioni in soluzione, etc) o generare problemi di tossicità dovuti alla presenza di additivi residui. Un esempio ben noto è rappresentato dall'albumina, una delle proteine plasmatiche più comuni. Negli ultimi anni è stata spesso sfruttata per sintetizzare nanotrasportatori di farmaci idrofobici, ma i metodi scelti hanno sempre presentato alcuni limiti in termini di tossicità (presenza di additivi non idonei per usi medici), incompatibilità con alcuni principi attivi o efficienza di caricamento.

La **cheratina** è una proteina filamentosa largamente prodotta nelle cellule epiteliali di vertebrati, presente in capelli, pelle, corna, unghie e piume d'animale. Questo materiale biologico si differenzia dagli altri per le ottime proprietà meccaniche (possiede alta resistenza ed elevato modulo elastico), per l'elevata stabilità chimico-fisica e insolubilità e per il caratteristico alto contenuto di cisteina. Considerata l'ampia variabilità di organizzazioni strutturali di questa famiglia di proteine, risulta opportuna una prima classificazione in base alla sua struttura secondaria e ai componenti di supporto principali nei materiali proteici. In

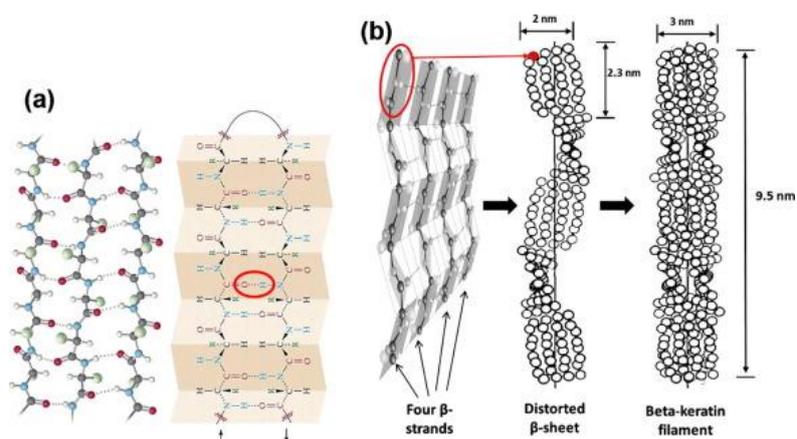
particolare, si distinguono le  $\alpha$ -cheratine dalle  $\beta$ -cheratine per la prevalenza di filamenti con pattern a  $\alpha$ -elica, piuttosto che a  $\beta$ -foglietto. La struttura di questi filamenti è profondamente differente (Fig. 6-7).

Le  $\alpha$ -cheratine sono organizzate a spirale (o “coiled-coil”), in cui due catene polipeptidiche orientate ad elica destrogira formano, tramite legami disolfuro, un dimero, il quale si aggrega ad altri (sempre per legami S-S) per formare un protofilamento. Quest’ultimo, combinandosi con altri protofilamenti, si organizza in filamenti intermedi grazie a interazioni intermolecolari e altri ponti disolfuro. Tali strutture sono ricorrenti in mammiferi e sono il componente principale di lana, capelli, unghie, corna e strato corneo della pelle.

Per quanto riguarda le  $\beta$ -cheratine, le singole catene si impaccano lateralmente con altre in maniera parallela o anti-parallela (più stabile) sfruttando i legami a idrogeno: la struttura  $\beta$ -foglietto sfrutta queste interazioni e la planarità caratteristica del legame peptidico. Successivamente i singoli strati si sovrappongono in modo da formare i filamenti di  $\beta$ -cheratina. I materiali caratterizzati da queste strutture mostrano rigidità, e quindi moduli di Young, più alti. Infine, a differenza della forma  $\alpha$ , si ritrova maggiormente in tessuti di rettili (scaglie e artigli) e uccelli (becchi e piume).<sup>[10]</sup>



**Figura 6.** Strutture dei filamenti di  $\alpha$ -cheratina: a) modello tipico di  $\alpha$ -elica, in cui vengono mostrati i tipici legami a idrogeno intramolecolari e lunghezza del passo dell’elica; b) schema di formazione di filamenti di  $\alpha$ -cheratina a partire da dimeri costituiti da catene polipeptidiche, e poi assemblati in modo da generare i protofibrille. Quattro protofibrille generano un filamento intermedio.

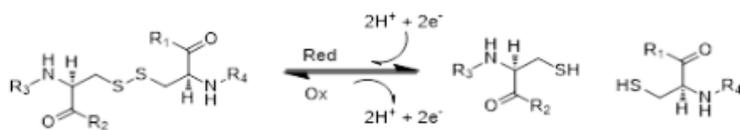


**Figura 7.** Strutture dei filamenti di  $\beta$ -cheratina: a) modello tipico di  $\beta$ -foglietto formato grazie ai legami a idrogeno intermolecolari; b) schema di formazione dei filamenti di  $\beta$ -cheratina a partire dall'assemblamento di due  $\beta$ -foglietti distorti.

Va evidenziato che questi pattern ordinati sono dispersi all'interno di una matrice cheratinosa completamente amorfa, perciò, tali materiali vanno considerati come veri e propri polimeri compositi, contenenti cioè filamenti cristallini (considerabili come rinforzi) incorporati in una matrice completamente amorfa che consenta di mantenere uniti i rinforzi.

Le due tipologie di strutture cheratinose si differenziano anche per la struttura primaria. Le sequenze amminoacidiche sono diversificate in base alle specie animali e alla funzione svolta all'interno del tessuto organico; in ogni caso, generalmente la composizione presenta percentuali variabili di amminoacidi idrossilici (acido glutammico, serina), glicina e cisteina. Generalmente le  $\alpha$ -cheratine presentano più alti contenuti di cisteina e di acido glutammico, mentre maggiori quantità di residui di glicina, prolina e serina nelle  $\beta$ -cheratine possono essere associate all'assenza di strutture secondarie a  $\alpha$ -elica. Tutto ciò implica che la scelta della materia prima sia fondamentale: in base alla provenienza, infatti, le proprietà chimico-fisiche saranno profondamente differenti.

Come già precedentemente accennato, questi biopolimeri sono naturalmente insolubili grazie ai ponti disolfuro (-S-S-) intra/intermolecolari e altre interazioni tra i peptidi interni alle catene. Tuttavia, esistono possibili metodi di denaturazione della proteina, i più comuni dei quali consistono in idrolisi acide o basiche e reazioni di ossidoriduzione (Fig. 8) e rottura dei legami disolfuro (solfitolisi).



*Figura 8. Schema di una generica reazione di ossidoriduzione del ponte disolfuro di un residuo di cistina. In presenza di un agente riducente il legame S-S è rotto per generare due tioli o, a seconda del reagente, altri gruppi funzionali. La formazione del ponte è invece indotta da agenti ossidanti.*

Questi sono i classici metodi per rendere la proteina disponibile ad altre applicazioni, tra cui la sua integrazione in preparazioni funzionali alla veicolazione di farmaci.

Tra le altre forme, i relativi sistemi particellari (tipicamente di dimensioni micro e nanometriche, quindi con diametri compresi tra 10-1000 nm) garantiscono elevate adattabilità ed efficacia come “carrier” transdermici e/o intracellulari di specie sia idrofile che lipofile: da agenti terapeutici antitumorali a coloranti di vario genere, da principi attivi della nutraceutica a prodotti della cosmesi nel caso, tutti con ampi range di caricamento.

Il diverso dimensionamento delle particelle incide sulle possibili applicazioni stesse: a livello micrometrico sono adatte per usi dermatologici e, in particolare, sfruttano la naturale compatibilità con gli strati dell’epidermide e del derma. I complessi di dimensioni nanometriche, invece, sono utili al trasporto intra/intercellulare di farmaci, grazie all’alta capacità di penetrazione tra i tessuti interni e alla presenza nella sequenza amminoacidica dei tripeptidi Arg-Gly-Asp e Leu-Asp-Val (rispettivamente Arginina-Glicina-Aspartato e Leucina-Aspartato-Valina), in grado di interagire con i recettori delle membrane cellulari. <sup>[11]</sup>

La stabilità del sistema è fortemente dipendente anche da fattori esterni come pH e temperatura. La letteratura ha riportato vari studi al riguardo: generalmente temperature elevate incidono sull’instabilità delle particelle, aumentandone le collisioni e quindi la tendenza ad aggregare. Il pH può modificare la carica netta superficiale della proteina (il cui valore dipenderà dal punto isoelettrico), favorendo la repulsione o tra le micro/nanoparticelle o all’interno di queste se sono presenti interazioni elettrostatiche tra lo strato esterno del polimero e il composto incapsulato. In quest’ultimo caso una variazione nell’acidità/basicità della soluzione o dell’ambiente cellulare induce la protonazione/deprotonazione della cheratina e del farmaco, quindi influenza anche la fase di rilascio del principio attivo. A tal proposito, esistono altri fattori esterni come la presenza di specie chimiche ossidanti e riducenti quale il GSH (Glutatione), un antiossidante tripeptidico costituito da cisteina, glicina e glutammato, che è legato alla cisteina con un legame peptidico atipico tra il gruppo carbossilico della catena laterale del glutammato e il gruppo amminico della cisteina. L’ambiente riducente intracellulare indotto dal GSH favorisce la

rottura dei ponti disolfuro presenti in corrispondenza dei domini cisteinici e porta alla formazione di tioli (-SH) e al legame tra la proteina e il peptide stesso. Questo comporta, infine, una destabilizzazione delle nanoparticelle e un conseguente incremento del rilascio. <sup>[12]</sup>

Nonostante il promettente profilo di valido biomateriale per svariate applicazioni biomediche, una delle principali problematiche dei DDS a base di cheratina ha da sempre riguardato la necessità di introdurre additivi in grado di stabilizzare meccanicamente le particelle in mezzo acquoso.

La società Kerline srl., una start up innovativa partecipata dal CNR, ha messo a punto un processo di estrazione e purificazione di materiale cheratinoso da sottoprodotti del settore agroalimentare e tessile, sfruttando in particolare scarti di lana grezza. Questa, infatti, contiene un'alta percentuale di proteine  $\alpha$ -cheratinose (varia dall'80% al 90%), organizzate in strutture di micro e macrofibrille disperse in domini amorfi (ad alto contenuto di residui cisteinici), complessi di cellule di membrana ricche di lipidi e altri residui cellulari (Fig. 9).

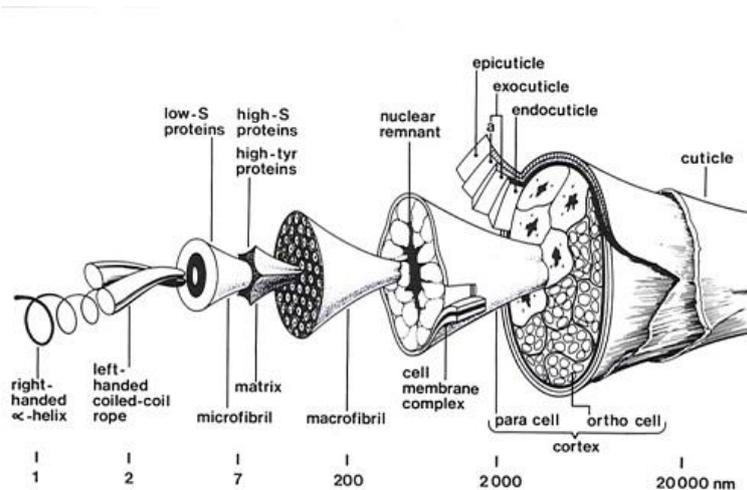
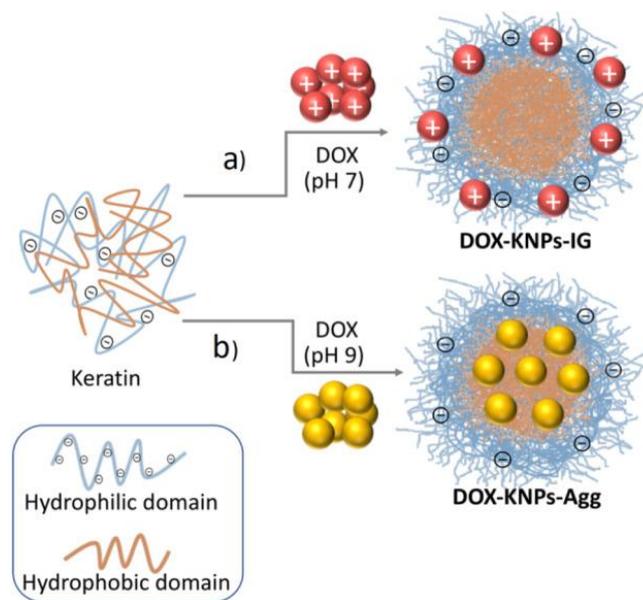


Figura 9. Illustrazione schematica degli strati costituenti di una singola fibra di lana merino.

La prima cheratina utilizzata (ad alto peso molecolare, MK), estratta tramite **solfitolisi**, purificazione, dialisi e liofilizzazione finale, ha mostrato buona versatilità e capacità di trasporto di principi attivi in solventi green. In letteratura sono presenti numerose sue applicazioni, le quali mostrano chiaramente la capacità di questa forma proteica di veicolare farmaci tra i tessuti cellulari e di migliorarne il targeting. Tra tutte le combinazioni sperimentate merita sicuramente di essere menzionata l'ottimizzazione di nanoparticelle di cheratina e doxorubicina, uno dei più efficaci agenti chemioterapici usati per il trattamento di varie tipologie di tumore, i cui limiti di

applicazione sono dovuti all'alta cardiotossicità, che si manifesta tramite cardiomiopatie e insufficienze cardiache. Un approccio ideale volto a ridurre questi effetti collaterali si può proprio basare sull'utilizzo di drug carrier nanoparticellari in grado di preservare lo stato dei tessuti sani e, invece, di collocarsi in quelli tumorali, che mostrano una maggiore permeabilità ed effetti di ritenzione più intensi nei confronti di corpi nanometrici. È stata dunque studiata e caratterizzata una formulazione di nanoparticelle di cheratina caricate con doxorubicina, impiegando due metodi di sintesi differenti, aggregazione e gelificazione ionica (Fig. 10).



**Figura 10.** Nanoparticelle di cheratina caricate con doxorubicina disperse in soluzione acquosa a pH differenti. Il composto interagisce con i domini idrofili (esterni) o lipofili (interni) della proteina in base alla sua natura polarità.

I risultati in vitro su set di cellule tumorali MDA-MB-231 confermano non solo le ottime capacità di trasporto, ma anche la più alta efficacia nella inibizione della proliferazione di queste; inoltre, si evidenzia come il rilascio, essendo incrementato in ambienti acidi, sia anche maggiormente selettivo, in quanto le cellule malate presentano pH inferiori ai normali valori fisiologici. <sup>[13]</sup>

Questa cheratina ad alto peso molecolare si presta bene anche per funzionalizzazioni ulteriori con farmaci come la Clorina e6, un composto fotosensibile di seconda generazione sintetizzato dalla clorofilla, che viene sfruttato nella cosiddetta terapia fotodinamica, un'opzione clinica non chirurgica per il trattamento di diverse malattie, tra cui infezioni di vario genere e tumori maligni. Tramite irradiazione con luce ad un'appropriata lunghezza d'onda e in presenza di ossigeno la Clorina induce la formazione di specie citotossiche, come ossigeno molecolare allo

stato di singoletto e altri componenti reattivi a base di ossigeno (ROS, “reactive oxygen species”) che possono poi causare l’arresto di proliferazione e la necrosi delle cellule malate. Visto il carattere idrofobico e la generale tendenza a possedere bassa specificità, con possibili effetti collaterali sui tessuti sani circostanti, la scelta di una strategia basata su nanoparticelle proteiche risulta ottimale: i dati raccolti hanno infatti dimostrato eccellenti proprietà nell’accumularsi nelle cellule tumorali, promuovendo l’efficienza della specie fotosensibile. <sup>[14]</sup>

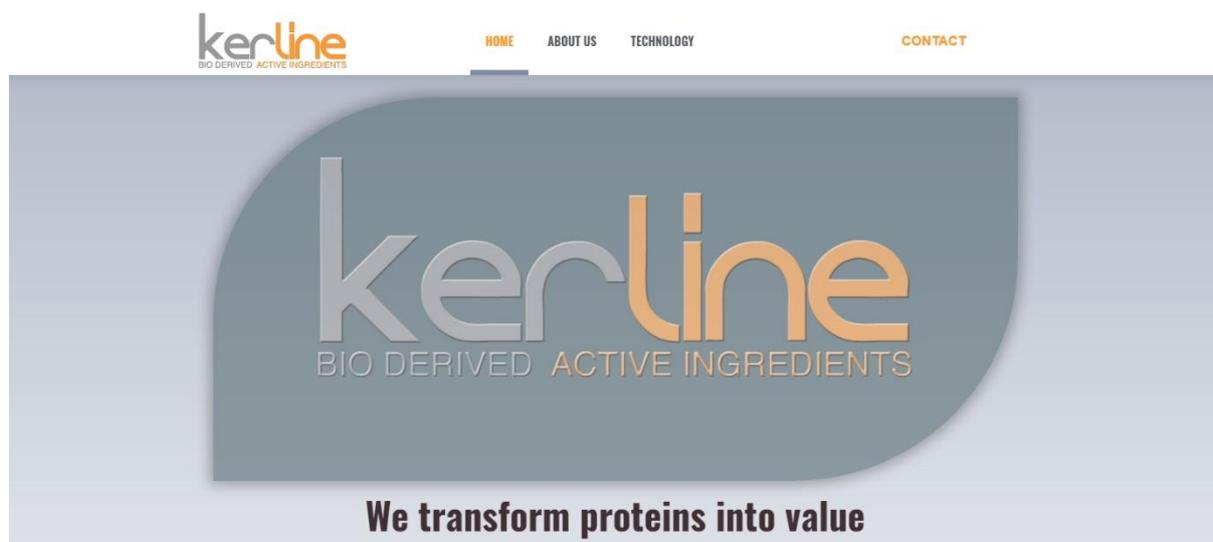
Durante lo svolgimento del tirocinio aziendale alla base di questa tesi, una parte del lavoro è stato dedicato alla produzione e caratterizzazione di una forma di cheratina idrolizzata (MHK), illustrate nella parte sperimentale e discussione dei risultati, Cap. 3-4).

A differenza di quanto descritto per il materiale precedente, la letteratura non presenta numerosi studi su questo polipeptide. Sono state, ad esempio, sviluppate miscele di cheratina idrolizzata e altri materiali polimerici per la produzione tramite elettrofilatura di nanofibre in grado di adsorbire efficacemente metalli pesanti e altri agenti inquinanti. Oltre alle proprietà tipiche di qualsiasi nanomateriale, ovvero l’elevata area superficiale di contatto, questa cheratina ha mostrato una capacità superiore grazie ai gruppi ionizzati durante l’idrolisi della catena proteica (non a caso, è stato riscontrato che l’adsorbimento è influenzato anche dalla variazione del pH), rappresentando una valida alternativa a resine a scambio ionico o ad altri materiali tipicamente usati nell’ambito della filtrazione e della depurazione delle acque. <sup>[15]</sup>

In campo cosmetico, nonostante il numero di applicazioni più contenuto, recenti studi hanno dimostrato che gli idrolizzati di cheratina impiegati in formulazioni dermatologiche aumentano l’idratazione dello strato corneo fino al 23%. <sup>[16]</sup>

È stato dunque ritenuto opportuno approfondire le potenzialità di questa cheratina, cercando di ampliarne l’utilizzo nelle nanotecnologie per uso farmaceutico e cosmeceutico.

## 2. Scopo della tesi



*Figura 11. Sito ufficiale di Kerline s.r.l.*

Il presente lavoro di tesi è stato svolto presso l'azienda Kerline s.r.l. con sede a Bologna presso l'Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività.

In ottemperanza a normative europee e internazionali delineate e regolamentate da organi istituzionali come FDA (Food and Drug Administration) e EMA (European Medicines Agency), i settori farmaceutico e cosmetico mostrano forte interesse per soluzioni “green”, ecosostenibili e atossiche, in modo da garantire prodotti e formulati all'avanguardia e appetibili per il mercato. La biocompatibilità è un fattore discriminante fondamentale nell'individuazione di un carrier idoneo sia per il soggetto che per il principio attivo da somministrare. In quest'ottica, può risultare opportuno l'utilizzo di forme di cheratina non modificate chimicamente e/o idrolizzate secondo processi a basso impatto ambientale, per sistemi di somministrazione di principi attivi difficilmente solubili in acqua o con potenziali effetti collaterali indesiderati.

Dato lo specifico interesse riservato dalla società nei confronti dell'industria dermocosmetica (settore agevolato nella emissione sul mercato di prodotti, rispetto a quello farmaceutico), la parte sperimentale della presente tesi si è orientata sullo studio e l'elaborazione di prototipi di formulazioni per la veicolazione transdermica di prodotti ad applicazione topica. L'obiettivo principale è stato quindi quello di fornire preparazioni a base di materiale proteico adatte a potenziali successive lavorazioni in creme o in altre emulsioni.

L'operato di tirocinio è stato suddiviso in tre fasi:

- analisi di mercato preliminare volta a ricercare API già affermati commercialmente, ma usati in formulazioni con margine di ottimizzazione
- estrazione di materiale proteico e successiva valutazione di compatibilità tra quest'ultimo e i principi attivi
- caratterizzazione dei DDS ottenuti.

### 3. Parte sperimentale

Kerline s.r.l. si è occupata della fornitura di tutto il materiale utilizzato, ovvero la lana di partenza e i principi attivi studiati. Gli strumenti sfruttati per la parte di caratterizzazione appartengono al Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.) dell'Area della Ricerca di Bologna, in particolare presso l'Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (ISOF).

#### 3.1. Materiali e strumenti di analisi utilizzati

Tutti gli scarti di lana greggia sono provenienti dal lanificio Cariaggi (Cagli, PU).

I solventi e i composti utilizzati per le estrazioni di cheratina sono stati reperiti presso le forniture dei laboratori delle strutture ISOF. I singoli principi attivi sono stati acquistati sul sito e-commerce di Sigma-Aldrich Italia.

Le misure dei diametri, degli indici di polidispersione e potenziali  $Z$  sono state effettuate utilizzando un Nanobrook Omni di Brookhaven, in grado di sfruttare tecniche di *Dynamic Light Scattering* (analisi in scattering a  $173^\circ$ ) e di *Phase Analysis Light Scattering* (con elettrodi BI-SVE175) e dotato di Laser Diodo rosso (40 mW, 640 nm).

Gli spettri ad infrarossi sono stati acquisiti mediante la tecnica in riflettanza totale attenuata (ATR), con un interferometro Bruker Vertex 70 dotato di un accessorio Platinum ATR a riflessione in cristallo di diamante, nella regione tra  $4000$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ , con 100 scansioni ed una risoluzione di  $4\text{ cm}^{-1}$ .

Gli spettri UV-Vis sono stati raccolti utilizzando uno spettrofotometro Agilent Cary 100, dotato di monocromatore Czerny-Turner 0.278 m e detector costituito da tubi fotomoltiplicatori R928, nel range 200-800 nm, con risoluzione  $\leq 0.24\text{ nm}$  e accuratezza di lunghezza d'onda di  $\pm 0.2\text{ nm}$ .

La morfologia delle particelle è stata studiata tramite SEM. È stato utilizzato un Microscopio Elettronico a Scansione Zeiss EVO LS 10 LaB7, strumento con voltaggio di accelerazione di 5 kV e distanza di lavoro di 5 mm.

Per le analisi tramite Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H-NMR}$ ) è stato utilizzato un NMR Bruker da 500 MHz.

La distribuzione dei pesi molecolari è stata ricavata mediante elettroforesi SDS-PAGE su gel di poliacrilammide. L'analisi è stata eseguita con la Mini-Cella Xcell SureLock (Invitrogen), sul 4-12% di gel pre-cast di poliacrilammide (Invitrogen), utilizzando NuPAGE MES SDS Running Buffer, adatto a proteine aventi pesi molecolari compresi tra 3 e 188 kDa.

### **3.2. Procedure di estrazione di cheratina**

Tutte le metodologie di estrazione di cheratina (ad eccezione della forma idrolizzata) sono state applicate seguendo le procedure descritte nel brevetto aziendale.<sup>[17]</sup> Per quanto concerne la fase di caratterizzazione e analisi, i dati ottenuti sono stati confrontati con risultati precedenti presenti negli archivi aziendali. la parte sperimentale alle esigenze e alle condizioni dei DDS a base proteica.

#### **3.2.1. Estrazione di cheratina ad alto peso molecolare (MK) da scarti di lana greggia**

In un pallone da 250mL sono stati sospesi scarti di lana greggia (5g) in acqua (circa 100mL) insieme a Sodio dodecilsolfato (SDS,  $1.04 \cdot 10^{-2}$ mol), Metabisolfito di sodio ( $5.89 \cdot 10^{-2}$ mol) e Urea (0.799mol). La miscela è stata scaldata in bagno ad olio a 65°C per 24h sotto lieve agitazione magnetica. La sospensione (di colore marrone chiaro) è stata filtrata per rimuovere i residui di lana e successivamente fatta passare su altri due filtri a diverso dimensionamento (5 e 30 micron) attraverso l'utilizzo di una pompa peristaltica. In questo modo è stato possibile rimuovere eventuali residui istologici, i quali possono indurre fenomeni di flocculazione della cheratina solubilizzata e comprometterne quindi la sospensione successiva. La soluzione è stata poi dializzata per 3 giorni (cambiando l'acqua di dialisi due volte al giorno) utilizzando una membrana di cellulosa (dimensioni 12 kDa) immersa in acqua Milli-Q (5L) per eliminare i sali e gli altri composti utilizzati per il processo di estrazione. Per valutare l'efficacia della dialisi sono state effettuate misure di conducibilità sull'acqua, fino a quando non sono stati registrati valori inferiori a 5 $\mu$ S/cm. Una volta conclusi i passaggi di purificazione, il materiale cheratinoso è stato liofilizzato e pesato per calcolare la resa del processo.

Visti i valori relativamente contenuti di cheratina ottenuta (vedi parte di discussione dei risultati, par. 4.3.1.), è stato ritenuto ragionevole considerare un recupero degli scarti della lana di partenza. Se da un lato i tentativi di recupero di altra cheratina ad alto peso molecolare non hanno portato a risultati soddisfacenti, dall'altro la messa a punto di un processo di produzione di idrolizzati di cheratina ha permesso la rimozione quasi totale di scarti.

### **3.2.2. Ottimizzazione del processo di recupero di lana non estratta tramite idrolisi basica (MHK)**

In seguito ad ogni estrazione di cheratina ad alto peso molecolare sono stati recuperati gli scarti della proteina non estratta e ottenuti dopo la prima filtrazione (vedi par. 4.3.1.). In particolare, il processo è stato ottimizzato conducendo un'idrolisi basica sul prodotto di smaltimento. In un pallone da 250mL sono stati sospesi gli scarti di lana greggia, precedentemente disfatti e tagliuzzati, in una soluzione acquosa di NaOH (0.5N, 100mL). La miscela è stata scaldata in bagno ad olio a 65°C per 2h sotto lieve agitazione magnetica. Successivamente la soluzione ottenuta è stata purificata attraverso i processi già descritti sopra; in tal caso la dialisi è stata condotta controllando sia il pH (tramite semplice cartina tornasole) che la conducibilità dell'acqua prima di ogni ricambio. La cheratina idrolizzata è stata infine liofilizzata. La resa è stata determinata solo dopo aver calcolato quella relativa al lotto da cui è stato recuperato il residuo cheratinoso.

### **3.3. Caratterizzazione delle cheratine estratte**

I lotti di cheratina estratta sono stati studiati attraverso elettroforesi SDS-PAGE e FTIR-ATR.

#### **3.3.1. Determinazione dei pesi molecolari tramite elettroforesi SDS-PAGE**

Le due forme di cheratina estratte sono state caratterizzate con elettroforesi SDS-PAGE (Elettroforesi su Gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato), in modo da valutare la distribuzione dei pesi molecolari.

Il protocollo seguito è di tipo Invitrogen: la soluzione di cheratina è stata sciolta in un tampone costituito da NuPAGE LDS Sample Buffer e NuPAGE Sample Reducing Agent, in modo da caricarne 30 µg in ogni pozzetto.

### 3.3.2. Caratterizzazione tramite Spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)

Sono stati studiati tramite tecnica FTIR-ATR campioni delle due cheratine estratte. L'assegnazione dei picchi è stata fatta avvalendosi anche di alcuni studi precedenti, forniti dalla letteratura. <sup>[18]</sup>

### 3.4. Procedure di preparazione di micro e nanoparticelle di cheratina MK

Anche in questo caso sono state seguite le procedure descritte nel brevetto aziendale per tutte le specie API. In particolare è stato sfruttato il metodo del *self-assembly*, i cui passaggi sono riportati di seguito:

- Solubilizzazione della cheratina (5 mg) in acqua Milli-Q (1mL). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione magnetica per circa 30 minuti
- Aggiunta goccia a goccia di una soluzione organica (solvente etanolo), contenente il principio attivo, alla soluzione acquosa di cheratina sotto agitazione
- Rimozione del solvente organico lasciando i campioni in agitazione overnight e recupero del surnatante contenente le sole particelle di cheratina caricate.

#### 3.4.1. Caricamento di Acido Azelaico (AA) su cheratina MK

È stata eseguita una serie di caricamenti di acido azelaico su una quantità costante di cheratina ad alto peso molecolare (5 mg/mL). Per questo sono state preparate diverse soluzioni organiche con diverse quantità del principio attivo, da ognuna delle quali sono stati prelevati 100µL. Si riporta la serie nella tabella sottostante (Tab. 1).

**Tabella 1.** Serie di caricamenti di acido azelaico su cheratina MK.

MK (mg/mL)	AA (mg)
5	1
5	1.5
5	2
5	2.5
5	3
5	3.5

5	4
5	4.5
5	5

Le micro e nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate al DLS/PALS e osservate mediante microscopia elettronica (SEM). Successivamente sono state liofilizzate, previa aggiunta di saccarosio (6 mg per campione) per evitare l'eccessiva aggregazione delle particelle (fattore che può compromettere le misure delle dimensioni).

### 3.4.2. Caricamento di $\alpha$ -Tocoferolo acetato (VIT.E) su cheratina MK

Per valutare il potere aggregante della vitamina E acetato sulla cheratina è stata eseguita una serie di caricamenti (Tab. 2). A differenza di quanto specificato nel paragrafo precedente, la quantità di soluzione organica aggiunta è proporzionale al caricamento effettuato, in quanto è stata utilizzata una sola soluzione madre (Vitamina E acetato 40mg/mL).

*Tabella 2. Serie di caricamenti di  $\alpha$ -Tocoferolo acetato su cheratina MK.*

MK (mg/mL)	VIT.E (mg)
5	0.25
5	0.5
5	0.75
5	1
5	1.5
5	2
5	2.5
5	3
5	3.5
5	4

I campioni sono stati caratterizzati al DLS/PALS.

### 3.4.3. Caricamento doppio di acido azelaico + $\alpha$ -tocoferolo acetato su cheratina MK

Per questa serie sono state utilizzate le quantità di AA riportate in Tabella 2, mentre la concentrazione di vitamina E acetato è stata mantenuta costante (2 mg/mL). Prima dell'aggiunta, le due soluzioni organiche di principi attivi sono state unite. Tutti i campioni

sono stati analizzati al DLS, prima e dopo liofilizzazione (anche in tal caso sono stati prima solubilizzati 6 mg di saccarosio a campione).

#### **3.4.4. Caricamento di Tioconazolo (TCZ) su cheratina MK**

Le quantità della soluzione aggiunta sono riportate in tabella 3 (soluzione madre di tioconazolo 10 mg/mL).

*Tabella 3. Serie di caricamenti di tioconazolo su cheratina MK.*

<b>MK (mg/mL)</b>	<b>TCZ (mg)</b>
5	0.25
5	0.5
5	0.75
5	1

I campioni sono stati caratterizzati al DLS/PALS e osservati al SEM. Inoltre, sono stati effettuati studi di stabilità, come efficienza di incapsulamento, test di rilascio del principio attivo e analisi di comportamento alle condizioni standard di sterilizzazione.

#### **3.5. Procedure di preparazione di micro e nanoparticelle di cheratina MHK**

Per l'utilizzo della forma cheratinosa idrolizzata è stato necessario valutare la concentrazione micellare critica del polimero. È stato quindi eseguito uno screening preliminare di concentrazione di MHK con i principi attivi. In particolare sono state prese in considerazione due concentrazioni di riferimento di cheratina (20 mg/mL e 40 mg/mL). La qualità del sistema particellare formato è stata valutata tramite misure DLS. Il metodo di preparazione di riferimento è sempre quello del *self-assembly*.

##### **3.5.1. Caricamento di Acido Azelaico su cheratina MHK**

È stata testata una prima serie di caricamenti di acido azelaico come mostrato in tabella 4.

**Tabella 4.** Serie di caricamenti di acido azelaico su cheratina MHK.

MHK (mg/mL)	AA (mg)
20	1
20	2
20	3
20	4
20	5
40	1
40	10

Le soluzioni risultanti sono state analizzate tramite DLS.

### 3.5.2. Caricamento di $\alpha$ -Tocoferolo acetato su cheratina MHK

Sono state testate entrambe le concentrazioni già proposte di MHK, ma in questo caso la serie di caricamenti (Tab. 5) è stata eseguita sulla quantità maggiore di cheratina (40 mg/mL).

**Tabella 5.** Serie di caricamenti di  $\alpha$ -tocoferolo acetato su cheratina MHK.

MHK (mg/mL)	VIT.E (mg)
40	1
40	1.5
40	2
40	2.5
40	3
20	2

I campioni sono stati caratterizzati tramite DLS.

### 3.5.3. Caricamento di Tioconazolo su cheratina MHK

Per quanto riguarda il tioconazolo è stata effettuata una singola prova (Tab. 6).

**Tabella 6.** Caricamento di tioconazolo su cheratina MHK.

MHK (mg/mL)	TCZ (mg)
40	1

Il campione è stato caratterizzato tramite DLS.

### **3.6. Procedure di caratterizzazione dei DDS**

La preparazione dei campioni da analizzare è stata standardizzata per ogni API, seguendo procedure presenti in letteratura e adattando queste ultime alle esigenze e alle condizioni dei DDS a base proteica.

#### **3.6.1. Determinazione del diametro, degli indici di polidispersità e del potenziale di superficie Z delle micro e nanoparticelle tramite tecnica DLS/PALS <sup>[19]</sup>**

Sono stati prelevati 100  $\mu\text{L}$  da ogni soluzione di API per diluirli successivamente con acqua Milli-Q (2 mL). Per ogni campione sono state effettuate 5 misurazioni, su cui è stato possibile calcolare media, deviazione ed errore standard.

Il potenziale Z è stato misurato immergendo nelle provette una cella elettroica in grado di applicare un campo elettrico sulle soluzioni; per ognuna di queste sono state raccolte 5 misurazioni. Per queste analisi è stato utilizzato un singolo campione rappresentativo di ogni API.

#### **3.6.2. Caratterizzazione tramite FTIR-ATR**

Sono stati studiati tramite tecnica FTIR-ATR campioni di cheratina MK caricata con tioconazolo (1 mg) e del solo tioconazolo (assegnazione dei picchi di quest'ultimo tramite il confronto con i dati di letteratura) <sup>[20]</sup>. Range di acquisizione compreso tra 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , con 100 scansioni e 4  $\text{cm}^{-1}$  di risoluzione.

#### **3.6.3. Caratterizzazione tramite Spettroscopia NMR**

È stato collezionato lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del Tioconazolo in  $\text{CDCl}_3$  (700  $\mu\text{L}$ ) e confrontato con i dati presenti in letteratura.

#### **3.6.4. Caratterizzazione tramite Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)**

La forma e il dimensionamento delle particelle cheratina MK caricata con i principi attivi (1 mg) sono stati osservati al microscopio elettronico SEM. I campioni sono stati depositati su

provini e, dopo aver fatto evaporare il solvente, sono stati ricoperti da uno strato d'oro per metallizzarli e renderli conduttivi.

### **3.6.5. Determinazione della curva di calibrazione di Tioconazolo in metanolo tramite Spettroscopia UV-vis**

Da una soluzione madre di Tioconazolo in metanolo (1mg/mL) sono state preparate per diluizione altre 5 soluzioni a diversa concentrazione: 1 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL. Una quantità pari a 1 mL è stata poi trasferita in cuvette in plastica per valutarne l'assorbimento negli spettri dell'ultravioletto e del visibile. Le assorbanze registrate sono state plottate con le corrispondenti concentrazioni per ottenere una curva di calibrazione. <sup>[21]</sup>

### **3.6.6. Determinazione dell'efficienza di incapsulamento (E.E.)**

In una provetta munita di filtro (100 kDa) sono stati iniettati 500 µL di una soluzione particellare di MK (rispettivamente 5mg) caricata con TCZ (0.75 mg). Il campione è stato centrifugato (5000 rpm x 7 minuti) e il filtro successivamente lavato con 500 µL di acqua Milli-Q. Il procedimento è stato ripetuto per 3 volte. Le aliquote di filtrato sono state recuperate e liofilizzate per poi determinare la quantità di TCZ libero tramite Spettroscopia UV-vis.

### **3.6.7. Prove di rilascio di principio attivo**

Sono stati preparati una soluzione in triplicato di cheratina MK (5 mg/mL) caricata con TCZ (0.75 mg/mL) e una di sola cheratina MK alla stessa concentrazione con etanolo (150 µL), entrambe in acqua Milli-Q (2 mL). Tutti i campioni sono stati asciugati sotto agitazione per una notte in modo da far evaporare l'etanolo presente. Questi sono stati poi trasferiti in membrane da dialisi (12 kDa) immerse in una miscela (6 mL) di PBS (pH 5.5) e etanolo 9:1 e mantenuti in agitazione tramite agitatore rotante a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . <sup>[22]</sup> Viene eseguita una serie di prelievi (500 µL) su tutte le provette (Tab. 7), le cui aliquote vengono infine liofilizzate e analizzate tramite Spettroscopia UV-vis.

**Tabella 7.** Serie di tempi di prelievo delle aliquote recuperate dai triplicati di sospensioni colloidali di tioconazolo e cheratina MK.

<b>Tempo di prelievo (ore)</b>	1/6	1/2	1	2	3	4	5	24
--------------------------------	-----	-----	---	---	---	---	---	----

### **3.6.8. Prove di stabilità termica**

Per valutare la stabilità termica di cheratina MK e API (TCZ) sono stati preparati i seguenti campioni (in acqua Milli-Q, 1 mL): cheratina MK (5mg); cheratina MK (10%*m/V*); cheratina MK (5 mg) caricata con TCZ (1 mg); TCZ (1 mg). Il test è stato condotto in autoclave alle condizioni standard di sterilizzazione (121°C, 1.5 bar, 15 minuti). I campioni sono stati poi analizzati tramite DLS, FTIR-ATR e NMR e confrontati con replicati non passati in autoclave.

## 4. Discussione e analisi dei risultati

### 4.1 Contesto

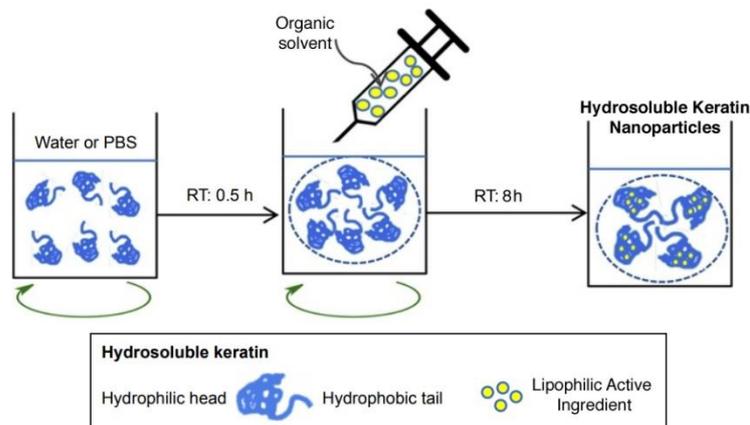
Il mercato internazionale dei drug delivery e, in generale, dei mezzi chimici di veicolazione ha promosso nelle ultime decadi lo sviluppo di metodologie e tecniche funzionali alla produzione su scala industriale di film e strati polimerici in grado di incapsulare composti di vario tipo. Le più comuni sono: separazione di fase tramite coacervati, emulsione, spray drying, estrusione, coating in reattore a letto fluidizzato, ecc. Questi processi possono avere vantaggi e svantaggi in base ai materiali di partenza utilizzati e alle proprietà strutturali e dimensionali desiderate. Nei casi della somministrazione di farmaci e di prodotti della cosmesi di utilizzo topico, sono state preferite vie di sintesi e soluzioni “green” ad hoc per la produzione di sistemi di drug delivery biocompatibili e a bassa tossicità. Nonostante diverse tipologie di cheratina di origine animale abbiano mostrato fin da subito indubbi vantaggi, i limiti legati alle proprietà chimico-fisiche e i relativi problemi di stabilità, rispetto ad altri biopolimeri, hanno precluso le potenziali applicazioni.

Kerline s.r.l. ha risposto a tutte queste esigenze e si è affacciata al mercato dermocosmetico proponendo una forma innovativa di materiale cheratinoso sia per le caratteristiche intrinseche (dipendenti dalle modalità di estrazione) che per le interessanti prospettive in applicazioni nanotecnologiche. Il prodotto, oltre a risultare competitivo per le sue peculiarità, rispetta i principi del modello di economia circolare, in quanto la prima fase del processo di produzione si focalizza sul recupero di scarti di lana ormai inutilizzabili nel settore tessile. In questo modo vengono evitati i costi associati ad ulteriori step di smaltimento.

Il metodo di incapsulamento qui utilizzato (secondo quanto descritto nel brevetto aziendale di riferimento) è definito *self-assembly* (Fig. 12): consiste nella semplice aggiunta graduale del principio attivo lipofilo in esame, appositamente solubilizzato in un solvente organico “green” (tipicamente etanolo), ad una soluzione acquosa di cheratina. Il meccanismo di formazione delle particelle è molto simile a quello micellare: infatti, il solvente e il farmaco perturbano la superficie della proteina, interagendo con i suoi domini lipofili e inducendola a separare la fase organica apolare da quella acquosa polare.

È opportuno sottolineare l’originalità del processo per la completa assenza di stabilizzanti e/o emulsionanti, i quali caratterizzavano i precedenti metodi che coinvolgevano questa tipologia

proteine. Grazie infatti alla peculiare composizione amminoacidica (Tab. 8), la ripartizione tra domini idrofili e idrofobici è tale da permettere alla cheratina di interagire facilmente anche con composti altamente lipofili e apolari e di trasferirli in ambienti acquosi.



*Figura 12. Illustrazione schematica della preparazione di micro e nanoparticelle tramite il meccanismo di self-assembly.*

**Tabella 8.** Composizione (in percentuale molare) delle cheratine MK e MHK. In rosso sono segnati gli amminoacidi che conferiscono proprietà idrofile alla proteina, in blu quelli idrofobici. In giallo è invece sottolineata la quantità dei residui cisteinici: la cheratina MK, estratta per solfitolisi, mostra una maggiore percentuale proprio in conseguenza alla rottura dei punti disolfuro. (Dati provenienti dai laboratori di fiducia di Kerline s.r.l.).

Amino Acids	MK (mol%)	MHK (mol%)
CYA	0,175	0,1
<b>ASP</b>	6,97	12,5
SER	10,51	4,1
<b>GLU</b>	11,925	19,7
GLY	8,485	6,4
<b>HIS</b>	1,06	0,9
<b>ARG</b>	6,95	5,2
THR	6,245	1,8
ALA	5,24	7,1
PRO	6,515	5,6
<b>1/2CYS</b>	<b>10</b>	<b>1,6</b>
TYR	4,365	3,5
<b>VAL</b>	5,735	7,2
<b>MET</b>	0,405	0,5
<b>LYS</b>	2,955	6,2
<b>ILE</b>	3,245	4,5
<b>LEU</b>	6,72	10,4
<b>PHE</b>	2,51	2,6

Una volta ottenute, le particelle sono state analizzate per valutarne la stabilità e il comportamento in soluzione, oltre che l'efficienza di incapsulamento dei principi attivi. Riguardo a questi ultimi, è stata ritenuta opportuna una valutazione preliminare basata su una

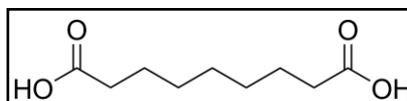
serie di osservazioni del mercato chimico-farmaceutico vigente, rivolgendo particolare attenzione a quei composti con bassa solubilità o solubilità nulla in mezzi acquosi, ma, allo stesso tempo, caratterizzate da importanti proprietà cosmetiche/farmacologiche.

Il sistema di drug delivery con proteine cheratinose applicato a questi principi attivi ha prodotto alcuni risultati validi per possibili sviluppi successivi e ottimizzazioni future.

## 4.2 Analisi di mercato preliminare

La parte iniziale del presente lavoro si è concentrata sulla valutazione del mercato farmaceutico e cosmetico, funzionale alla scelta dei principi attivi con cui procedere nella fase sperimentale. I parametri più importanti considerati durante questa analisi riguardano le caratteristiche chimico-fisiche della specie da incapsulare (con particolare attenzione alla sua solubilità e/o alla stabilità in ambiente acquoso) <sup>[23]</sup>, le sue proprietà benefiche che ne giustifichino l'interesse economico e i limiti associati alle formulazioni commercializzate. La ricerca di opportuni documenti e articoli è stata orientata sulla base di alcuni colloqui effettuati con rappresentanti di farmacie storiche e ben radicate sul territorio, oltre che figure specializzate del settore dermatologico: gli incontri sono stati finalizzati alla comprensione delle problematiche relative all'utilizzo e alla lavorazione in laboratorio di vari principi attivi, soprattutto per quanto concerne i loro utilizzi in formulazioni galeniche e dermocosmetiche. La conclusione di questa analisi ha permesso di selezionare una serie di composti potenzialmente interessanti, riportati di seguito.

### Acido azelaico (AA)

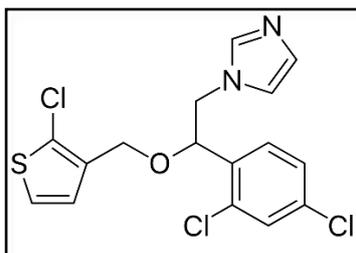


È un acido dicarbossilico naturalmente prodotto dalla *Malassezia furfur*, un lievito presente nella flora cutanea, ma trovato anche nei cereali, nella segale e nell'orzo, oltre che in altri prodotti di origine animale. Possiede proprietà antibatteriche, antiossidanti, cheratolitiche e comedolitiche. Presenta una solubilità minima in acqua (2,4 g/L a 20°C), mentre è facilmente solubile in etanolo e altri solventi organici come etere etilico.

In letteratura sono stati raccolti alcuni esempi di formulazione in creme al 20% di acido azelaico per il trattamento topico di varie malattie della pelle, tra cui l'acne: agisce infatti come



## Tioconazolo (TCZ)



È un derivato imidazolico usato come agente antimicotico: è infatti attivo contro funghi e lieviti e sono disponibili anche preparazioni topiche per trattare tigna, *Tinea cruris*, piede d'atleta e *Tinea versicolor*. Si tratta di uno dei prodotti più venduti del settore. Così come altri fungicidi imidazolici, il tioconazolo inibisce la sintesi di ergosterolo, uno sterolo precursore della vitamina D<sub>2</sub> e componente fondamentale per la stabilità meccanica delle membrane cellulari dei miceti, bloccando l'azione dell'enzima Sterolo 14- $\alpha$ -demetilasi (appartenente alla famiglia del citocromo P450), che, appunto, converte il lanosterolo in ergosterolo. La sua azione dunque aumenta la permeabilità della membrana cellulare del fungo, causandone la successiva morte. [28] Si presenta come un solido bianco scarsamente solubile in acqua (0.0165 mg/mL), mentre mostra buona affinità con solventi alcolici come metanolo ed etanolo (oltre che con composti clorurati). Sono state sviluppate terapie sia sistemiche che topiche a base di questo farmaco. Nonostante le prime risultino maggiormente efficaci, presentano numerosi limiti legati ai possibili effetti collaterali e alla farmacodinamica. [29]

Lo sviluppo di una formulazione per applicazioni topiche in grado di aumentare la "targettibilità" e la permeabilità del farmaco può considerarsi una scelta ottimale per rendere questo prodotto maggiormente competitivo nel mercato degli antifungini. In particolare le formulazioni a base di cheratina troverebbero impiego contro i dermatofiti, funghi parassiti di annessi cutanei e unghie sia negli uomini che negli animali.

### **4.3. Procedure sperimentali e analisi dei risultati**

In generale sono state rispettate le procedure convenzionalmente accettate e meglio ottimizzate presenti in letteratura. Per la parte sperimentale vedere Capitolo 3.

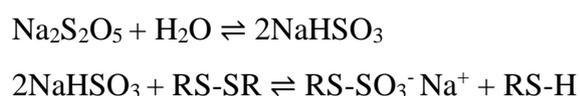
### 4.3.1. Estrazione di cheratina MK e MHK da scarti di lana greggia

Nei prossimi paragrafi verranno descritti i passaggi di estrazione di materiale cheratinoso nelle sue due forme, ad alto peso molecolare (MK) e idrolizzato (MHK). Ognuna di queste è stata caratterizzata tramite un'analisi della distribuzione dei pesi molecolari, sfruttando l'elettroforesi SDS-PAGE, e una valutazione tramite FTIR-ATR dei caratteristici moti vibrazionali prodotti dai gruppi funzionali delle catene laterali e dai legami interni delle catene polipeptidiche.

Di seguito vengono descritti nel dettaglio i processi di estrazione per entrambe le forme cheratinose.

#### Cheratina MK

La buona riuscita del processo di estrazione è interamente dipendente dalla reazione di solfitolisi. Essa consiste essenzialmente nell'ossidazione dei ponti disolfuro intra/intermolecolari presenti tra i residui di cisteina e nella conseguente loro rottura. Il reattivo usato per indurre tale reazione è il metabisolfito di sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), il quale produce due nuovi gruppi funzionali alle estremità del ponte: un tiolo (-SH) e uno definito sale di Bunte (-S-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Lo schema di reazione è il seguente:



Altri componenti che giocano un ruolo centrale sono l'urea e il SDS. La prima rigonfia le catene polipeptidiche, permettendo l'intercalazione del metabisolfito, e la sua azione è facilitata se la lana viene preventivamente spezzettata; il sodio dodecilsolfato, invece, agisce da tensioattivo e stabilizza la soluzione acquosa di proteina. Una volta rotto il legame S-S, la cheratina diventa facilmente solubile in acqua.

La rimozione di resti solidi in sospensione e di sali presenti in soluzione avviene attraverso due step di purificazione: un primo di filtrazione mediante due filtri a diverso dimensionamento (5-30 micron) per eliminare i residui istologici (capaci di indurre la cristallizzazione della cheratina solubilizzata) e un successivo passaggio in membrana di dialisi per separare i sali utilizzati per l'estrazione. Durante questa fase è stato riscontrato che l'inversione dei due step può

pregiudicare la purezza del materiale cheratinoso ottenuto e comportare quindi tempi di lavorazione maggiori nella fase di dialisi.

Complessivamente sono state registrate rese tra il 30% e il 50%.

### **Cheratina MHK**

Come già accennato prima, la forma idrolizzata è stata ottenuta mediante un'idrolisi basica con idrossido di sodio (0.5N). In conformità con i principi del modello economico circolare, il design del processo è stato rielaborato in modo da riciclare gli scarti di lana non estratti per solfitolisi (Fig. 13) e riutilizzarli come materiale di partenza. È stato così possibile minimizzare gli sprechi e ridurre i costi relativi all'acquisto di materia prima; inoltre, le rese ottenute si attestano su valori tali da considerare questa via di produzione come una valida scelta.

Nonostante la semplicità del processo, il tempo di conduzione è risultato un parametro delicato: esso infatti non deve superare le 2 ore per evitare l'eccessiva frammentazione delle catene della proteina, cosa che ne provocherebbe la perdita in fase di purificazione (identica a quella seguita per la MK). Per verificare che ciò non sia accaduto, è stato sperimentato l'utilizzo di una seconda membrana di dialisi con *cut-off* inferiore (3.5 kDa) e sono state confrontate le rese calcolate su due aliquote di uno stesso lotto. I risultati non hanno evidenziato alcuna differenza netta ( $R(\%) = 43.3\sim 43.7\%$ ); perciò la frammentazione non ha prodotto catene a peso molecolare troppo basso.

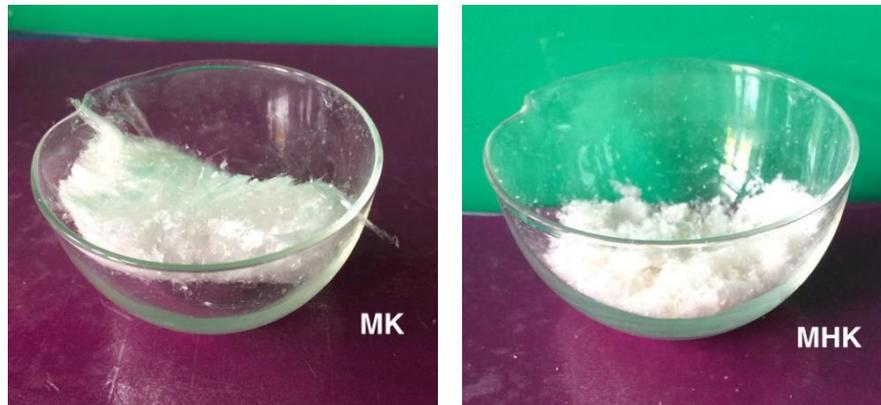
Sono state collezionate rese totali tra il 16% e il 44%. L'ampio range è proprio dovuto alla quantità variabile di scarti recuperati dalla solfitolisi.



*Figura 13. Scarti di lana non estratta in seguito a solfitolisi e recuperata per ottenere cheratina idrolizzata.*

### 4.3.2. Caratterizzazione delle cheratine MK e MHK

I lotti di cheratina ottenuti (Fig. 14-15) sono stati caratterizzati tramite elettroforesi e spettroscopia infrarossa.



*Figure 14-15. Campioni di cheratina MK (sinistra) e MHK (destra) estratti da lana greggia e liofilizzati.*

### Elettroforesi SDS-PAGE

La determinazione dei pesi molecolari di MK e MHK è stata effettuata tramite elettroforesi SDS-PAGE, una particolare variante della tecnica analitica eseguita su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato; questo agisce da tensioattivo, denaturando le catene proteiche e permettendone la separazione nel momento in cui viene applicato un campo elettrico sul gel.

I risultati (Fig. 16), non si discostano con quelli già presenti nell'archivio aziendale. Per quanto riguarda in particolare la cheratina MHK, i valori ottenuti sono stati considerati tali da giustificare l'utilizzo del materiale cheratinoso.

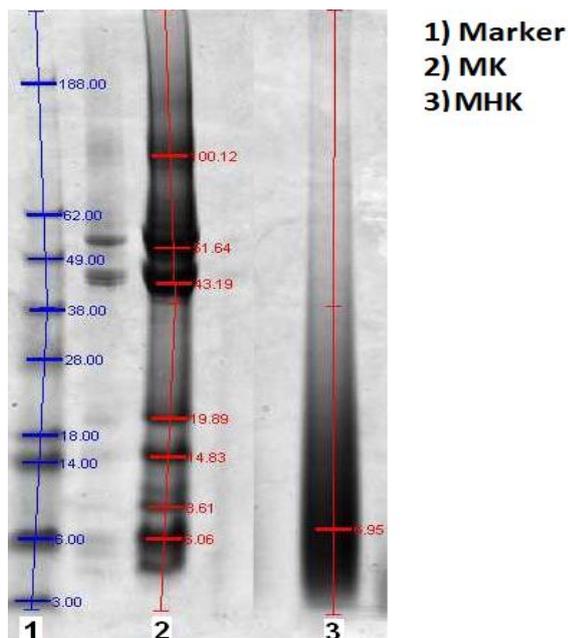


Figura 16. Distribuzione elettroforetica dei pesi molecolari per cheratina MK (a sinistra) e MHK (centrale) a confronto con un marker (a sinistra).

## FTIR-ATR

Per indagare la composizione chimica delle cheratine estratte sono stati raccolti le corrispondenti caratterizzazioni tramite spettri ATR (Fig.17-18-19).

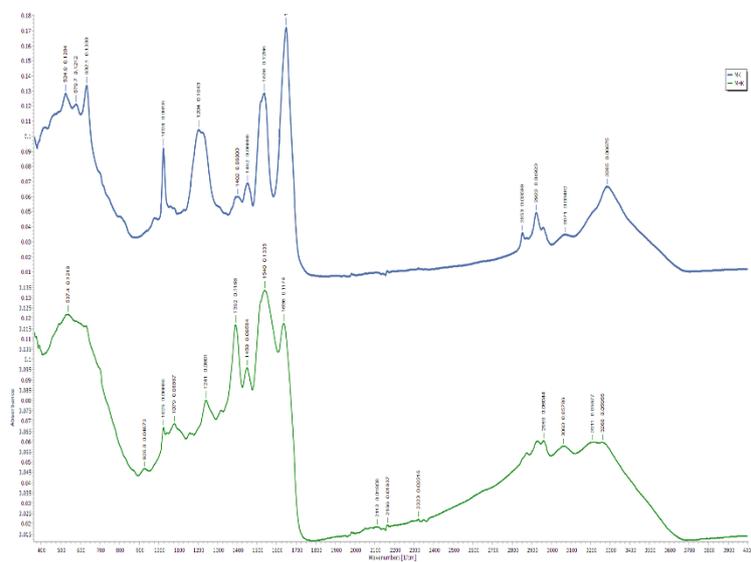


Figura 17. Spettro ATR di cheratine MK (blu) e MHK (verde).

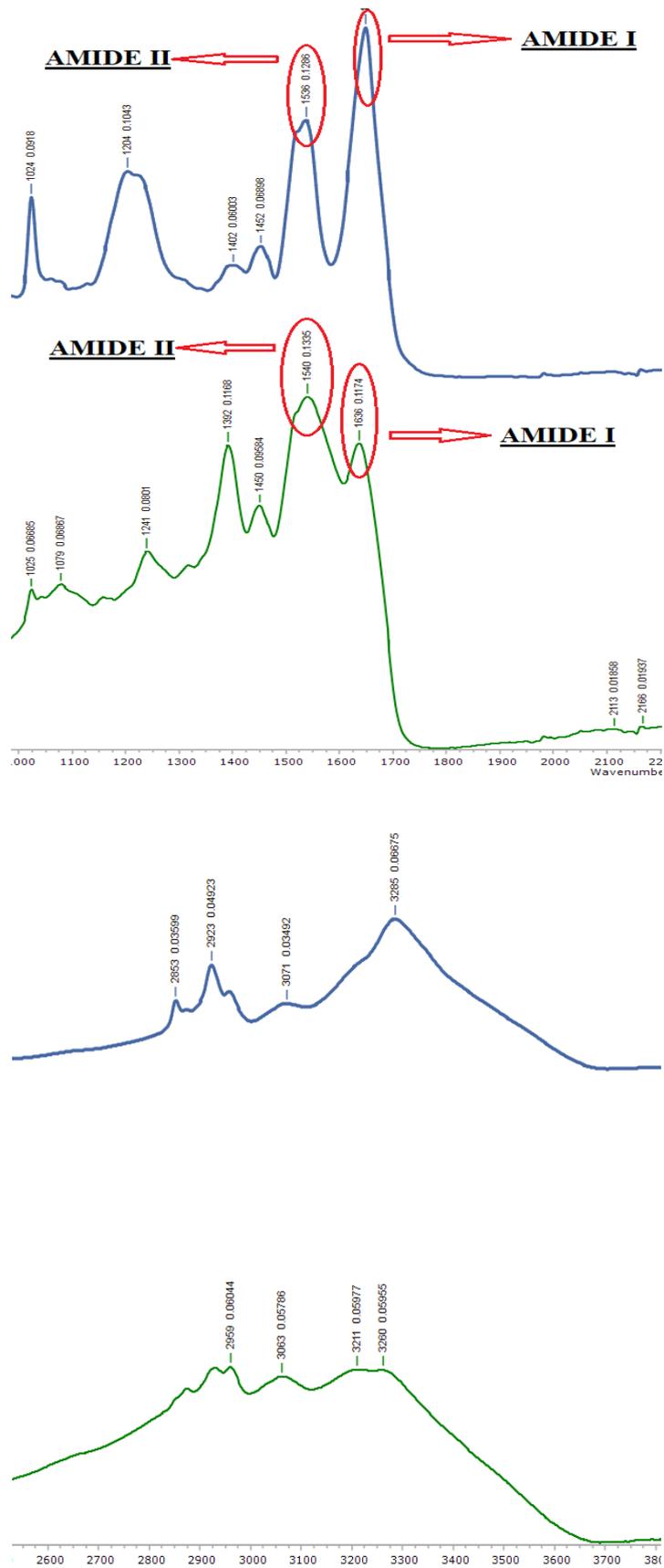


Figure 18-19. Particolari degli spettri ATR di chertine MK (blu) e MHK (verde).

Entrambi gli spettri mostrano i classici picchi della cheratina, ovvero quelli relativi al legame peptidico:

- Amide A ( $3800\text{--}3120\text{ cm}^{-1}$ ) dovuta alla vibrazione di stretching N-H;
- Amide I ( $1650\text{ cm}^{-1}$  circa) dovuta alla vibrazione di stretching C=O;
- Amide II ( $1530\text{ cm}^{-1}$  circa) dovuta alla vibrazione di bending C-O e N-H;
- Amide III ( $1300\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$ ) legata alla combinazione in fase delle vibrazioni di stretching C-N e di bending N-H;
- Il picco intenso a circa  $1025\text{ cm}^{-1}$  è dovuto alla vibrazione di stretching simmetrico S=O del sale di Bunte.

Quest'ultimo normalmente sarebbe presente nella sola cheratina estratta mediante solfitolisi, tuttavia si osserva anche nel caso della forma idrolizzata (picco di minore intensità) in quanto il materiale di partenza è proprio lo scarto derivante dalla prima estrazione. Il fatto che le intensità dei picchi dell'Amide I e dell'Amide II siano invertite nella idrolizzata (Amide II più intensa della Amide I) significa che i legami peptidici si sono rotti e la proteina si è degradata.

#### **4.3.3. Sviluppo della serie di caricamenti dei principi attivi su cheratina**

Nei successivi paragrafi vengono elencati i diversi caricamenti dei principi attivi sulle due forme di cheratina. In generale sono stati dedicati studi più approfonditi sulla capacità di incapsulamento della cheratina MK, in quanto, avendo alle spalle una letteratura più “corposa” e mostrando elevata affinità con la cheratina presente nei tessuti cutanei, è potenzialmente oggetto di maggiore interesse per formulazioni ad uso topico. La forma idrolizzata è stata comunque testata con ogni API, in modo da valutarne le possibili applicazioni nel campo dei DDS.

Ogni serie sviluppata ha permesso di ricavare alcune informazioni sul comportamento e la stabilità delle sospensioni colloidali in soluzione acquosa.

##### **4.3.3.1. Caricamento di acido azelaico su cheratina MK/MHK**

Per entrambe le cheratine sono state innanzitutto valutate le condizioni ideali di *self-assembly*, che sono essenzialmente dipendenti dal valore della concentrazione micellare critica. Per MK è stato preso come riferimento lo studio riportato nel brevetto aziendale ( $C_{MK} = 5\text{mg/mL}$ ); su MHK, in mancanza di letteratura, sono state effettuate alcune prove per valutare la quantità idonea.

La serie di loading su MK è stata sviluppata variando la quantità di acido azelaico dal 20% w/w fino al 100% w/w rispetto alla massa di cheratina (Fig. 20-21). A concentrazioni crescenti del principio attivo aggiunto corrisponde un'opacizzazione progressiva della soluzione, con comparsa esigua di precipitato nel caso dei caricamenti maggiori (in particolare tra il 75% e il 100%).



*Figura 20. Serie di caricamenti di acido azelaico su cheratina MK.*



*Figura 21. Serie di caricamenti di acido azelaico su cheratina MK dopo liofilizzazione.*

Sono poi stati testati dei caricamenti con MHK a 20mg/mL e a 40mg/mL. La scelta di concentrazioni maggiori rispetto a MK è motivata dai pesi molecolari inferiori; è stato quindi ritenuto opportuno usare quantità maggiori per indurre l'assemblamento in presenza dell'API. Il caricamento ha prodotto il medesimo effetto di opacizzazione.

#### **4.3.3.2. Caricamento di $\alpha$ -tocoferolo acetato su cheratina MK/MHK**

Sono state considerate le medesime quantità di proteina menzionate nel paragrafo 4.3.3.1. In questo caso la serie di loading su MK è stata interrotta all'80%w/w: lo scopo principale infatti è stato quello di valutare la capacità del sistema cheratina-vitamina di formare nanoparticelle, o, per meglio dire, nanoemulsioni (essendo il tocoferolo un olio insolubile in acqua) per valutare la possibilità di eseguire caricamenti doppi con AA.

Lo stesso studio di compatibilità, sebbene più limitato, è stato condotto per MHK. Rispetto alle prove con AA è stata preferita la quantità maggiore di cheratina (40mg/mL).

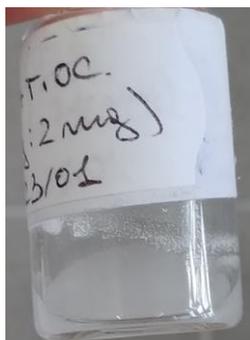
In tutti i campioni si osserva un'opacizzazione netta, confermando la formazione di un'emulsione "oil-in-water".

#### **4.3.3.3. Caricamento doppio di acido azelaico + $\alpha$ -tocoferolo acetato su cheratina MK**

Lo studio di affinità tra API e cheratina ad alto peso molecolare è stato implementato con la realizzazione di una serie di caricamenti duplici di acido azelaico e vitamina E, mantenendo costante la quantità di quest'ultima (2mg, valore scelto in base ai risultati osservati nei caricamenti singoli). Da una prima osservazione non si riscontrano particolari differenze rispetto alle sospensioni precedenti, a dimostrazione della elevata compatibilità di MK con entrambi i principi attivi.

#### **4.3.3.4. Caricamento di tioconazolo su cheratina MK/MHK**

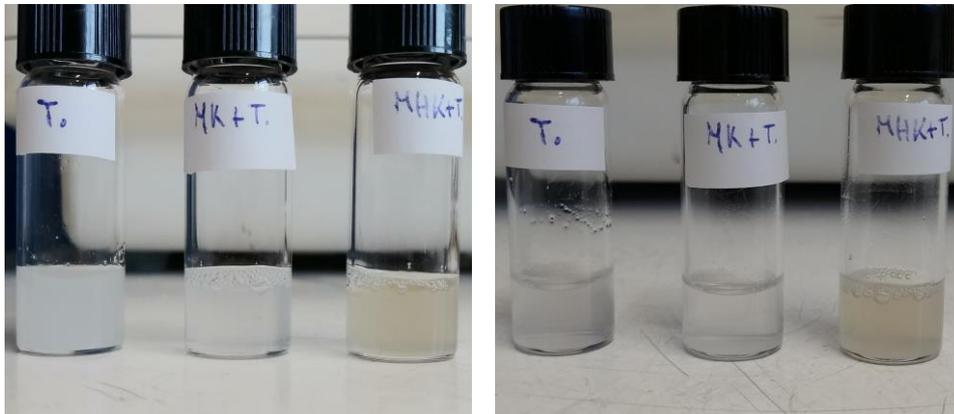
In questo caso il range di caricamento di TCZ su MK è meno ampio (5%-20%), poiché a percentuali superiori il composto precipita quasi totalmente (Fig.22); il motivo di ciò è da ricercare nella capacità relativamente limitata della cheratina di stabilizzare in una fase polare il tioconazolo, il quale presenta infatti una solubilità pressoché nulla in acqua.



*Figura 22. Sospensione colloidale di tioconazolo (2mg) caricato su cheratina MK. Come mostrato nella foto, la precipitazione è abbondante, a dimostrazione dell'accentuata instabilità del sistema.*

Vista la ridotta compatibilità, è stato ritenuto opportuno preparare in parallelo 3 campioni: due contenenti MK e MHK caricati con TCZ; uno con il solo TCZ sospeso in acquoso.

Le sospensioni sono state lasciate a riposo per 24h e i risultati visivi (Fig.23-24-25) hanno reso evidente la tendenza, comunque persistente, della cheratina a interagire con il tioconazolo.



*Figure 23-24. Test di compatibilità tra cheratina e tioconazolo (1mg). A sinistra i campioni appena caricati; a destra gli stessi dopo 24 ore. Risulta evidente come entrambe le forme di cheratina siano in grado di mantenere in fase acquosa il tioconazolo, a differenza di quanto accade nel caso del semplice composto disperso in acqua (provetta "T").*



*Figura 25. Particolare dei campioni contenenti il solo tioconazolo (sinistra) e le particelle di cheratina MK caricate (destra).*

#### **4.3.4. Caratterizzazione dei sistemi particellari cheratina-API**

Le sospensioni colloidali ottenute sono state caratterizzate determinando una serie di parametri. Anzitutto, per tutti i campioni è stata valutata la natura del sistema particellare attraverso Dynamic Light Scattering (DLS) e Potenziale Z (PALS). Successivamente sono stati sviluppati alcuni metodi di analisi ottimizzati ad hoc per le micro e nanoparticelle formate. Questa seconda parte di lavoro si è focalizzata in particolare sullo studio della stabilità e del comportamento in soluzione del sistema di cheratina MK caricata con TCZ. La scelta è stata influenzata dai limiti stessi del principio attivo, che è minimamente solubile in acqua (fattore che permette una valutazione più attendibile dell'efficacia di incapsulamento); inoltre, dal momento che il

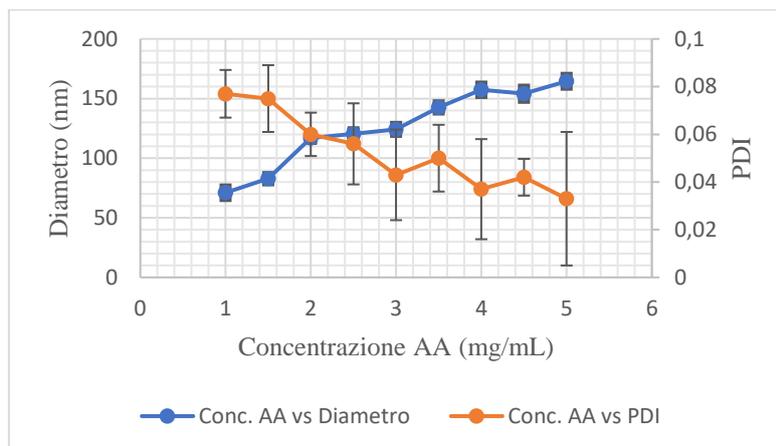
composto è inserito in un ampio mercato suddiviso fra vari agenti fungicidi, la valorizzazione di una sua preparazione finale costituirebbe un elemento di competitività netta.

#### 4.3.4.1. Analisi DLS

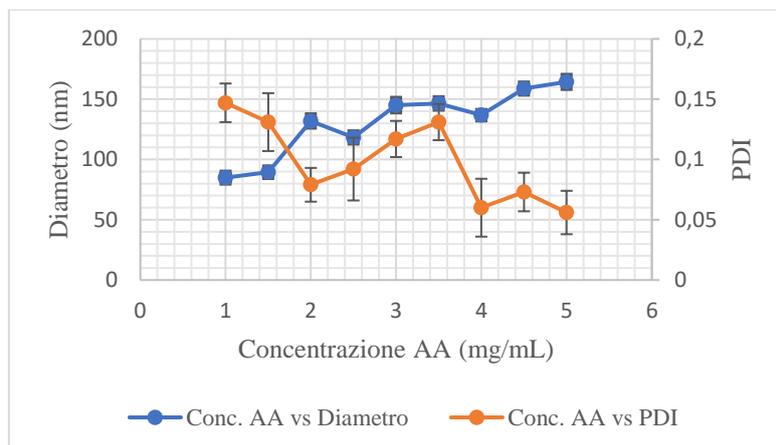
Le analisi al DLS hanno permesso di misurare i diametri e gli indici di polidispersione (PDI) delle micro e nanoparticelle; è stato così possibile osservare gli andamenti dimensionali delle serie di caricamenti effettuati. Nello specifico, per i caricamenti di AA e di AA/VIT.E su MK sono stati raccolti dati sulle stesse particelle dopo liofilizzazione e successiva sospensione in acqua.

#### AA

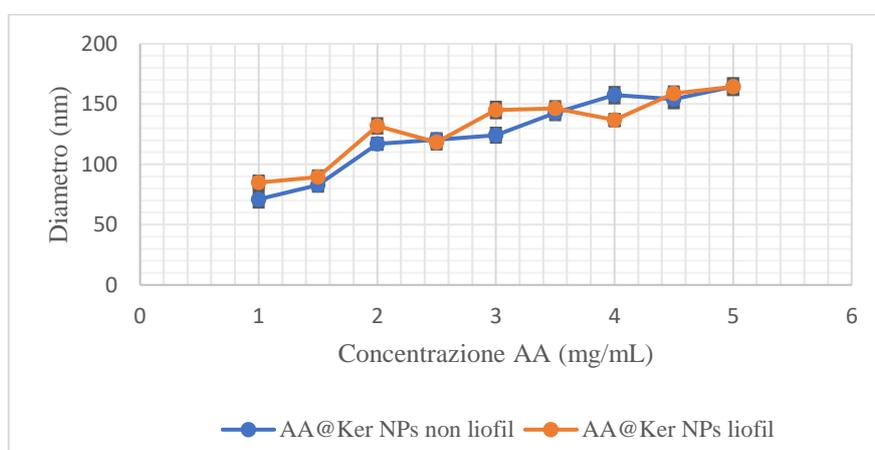
Si riportano di seguito i risultati degli studi effettuati tramite tecnica DLS su nanoparticelle di cheratina MK caricata con acido azelaico.



*Grafico 1. Andamento dei diametri e dei PDI in funzione del caricamento di acido azelaico.*



*Grafico 2. Andamento dei diametri e dei PDI in funzione del caricamento di acido azelaico dopo liofilizzazione.*



*Grafico 3. Confronto dei diametri di nanoparticelle di acido azelaico e cheratina appena ottenute e dopo liofilizzazione.*

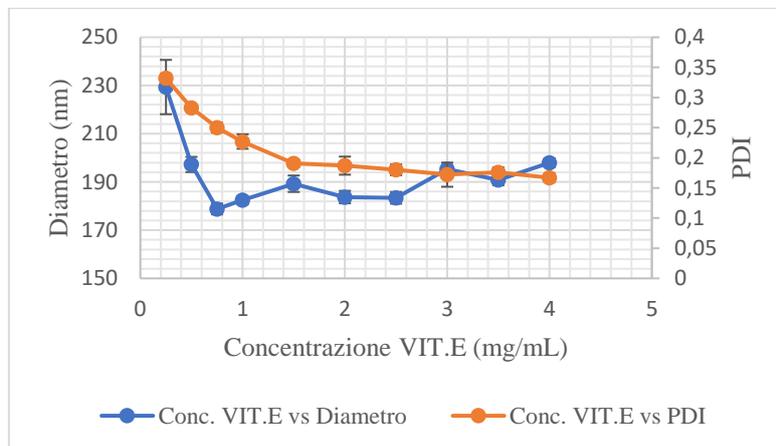
Tutte le sospensioni colloidali, appena formate mostrano una distribuzione dimensionale molto prossima alla monodispersione (Graf. 1); anche dopo liofilizzazione i valori rimangono in un intorno ottimale (< 0.200, Graf. 2). I diametri crescono proporzionalmente alla quantità di composto caricato e i valori rimangono pressoché invariati sia prima che dopo la risospensione (Graf. 3). Complessivamente sono state ottenute particelle di dimensioni nanometriche stabili e poco inclini ad aggregare.

I valori relativi alle sospensioni colloidali a base di MHK non sono stati inseriti in quanto non attendibili (diametri > 10000 nm e PDI > 1.0).

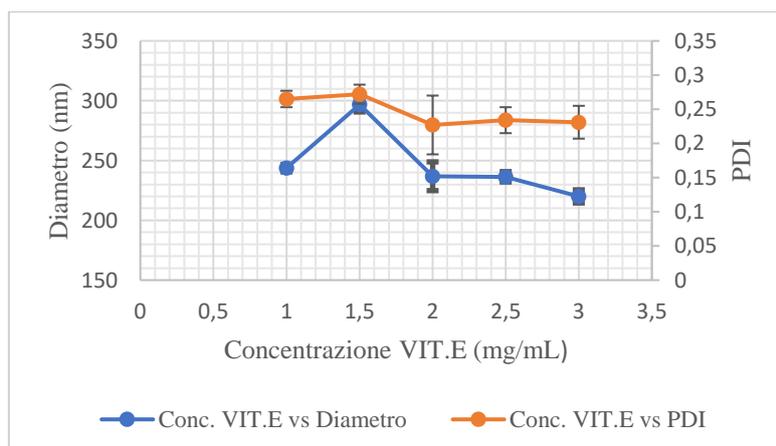
## **VIT.E**

Entrambi i grafici mostrano la tendenza della vitamina E acetato a formare facilmente microemulsioni, (non “nano” in quanto le misure sono maggiore di 100 nm) in ambiente polare. Nonostante anche i campioni in assenza di cheratina abbiano dato risultati accettabili,

l'interazione con la proteina favorisce la formazione di “gocce” più piccole e uniformi, soprattutto all'aumentare del caricamento: i colloidi tendono via via a minimizzare infatti il loro dimensionamento, fino a mantenersi quasi invariati, come si può notare nella “coda” delle curve.



**Grafico 4.** Andamento dei diametri e dei PDI in funzione del caricamento di  $\alpha$ -tocoferolo acetato su cheratina MK.

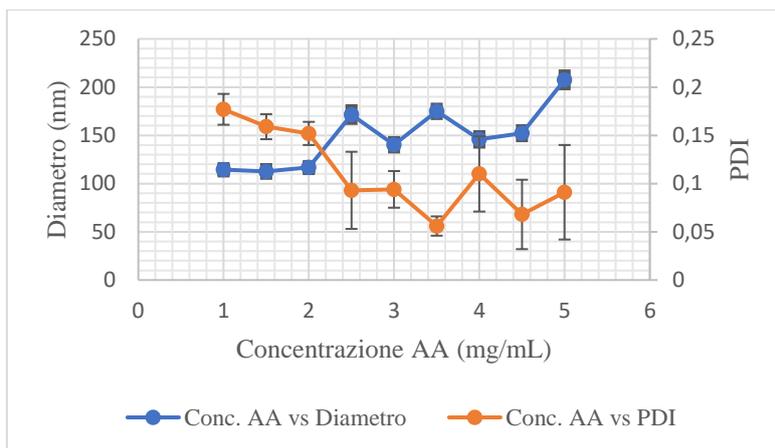


**Grafico 5.** Andamento dei diametri e dei PDI in funzione del caricamento di  $\alpha$ -tocoferolo acetato su cheratina MHK.

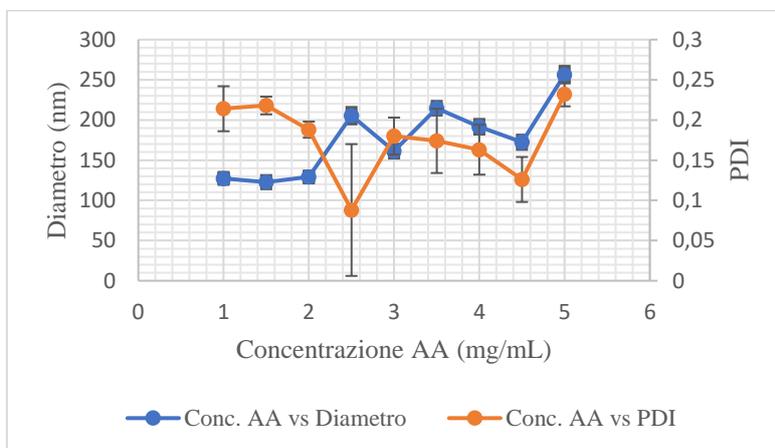
Dai grafici si può comprendere la scelta di considerare il caricamento di 2 mg/mL di vitamina E per la parte di studio dei sistemi a doppio loading. A tale concentrazione, infatti, il principio attivo ha ottimizzato la sua capacità aggregante e presenta un dimensionamento interessante per l'applicazione a preparazioni per uso cutaneo (a livello normativo diametri inferiori ai 100 nm potrebbero costituire un problema per la troppa elevata penetralità transdermica).

### **AA+VIT.E**

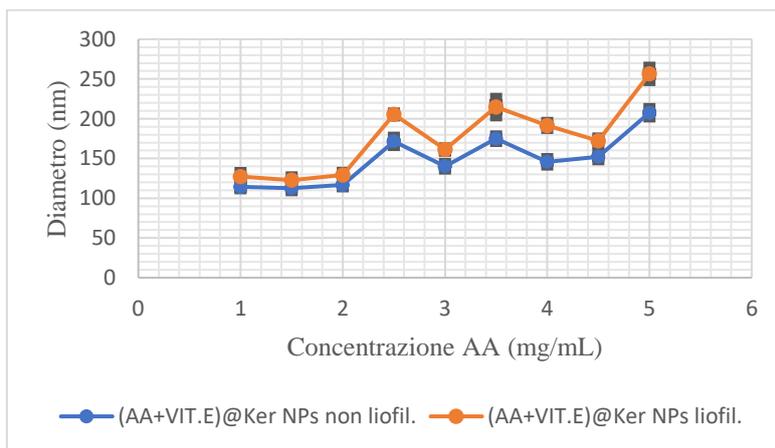
Il doppio caricamento è stato valutato solo per il caso di cheratina MK.



**Grafico 6.** Andamento dei diametri e dei PDI in funzione del caricamento di acido azelaico  $\alpha$ -tocoferolo acetato (2mg) su cheratina MK.



**Grafico 7.** Andamento dei diametri e dei PDI in funzione del caricamento di acido azelaico  $\alpha$ -tocoferolo acetato (2mg) su cheratina MK dopo liofilizzazione.

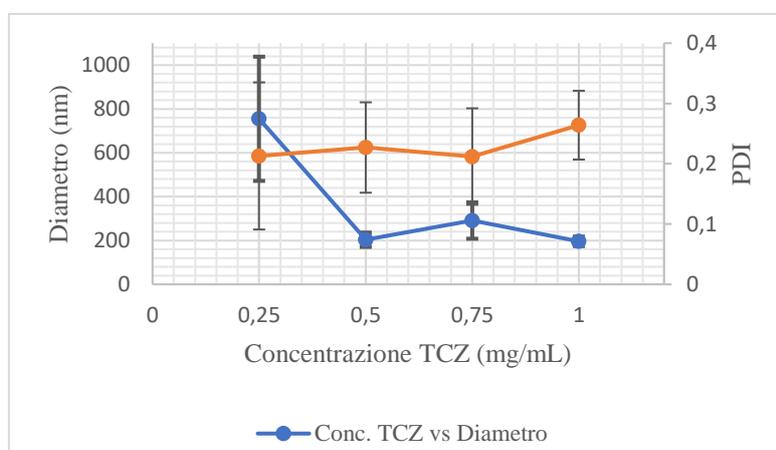


**Grafico 8.** Confronto dei diametri di microparticelle di acido azelaico,  $\alpha$ -tocoferolo acetato (2mg) e cheratina appena ottenute e dopo liofilizzazione.

Le misure hanno mostrato nuovamente un andamento crescente nei diametri in proporzione all'aumento di concentrazione di acido azelaico, ed è interessante notare come i diametri delle particelle appena formate (Graf. 6) siano inferiori, o al più prossimi, ai valori registrati per le microemulsioni ottenute con la sola vitamina E acetato (Graf. 4). Non sono state riscontrate particolari differenze in seguito a liofilizzazione, ad eccezione di un minimo aumento delle dimensioni delle microparticelle (Graf. 8).

## **TCZ**

Di seguito è riportata la serie di caricamenti su cheratina MK (Graf. 9).



*Grafico 9. Andamento dei diametri e dei PDI in funzione del caricamento di tioconazolo su cheratina MK.*

Le sospensioni, ad esclusione della prima (0,25 mg/mL), mantengono dimensioni costanti, tra i 200-250 nm. A differenza dei casi precedenti, tutti le medie relative alle misure dei PDI presentano elevati valori di dispersione; inoltre, alcune misurazioni sui diametri non sono risultate attendibili (i valori sono stati omessi nel calcolo delle medie e delle deviazioni standard). Analisi di caricamenti su cheratina idrolizzata non hanno portato a risultati riproducibili a causa dell'elevato range di diametri registrati (800-210500 nm).

### **4.3.4.2. Analisi PALS**

È stato misurato il potenziale Z ( $\zeta$ ) di ogni sospensione colloidale (con concentrazione standard di API pari a 1mg/mL). I valori sono stati poi confrontati con soluzioni di riferimento di entrambe le cheratine. Questa analisi ha fornito ulteriori informazioni sull'entità delle cariche superficiali dei sistemi particellari e quindi sulla stabilità dei colloidi prodotti.

## **AA**

$$\zeta_{(AA@MK)} = -38.38\text{mV} \pm 1.10$$

$$\zeta_{(AA@MHK)} = -46.90\text{mV} \pm 1.24$$

## **VIT.E**

$$\zeta_{(VIT.E@MK)} = -71.71\text{mV} \pm 1.47$$

$$\zeta_{(VIT.E@MHK)} = -80.14\text{mV} \pm 2.49$$

## **TCZ**

$$\zeta_{(TCZ@MK)} = -69.01\text{mV} \pm 3.43$$

$$\zeta_{(TCZ@MHK)} = -59.26\text{mV} \pm 2.28$$

## **MK/MHK**

$$\zeta_{(MK)} = -55.78\text{mV} \pm 1.31$$

$$\zeta_{(MHK)} = -60.40\text{mV} \pm 1.98$$

Complessivamente tutti i campioni hanno registrato potenziali sopra ai  $|30|\text{mV}$ , chiaro segno di stabilità, e negativi come previsto. Inoltre, tutti i valori misurati per i colloidi sono superiori a quelli relativi alle soluzioni di riferimento, a dimostrazione dell'avvenuta formazione dei sistemi particellari.

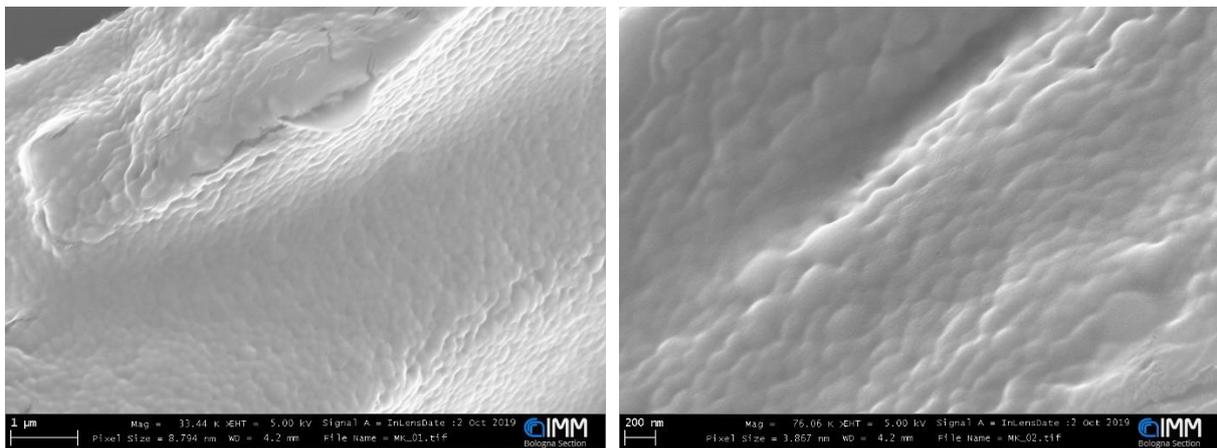
Un altro aspetto interessante emerso è la tendenza delle nanoparticelle di cheratina e acido azelaico ad assumere valori inferiori (in valore assoluto) rispetto a quelli delle altre sospensioni. La ragione di ciò è probabilmente da ricercare nella parziale dissociazione acida in acqua da parte del principio attivo ( $\text{p}k_a = 4.55$ ), cosa che giustificerebbe una diminuzione dell'intensità della carica negativa.

### **4.3.4.3. Imaging di micro e nanoparticelle tramite Microscopia elettronica SEM**

Per studiare la natura morfologica dei sistemi particellari prodotti, sono state osservate al microscopio elettronico SEM alcune sospensioni colloidali di riferimento. In particolare è stato analizzato un campione per ogni API fin qui caratterizzato.

## **AA + MK**

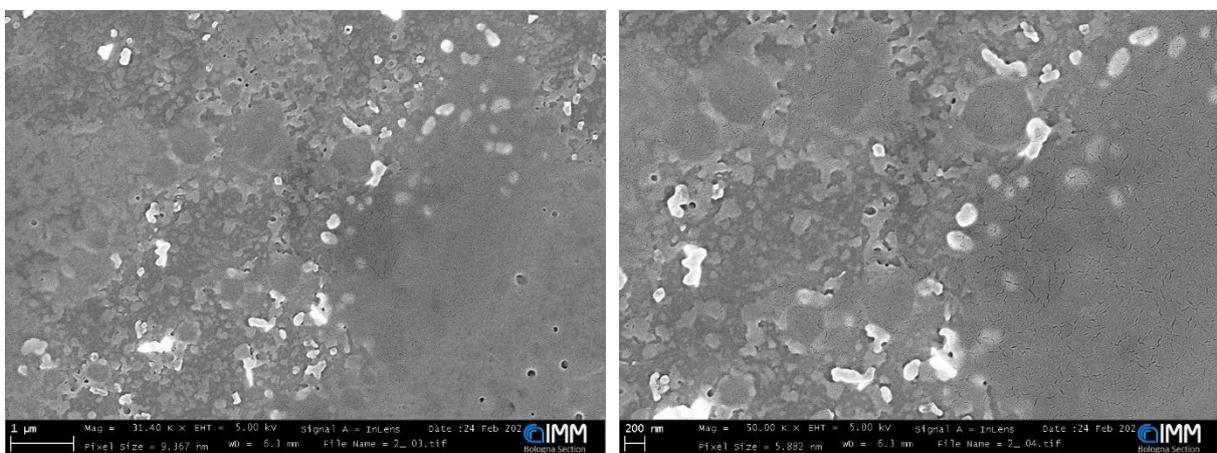
Per l'acido azelaico è stato preso in considerazione il campione a caricamento da 1 mg. Dalle immagini sottostanti (Fig. 26-27) si può notare che il campione analizzato al SEM era troppo concentrato e nella fase di asciugatura ha formato un film, dove sono comunque evidenti strutture particellare inglobate.



*Figure 26-27. Immagini SEM a diverso ingrandimento (1 μm, a sinistra; 200 nm a destra) di nanoparticelle acido azelaico (1 mg/mL) e cheratina MK.*

## **VIT.E + MK**

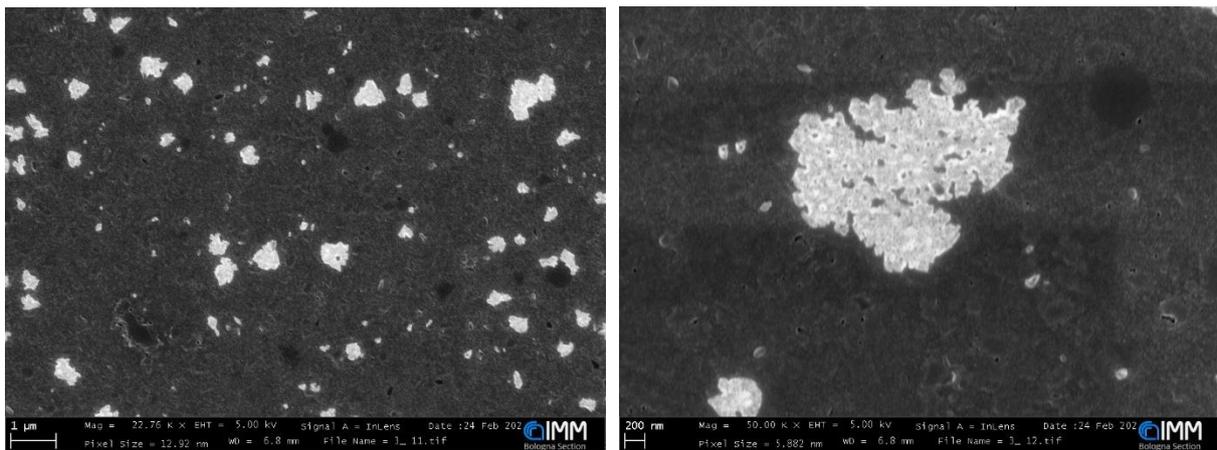
Come mostrato sotto (Fig. 28-29), la morfologia superficiale delle microparticelle caricate con vitamina E acetato (2 mg/mL) ha prodotto una dispersione oleosa tipica delle emulsioni, dove si evidenziano formazioni nanoparticellari bianche di diametro intorno ai 200nm (compatibile con le misure eseguite al DLS).



*Figure 28-29. Immagini SEM a diverso ingrandimento (1 μm, a sinistra; 200 nm a destra) di microparticelle di α-tocoferolo acetato (2 mg/mL) e cheratina MK.*

## **TCZ + MK**

Le immagini raccolte delle microparticelle di tioconazolo (Fig. 30-31) sono coerenti con quanto registrato dalle analisi tramite DLS: infatti la morfologia estremamente irregolare delle superfici e la notevole dispersione dimensionale spiegherebbero la difficoltà dello strumento (par. 4.3.4.1.) a determinare una misura univoca e maggiormente ripetibile (le analisi basate sul fenomeno del *Dynamic Light Scattering* sfruttano modelli matematici che sostanzialmente approssimano le particelle rilevate a forme sferiche).



*Figure 30-31. Immagini SEM a diverso ingrandimento (1 µm, a sinistra; 200 nm a destra) di nanoparticelle di tioconazolo (1 mg/mL) e cheratina MK.*

### **4.3.5. Focus su caratterizzazione di microparticelle contenenti tioconazolo caricato su cheratina MK**

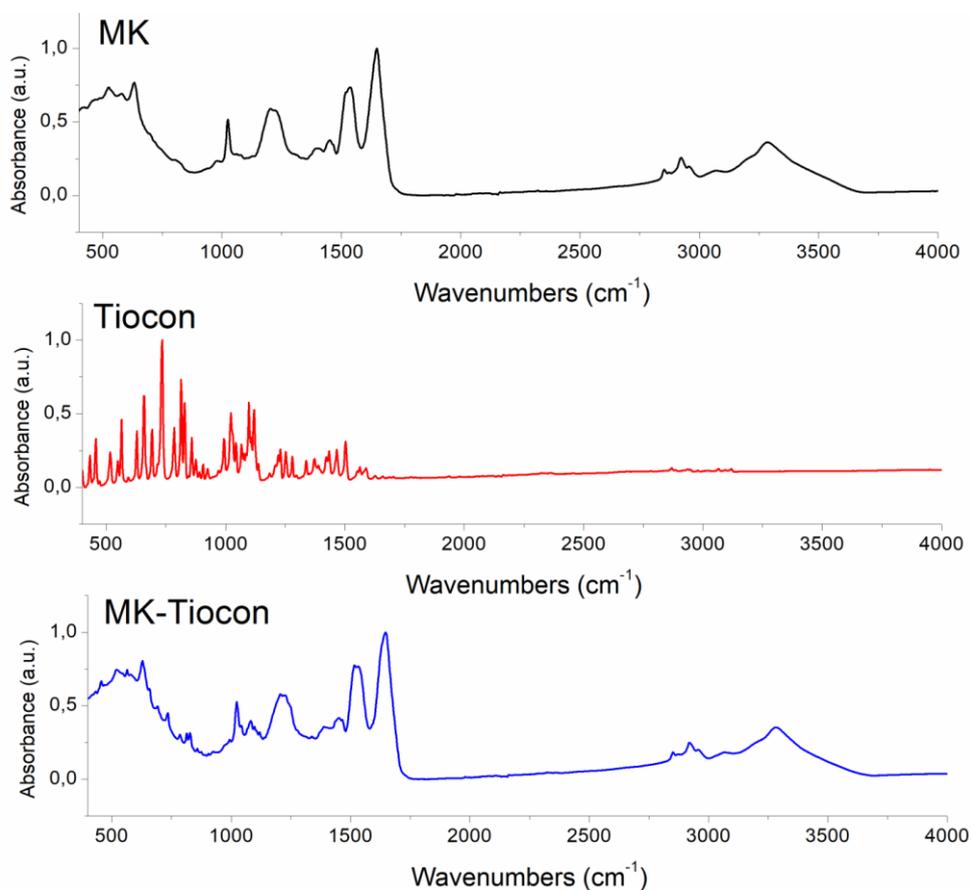
Considerate le potenzialità del materiale cheratinoso nello sviluppo di formulazioni con principi attivi fungicidi, è stato ritenuto opportuno approfondire la caratterizzazione dei sistemi particellari formati con tioconazolo.

#### **4.3.5.1. Caratterizzazione della struttura particellare tramite spettroscopia FTIR-ATR**

Le microparticelle contenenti tioconazolo sono state caratterizzate tramite spettroscopia FTIR-ATR, in modo da confrontare la struttura della sola cheratina MK con quella contenente il principio attivo (Fig. 32). In figura è anche mostrato lo spettro del tioconazolo, in cui si possono osservare alcuni picchi caratteristici (la determinazione è complessa ed è stata fatta individuando alcuni range tipici):

- Stretching dei C-H alifatici e aromatici nella regione 3150-2850  $\text{cm}^{-1}$  (picchi poco accentuati)
- Lo stretching dei legami C=N dei gruppi imidazolici intorno a 1560  $\text{cm}^{-1}$
- Picchi nella regione compresa tra 1100-1000  $\text{cm}^{-1}$  relativi alle vibrazioni del legame C-O-C
- Stretching dei legami C-Cl e C-S, i quali generano picchi piuttosto intensi nella regione tra 800-600  $\text{cm}^{-1}$

Le regioni appena elencate sono parzialmente visibili anche nello spettro relativo alle microparticelle.



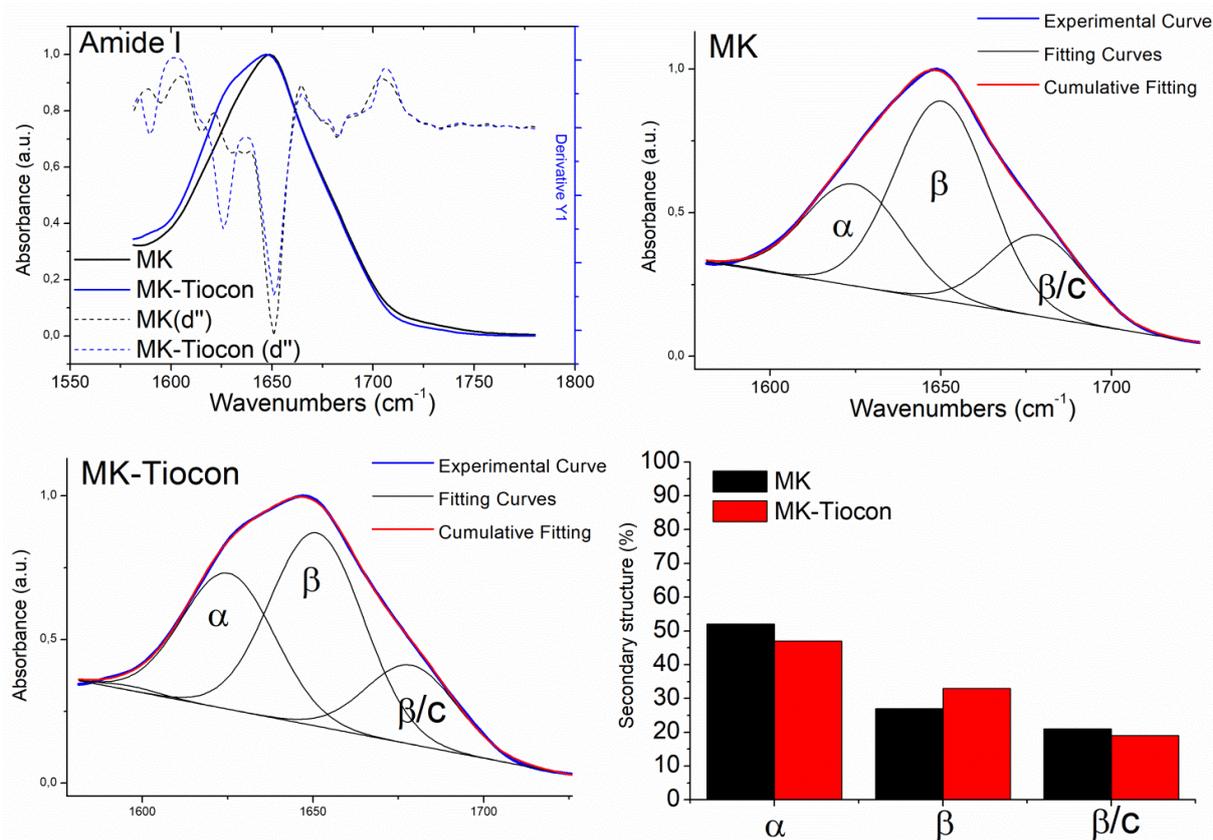
*Figura 32. Spettri ATR della cheratina, del tioconazolo e delle microparticelle di cheratina caricate con tioconazolo. L'ultimo di questi mostra i picchi caratteristici sia della cheratina che del tioconazolo.*

Dal momento che la regione spettrale dell'Amide I ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) della proteina non è disturbata dai picchi di assorbimento del tioconazolo, gli spettri IR possono essere usati per determinare la struttura secondaria della proteina libera e in forma di nanoparticella indotta da interazione con tioconazolo.

Infatti, in virtù dell'elevata sensibilità alle piccole variazioni della geometria molecolare indotta da modifiche dell'intorno chimico del legame C=O, la forma Amide I può essere usata per comprendere la conformazione strutturale della proteina.

A tal fine, la regione dell'Amide I sia della cheratina che della microparticella di cheratina con tioconazolo è stata risolta con delle bande Gaussiane, il cui numero e posizione sono state determinate mediante analisi in derivata seconda. Le percentuali relative delle strutture secondarie sono state calcolate attraverso le aree delle bande Gaussiane usate per risolvere l'Amide I (Fig. 33).

Come si può osservare dall'istogramma in figura, la formazione di microparticelle indotta porta ad una leggera diminuzione delle strutture  $\alpha$ -elica della cheratina con conseguente aumento delle strutture  $\beta$ -foglietto, più compatte.



**Figura 33.** Studio della variazione strutturale della cheratina e della microparticella di cheratina caricata con tioconazolo: in alto a sinistra viene applicato un modello matematico in derivata seconda sulle curve degli spettri relative all'Amide I; in alto a destra e in basso a sinistra vengono illustrate le bande Gaussiane risultanti che esprimono quantitativamente le diverse conformazioni interne alla proteina (da sola e in microparticella); infine, in basso a destra vengono riportati gli istogrammi delle percentuali delle strutture presenti.

#### 4.3.5.2. Determinazione dell'Efficienza di incapsulamento (E.E.) e valutazioni preliminari di rilascio di TCZ caricato su cheratina (MK)

Questa parte di caratterizzazione è stata preceduta dalla costruzione di una retta di calibrazione (Graf. 10) per individuare le corrette quantità di tioconazolo incapsulato e rilasciato. La curva è stata ricavata mediante spettroscopia UV-Vis, dall'analisi delle assorbanze prodotte da una serie di soluzioni (in metanolo) a diversa concentrazione.

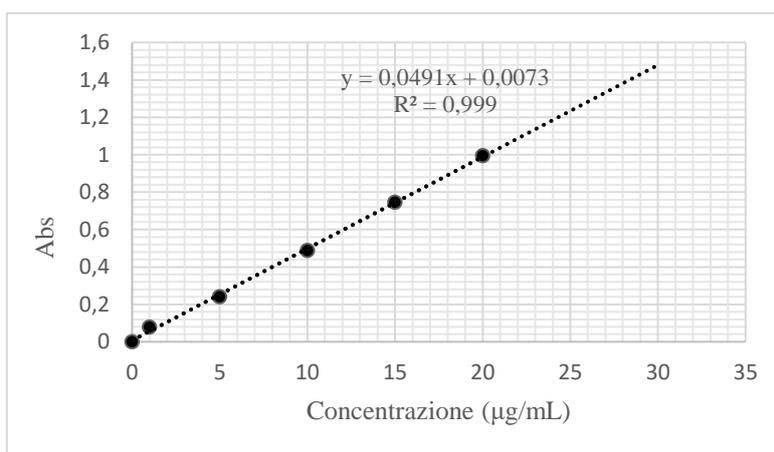


Grafico 10. Curva di calibrazione di tioconazolo in metanolo.

#### Efficienza di incapsulamento

La E.E. è stata stimata su un totale di tioconazolo pari a 0.75mg: a questa quantità infatti i campioni di microparticelle non presentano fenomeni di netta precipitazione.

Per la conduzione della fase sperimentale è stata sfruttata la tendenza delle particelle di cheratina a precipitare se sottoposte ad una forza centrifuga; facendo questo su un'aliquota della sospensione, inserita in un apposito filtro (porosità 100kDa), è stato possibile separare dal resto la parte di principio attivo non inglobata. In seguito al passaggio in liofilizzatore, quest'ultima è stata recuperata con metanolo (1mL) ed è stata calcolato il parametro E.E. usando la formula seguente:

$$E. E. (\%) = \frac{M_{tot}(TCZ) - M_{free}(TCZ)}{M_{tot}(TCZ)} \times 100$$

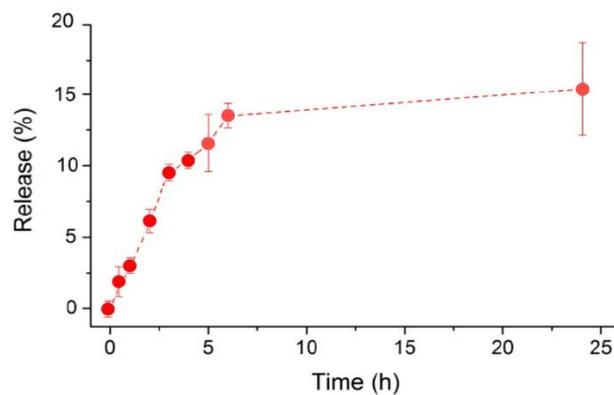
Il risultato finale ottenuto è:

$$E.E. = 83.9\% \pm 2.2$$

### **Considerazioni sul rilascio di TCZ**

È stato analizzato il comportamento delle microparticelle di tioconazolo (0.75 mg) in membrane da dialisi (12kDa) immerse in soluzioni fisiologiche di tampone fosfato (pH 5.5) e etanolo 9:1 (Fig. 28). È bene sottolineare che i risultati ottenuti vanno considerati come una semplice indicazione preliminare, poiché, per condurre uno studio più puntuale e approfondito, sarebbe necessario valutare il comportamento di una vera e propria formulazione farmaceutica su tessuti cutanei o, nel caso del tioconazolo, su colture di dermatofiti, eseguendo quindi test *in vitro* e *in vivo*.

I campionamenti sono stati effettuati nel corso di 24 ore e, come mostrato nel grafico sottostante, il rilascio totale si attesta sul 15%, raggiungendo un *plateau* grafico poco dopo 5 ore.



*Grafico 11. Andamento dei rilasci (%) di tioconazolo in funzione del tempo trascorso.*

Un rilascio così contenuto è da attribuire alla stabilità elevata delle microparticelle e alla tendenza del tioconazolo, in assenza di altri fattori esterni, a rimanere in un ambiente idrofobico garantito dai domini della proteina.

#### **4.3.5.3. Prove di stabilità termica di TCZ e cheratina (MK)**

Per effettuare i test con colture di dermatofiti sarà necessario aggiungere la cheratina e poi le microparticelle di cheratina caricate con tioconazolo nel terreno di coltura normalmente impiegato per questi funghi. La preparazione di detti terreni prevede una sterilizzazione degli

stessi in autoclave pertanto sono state eseguite delle prove di stabilità termica. Sono state valutate le seguenti soluzioni contenenti tioconazolo e cheratina:

- TCZ (~10mg) sospesi in acqua (1mL)
- MK (10% m/V) in acqua (1mL)
- MK (5mg) in acqua (1mL)
- TCZ (1mg) caricata su MK (5mg) in soluzione acquosa (1mL)

I test sono stati eseguiti passando i campioni in autoclave alle condizioni utilizzate nei protocolli di sterilizzazione di strumenti e terreni di coltura per analisi in vitro (121°C, 1.5bar, 15 minuti). È stato così possibile, oltre che studiare il comportamento generale dei composti ad alta temperatura, valutare anche la possibilità di utilizzare direttamente le pre-formulazioni qui caratterizzate su dermatofiti e ottenere dunque maggiori informazioni sulle attività farmacologiche.

I campioni sono stati confrontati con repliche non autoclavate, valutando l'interezza delle strutture chimiche delle sospensioni e delle proteine solubilizzate tramite analisi DLS, FTIR-ATR e NMR.

### **DLS**

Sono stati misurati tramite DLS i diametri (d) e i PDI delle microparticelle di cheratina:

- Campione non autoclavato

$$\mathbf{d = 196.17 \text{ nm} \pm 21.56}$$

$$\mathbf{PDI = 0.264 \pm 0.057}$$

- Campione autoclavato

$$\mathbf{d = 230.60 \text{ nm} \pm 21.07}$$

$$\mathbf{PDI = 0.204 \pm 0.034}$$

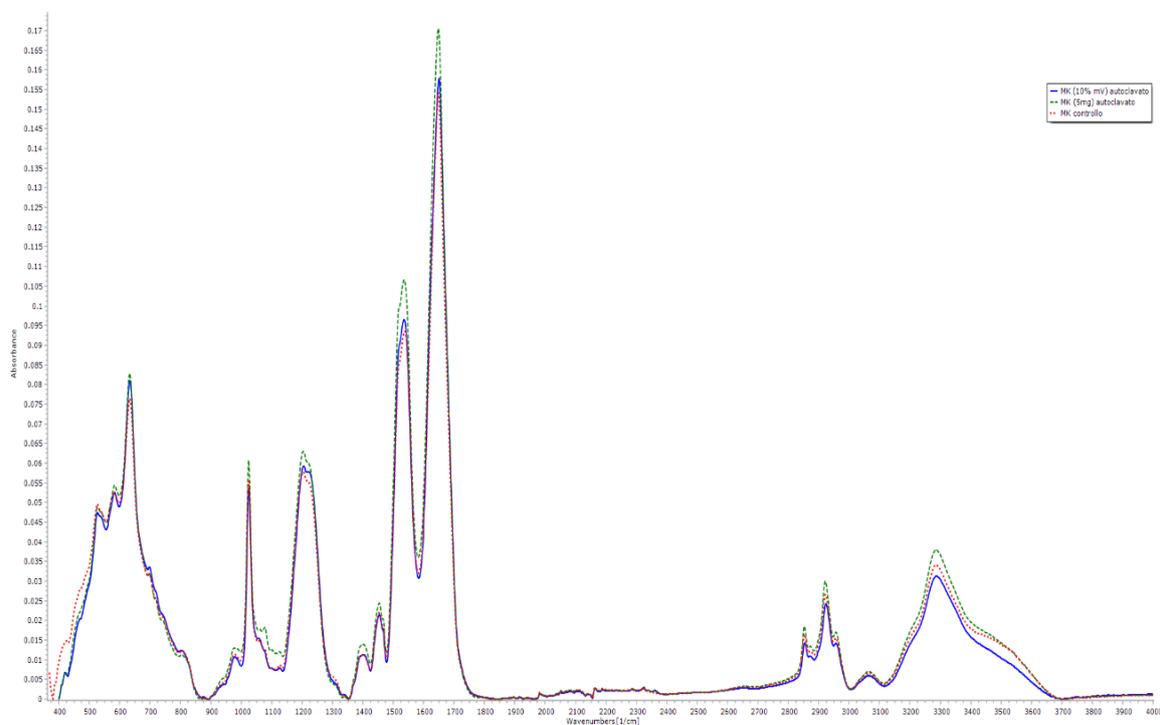
A parte un aumento contenuto del diametro, le misure non si discostano in maniera significativa.

### **FTIR-ATR**

Sono stati confrontati gli spettri ATR dei campioni autoclavati di cheratina MK a diversa concentrazione con uno registrato da un controllo (Fig. 34).

Come mostrato in figura, lo spettro della soluzione di 5mg di MK in 1 mL di acqua è perfettamente sovrapponibile con la cheratina non autoclavata. La soluzione al 10% invece appare leggermente modificata nella parte dello spettro intorno a 3500 cm<sup>-1</sup> con sparizione di una spalla presente nel controllo e nella soluzione con 5mg. Sarà necessario eseguire ulteriori indagini sulla soluzione al 10% per capire tali differenze. Per la soluzione con 5mg è possibile

affermare che durante il passaggio in autoclave la cheratina non subisce alcun tipo di modificazione nelle sue strutture conformazionali.



*Figura 34. Confronto tra spettri ATR di cheratina MK non autoclavata (rossa) e cheratina MK autoclavata a diversa concentrazione (5 mg/mL verde; 10% m/V rosso).*

## <sup>1</sup>H-NMR

Possibili variazioni di struttura del tioconazolo sono state visionate tramite <sup>1</sup>H-NMR (Fig. 35-36).

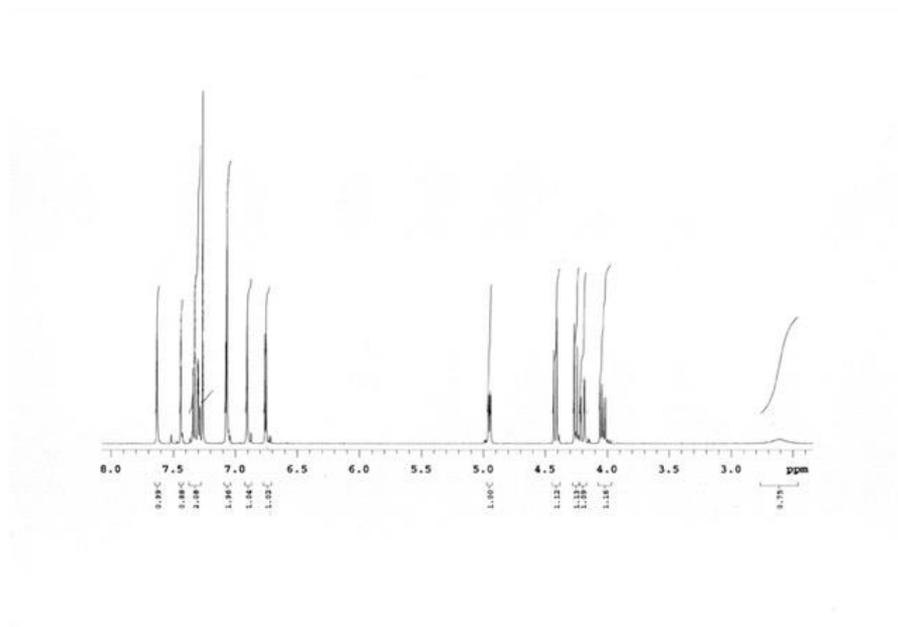


Figura 35. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di tioconazolo non autoclavato.

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7.63 (s, 1H, Ar);  $\delta$  7.44 (d, 1H,  $J = 1.96$  Hz, Ar);  $\delta$  7.33 (d, 1H,  $J = 8.33$  Hz, Ar);  $\delta$  7.30 (d, 1H,  $J = 1.96$  Hz, Ar);  $\delta$  7.07 (m, 2H, Ar);  $\delta$  6.91 (s, 1H, Ar);  $\delta$  6.76 (d, 1H,  $J = 5.87$  Hz, Ar);  $\delta$  4.95 (dd, 1H,  $J_a = 2.94$  Hz,  $J_b = 7.83$  Hz);  $\delta$  4.34 (dd, 2H,  $J_a = 12.23$  Hz,  $J_b = 82.18$  Hz);  $\delta$  4.18 (d, 1H,  $J = 2.45$  Hz);  $\delta$  4.03 (m, 1H).

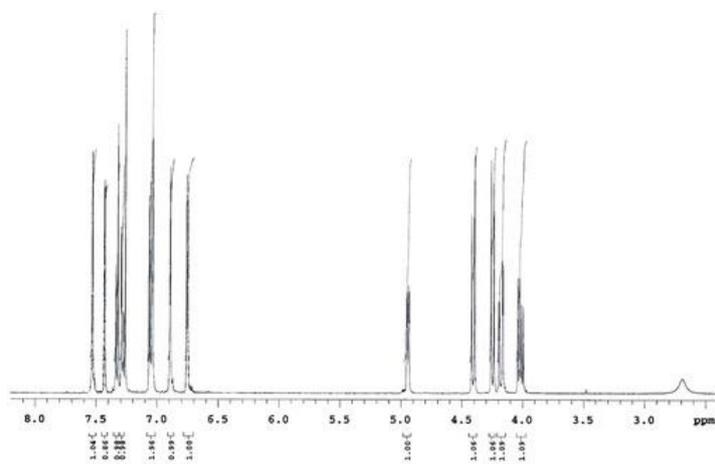


Figura 36. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di tioconazolo autoclavato.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.53 (s, 1H, Ar); δ 7.43 (d, 1H, J = 1.96 Hz, Ar); δ 7.33 (d, 1H, J = 8.33 Hz, Ar); δ 7.30 (d, 1H, J = 1.96 Hz, Ar); δ 7.06 (m, 2H, Ar); δ 6.90 (s, 1H, Ar); δ 6.76 (d, 1H, J = 5.87 Hz, Ar); δ 4.95 (dd, 1H, J<sub>a</sub> = 2.94 Hz, J<sub>b</sub> = 7.83 Hz); δ 4.33 (dd, 2H, J<sub>a</sub> = 12.23 Hz, J<sub>b</sub> = 79.74 Hz); δ 4.17 (d, 1H, J = 2.45 Hz); δ 4.03 (m, 1H).

I *chemical shift* sono pressoché identici, dunque è possibile affermare che il tioconazolo non ha subito variazioni strutturali in autoclave.

In definitiva, la cheratina e il principio attivo hanno dimostrato di essere disponibili ad ulteriori test presso i laboratori della dott.ssa Roberta Galuppi della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna.

## 5. Conclusioni e prospettive future

Lo scopo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di preparare sistemi particellari micro e nanodimensionali utilizzando un rivestimento a base di un biopolimero di origine naturale, la cheratina, in grado di trasferire in ambiente acquoso composti lipofili. Questa proteina è stata estratta da scarti di lana greggia attraverso due procedure differenti: infatti la prima forma, ad alto peso molecolare, è stata ottenuta sfruttando una reazione di solfitolisi; la seconda è stata invece estratta ottimizzando un processo di idrolisi basica fatto ad hoc per recuperare gli scarti non reagiti durante la fase estrattiva della prima forma cheratinosa. Una volta avuto a disposizione il materiale, è stata valutata la sua compatibilità con principi attivi tipicamente insolubili in acqua e scelti attraverso una ricerca di mercato specificatamente rivolta ai settori dermatologico e della cosmeceutica. Il metodo di formazione delle particelle si fonda sul concetto di *Self assembling*: il principio attivo, aggiunto alla soluzione acquosa di cheratina, interagisce con i domini idrofobici di quest'ultima nel tentativo di stabilizzarsi in un ambiente apolare e fungendo da vero e proprio punto di aggregazione per le catene polipeptidiche.

Sono state così ottenute delle sospensioni colloidali che sono state caratterizzate, determinandone la stabilità, le misure dimensionali, la morfologia superficiale e le conformazioni strutturali. È stato poi approfondito lo studio di ulteriori parametri inerenti a microparticelle caricate con un antifungino, visto il potenziale miglioramento dell'attività del farmaco se incapsulato in un rivestimento cheratinoso; ciò ha permesso di ottenere informazioni utili per futuri test *in vitro* e *in vivo*, ovvero per valutazioni più specifiche e significative. È infatti interesse dell'azienda Kerline s.r.l. proporre a soggetti terzi prototipi di preparazioni dermocosmetiche poi facilmente lavorabili e inseribili in creme e altre formulazioni ad uso specifico, su cui eseguire prove complete sull'efficienza di rilascio del principio attivo e sulla sua farmacodinamica.

Complessivamente, sono state ottenute sospensioni colloidali dotate di buona stabilità sia nel tempo che dal punto di vista termico e che mostrano quindi l'ottima compatibilità della cheratina con composti di varia natura.

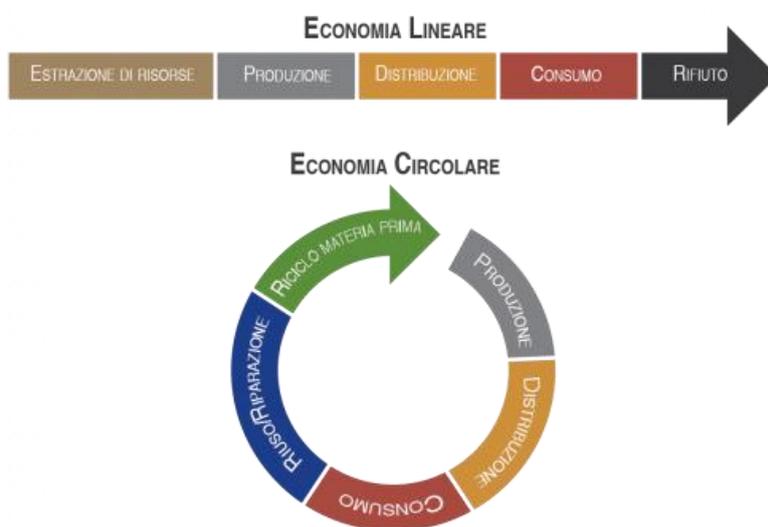
## Appendice

### Economia Circolare

La definizione forse più puntuale di economia circolare è quella attribuita da Ellen MacArthur:

*“The circular economy is industrial economy that is conceptually regenerative and reproduces nature in actively improving and optimizing the systems through which it operates.”*

L’obiettivo principale di questo modello economico è il superamento del prodotto consumabile e non più riciclabile; in questa prospettiva, il rifiuto residuo viene rivalorizzato tramite il reintegro nel ciclo di produzione-consumo. Nel rispetto di questi principi è necessario anche rivalutare il design e lo sviluppo dei prodotti, oltre che la scelta delle materie prime: si prediligono dunque processi a basso impatto ambientale (che evitino cioè reagenti e additivi tossici e difficilmente smaltibili), in grado di sfruttare scarti di produzione o sostanze atossiche e di origine biologica, e che a loro volta immettano nel mercato materiali e sostanze poi facilmente riutilizzabili per altre funzioni. Tutto ciò è in completa antitesi rispetto al modello tradizionale di economia lineare, per cui la materia prima è lavorata per avere un prodotto finito che porta a scarti non recuperabili in alcun modo (Fig. 37).<sup>[30]</sup>



*Figura 37. Illustrazione schematica dei modelli di classica economia lineare (alto) e di economia circolare (in basso).*

## Green Chemistry

La “Chimica Verde” è fondata sul design. Il design è un processo che non può essere fatto casualmente, ma richiede l’intenzione intellettuale. In questo senso, la “Chimica Verde” è definita come l’operazione di design che porta a prodotti e processi chimici che diminuiscono o riducono l’uso e la generazione di sostanze pericolose.

Nel 1998, Paul Anastas e John Warner introdussero i dodici principi della Chimica Verde. Questi principi (Fig. 38) fungono da cornice per ogni momento del design di un prodotto o un processo chimico: dalla scelta delle materie prime, passando per i reagenti usati, fino ad arrivare alla biodegradabilità del prodotto finito.

In figura si riportano i dodici principi della Chimica Verde così come riportati da Paul Anastas in un suo recente articolo.

- 
1. **Prevention.** It is better to prevent waste than to treat or clean up waste after it is formed.
  2. **Atom Economy.** Synthetic methods should be designed to maximize the incorporation of all materials used in the process into the final product.
  3. **Less Hazardous Chemical Synthesis.** Whenever practicable, synthetic methodologies should be designed to use and generate substances that pose little or no toxicity to human health and the environment.
  4. **Designing Safer Chemicals.** Chemical products should be designed to preserve efficacy of the function while reducing toxicity.
  5. **Safer Solvents and Auxiliaries.** The use of auxiliary substances (e.g. solvents, separation agents, etc.) should be made unnecessary whenever possible and, when used, innocuous.
  6. **Design for Energy Efficiency.** Energy requirements of chemical processes should be recognized for their environmental and economic impacts and should be minimized. If possible, synthetic methods should be conducted at ambient temperature and pressure.
  7. **Use of Renewable Feedstocks.** A raw material or feedstock should be renewable rather than depleting whenever technically and economically practicable.
  8. **Reduce Derivatives.** Unnecessary derivatization (use of blocking groups, protection/ deprotection, temporary modification of physical/chemical processes) should be minimized or avoided if possible, because such steps require additional reagents and can generate waste.
  9. **Catalysis.** Catalytic reagents (as selective as possible) are superior to stoichiometric reagents.
  10. **Design for Degradation.** Chemical products should be designed so that at the end of their function they break down into innocuous degradation products and do not persist in the environment.
  11. **Real-Time Analysis for Pollution Prevention.** Analytical methodologies need to be further developed to allow for real-time, in-process monitoring and control prior to the formation of hazardous substances.
  12. **Inherently Safer Chemistry for Accident Prevention.** Substances and the form of a substance used in a chemical process should be chosen to minimize the potential for chemical accidents, including releases, explosions, and fires.
- 

*Figura 38. Elenco dei 12 principi della Chimica Verde così come riportati da Paul Anasta in un suo recente articolo. [31]*

## **Bibliografia**

- [1] World Health Organization, *The top 10 causes of death*, (2018); Articolo su [www.who.int](http://www.who.int)
- [2] Karimkhani C., Dellavalle R.P., Coffeng L.E., Flohr C., Hay R.J., Langan S.M., Nsoesie E.O., Ferrari A.J., Erskine H.E., Silverberg J.I., Vos T., Naghavi M., *Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013*, *Jama Dermatology* (2017); 153(5): 406-412
- [3] Mordor Intelligence LLP, *Active Pharmaceutical Ingredients (API) Market - Growth, Trends, and Forecast (2019 – 2024)*, (2019); Abstract su [www.MarketResearch.com](http://www.MarketResearch.com)
- [4] Centro studi Cosmetica italiana, *Congiuntura, trend e mercati nel settore cosmetico*, Elaborazione Centro Studi (2020); 3
- [5] GMR Data Ltd., *The Global Dermatology Market to 2028*, (2018); Abstract su [www.MarketResearch.com](http://www.MarketResearch.com)
- [6] *REACH in sintesi*, [www.reach.gov.it](http://www.reach.gov.it)
- [7] Santos A.C., Morais F., Simões A., Pereira I., Sequeira J.A.D., Pereira-Silva M., Veiga F., Ribeiro A., *Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations*, *J. Expert opinion on Drug Del.* (2019); 16(4): 313-330
- [8] Suganya V., Anuradha V., *Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review*, *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2017; 9(3): 233-239
- [9] Whitford D., *Proteins: structure and functions*, John Wiley & Sons, Ltd (2005)
- [10] Wang B., Yang W., McKittrick J., Meyers M.A., *Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration*, *Progress in Materials Science* (2016); 76: 229-318

- [11] Xu H., Shi Z., Reddy N., Yang Y., *Intrinsically Water-Stable Keratin Nanoparticles and Their in Vivo Biodistribution for Targeted Delivery*, J. Agric. Food Chem. (2014); 62: 9145–9150
- [12] Qinmei L., Lijun Z., Ruigang L., Da H., Xin J., Ning C., Zhuang L., Xiaozhong Q., Hongliang K., Yong H., *Biological stimuli responsive drug carriers based on keratin for triggerable drug delivery*, J. Mater. Chem. (2012); 22: 19964-19973
- [13] Aluigi A., Ballestri M., Guerrini A., Sotgiu G., Ferroni C., Corticelli F., Gariboldi M.B., Monti E., Varchi G., *Organic solvent-free preparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers for antitumour activity*, Materials Science & Engineering C (2018); 90: 476-484
- [14] Aluigi A., Sotgiu G., Ferroni C., Duchi S., Lucarelli E., Martini C., Posati T., Guerrini A., Ballestri M., Corticelli F., Varchi G., *Chlorin e6 keratin nanoparticles for photodynamic anticancer therapy*, RSC Adv. (2016); 6: 33910–33918
- [15] Aluigi A., Tonetti C., Vineis C., Varesano A., Tonin C., Casasola R., *Study on the adsorption of chromium (VI) by hydrolyzed keratin/polyamide 6 blend nanofibres*, J. Nanosc. Nanotec. (2012); 12 (9): 7250-7259
- [16] Mokrejs P., Hutta M., Pavlackova J., Egner P., Benicek L., *The Cosmetic and Dermatological Potential of Keratin Hydrolysate*, J. Cosmet. Dermatol. (2017); 16 (4): 21-27
- [17] Aluigi A., Varchi G., Sotgiu G., Guerrini A., Ballestri M., *Nanoparticles as delivery vehicles of active ingredients and methods for the production thereof*, Brevetto registrato presso Botti&Marchi s.r.l. (2018); Brevetto n. WO2018229093A1
- [18] Rajabinejad H., Zoccola M., Patrucco A., Montarsolo A., Rovero G., Tonin C., *Physicochemical properties of keratin extracted from wool by various methods*, Textile Research J. (2018); 88(21): 2415-2424

- [19] Sourav Bhattacharjee, *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?*, J. Controlled Release (2016); 235: 337-351
- [20] Calvo N.L., Alvarez V.A., Lamas M.C., Leonardi D., *New approaches to identification and characterization of tioconazole in raw material and in pharmaceutical dosage forms*, J. Pharm. Analysis (2019); 9: 40-48
- [21] Sing Bisht D., Bhatt Kumar G., Kothiyal P., *Formulation and evaluation of nail lacquer containing tioconazole for transungual drug delivery system*, IAJPS (2015); 2(11): 1474-1485
- [22] Kumar Sah S., Badola A., Mukhopadhyay S., *Development and evaluation of tioconazole loaded emulgel*, Int. J. App. Pharm. (2017); 9 (5): 83-90
- [23] Dati dal sito [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) di National Institutes of Health
- [24] Webster G., *Combination azelaic acid therapy for acne vulgaris*, J. Am. Acad. Dermatol. (2000); s47-s50
- [25] Tomića I., Juretićb M., Jugc M., Pepićc I., Čižmekb B.C., Filipović-Grčić J., *Preparation of in situ hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystals and their dermal application performance study*, Int. J. Pharm. (2019); 563: 249-258
- [26] Alberts D.S., Goldman R., Min-Jian X., Dorr R.T., Quinn J., Welch K., Guillen-Rodriguez J., Aickin M., Yei-Mei P., Loescher L., Gensler H., *Disposition and metabolism of topically administered  $\alpha$ -tocopherol acetate: A common ingredient of commercially available sunscreens and cosmetics*, J. Nutrition and Cancer (1996); 26(2): 193-201
- [27] Ming K., Hyun Jin P., *Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier*, Carbohydrate Pol. (2011); 83: 1303-1310
- [28] Dati dal sito [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)

- [29] Flores F.C, Rosso S.R., Cruz L., Beck R.C.R., Silva C.S., *An innovative polysaccharide nanobased nail formulation for improvement of onychomycosis treatment*, Eur. J. Pharm. Sciences (2017); 100: 56-63
- [30] Cavallo M., Cencioni D., *Circular Economy, benefits and good practices*, Edizioni Ambiente s.r.l. (2017)
- [31] Anasta P., Eghbali N., *Green Chemistry: Principles and Practice*, Chem. Soc. Rev. (2010); 39: 301-312

## **Ringraziamenti**

Anzitutto ringrazio la Prof.ssa Elisabetta Salatelli per avermi permesso di iniziare questo lavoro.

Ringrazio poi sentitamente le Dott.sse Giovanna Sotgiu e Annalisa Aluigi di Kerline srl per la competenza e la dedizione, senza le quali non avrei mai potuto affrontare e portare a termine il tirocinio di tesi.

Desidero infine spendere alcune righe per ringraziare la mia famiglia, che in questi anni, e in particolar modo in questi intensi mesi, mi ha sempre sostenuto, credendo in questo percorso almeno quanto me. A loro dedico ogni minuto trascorso in laboratorio e ogni singola parola scritta in questo documento.

