



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Tesi di laurea

Ca' Foscari  
Dorsoduro 3246  
30123 Venezia

# Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie dei Bio e Nanomateriali

## **Confronto di nanoparticelle di zirconia, silice e titania per applicazioni biomedicali**

### **Relatore**

Prof. Flavio Rizzolio

### **Correlatori**

Dott. Emmanuele Ambrosi  
Dott.ssa Benedetta Leonetti

### **Laureando**

Giulia Bragaglia  
Matricola 838903

### **Anno Accademico**

2015/2016



# INDICE

## Abbreviazioni

1	Introduzione.....	7
1.1	Osteosarcoma.....	7
1.2	Trattamento farmacologico dell'osteosarcoma.....	8
1.2.1	Doxorubicina.....	8
1.2.1.1	<i>Meccanismo d'azione</i> .....	9
1.2.1.2	<i>Farmacocinetica</i> .....	11
1.2.2	Vie di somministrazione.....	11
1.3	Nanotecnologie.....	12
1.4	Drug delivery.....	13
1.4.1	Diossido di silicio – SiO <sub>2</sub> .....	14
1.4.2	Diossido di titanio – TiO <sub>2</sub> .....	15
1.4.3	Diossido di zirconio – ZrO <sub>2</sub> .....	16
1.4.3.1	<i>Affinità zirconia – fosfati</i> .....	17
1.5	Funzionalizzazione.....	17
1.6	Medicina rigenerativa.....	18
1.6.1	Cellule Staminali Mesenchimali (MSC).....	19
2	Scopo.....	21
3	Materiali e Metodi.....	22
3.1	Materiali.....	22
3.2	Caratterizzazioni.....	22
3.3	Metodi.....	23
3.3.1	Sintesi di nanoparticelle di zirconia.....	23
3.3.2	Sintesi di nanoparticelle di silice.....	23
3.3.3	Sintesi di nanoparticelle di titania.....	24
3.3.4	Funzionalizzazioni.....	25
3.3.5	Sintesi della shell di idrossiapatite.....	26
3.3.6	Loading e release.....	27
3.3.6.1	<i>Loading</i> .....	27
3.3.6.2	<i>Release</i> .....	27
3.3.7	Citotossicità.....	28
3.3.7.1	<i>U2OS</i> .....	28

3.3.7.2	<i>Cellule Staminali Mesenchimali</i> .....	29
3.3.7.3	<i>Escherichia coli</i> .....	29
4	Risultati e discussione.....	31
4.1	Analisi morfologica e strutturale.....	31
4.2	Fisisorbimento di N <sub>2</sub> .....	33
4.3	Zeta Potential.....	36
4.4	XRPD.....	41
4.5	Loading.....	43
4.6	Release.....	44
4.7	Test di tossicità nei confronti di linee cellulari e ceppi batterici.....	46
4.7.1	U2OS.....	46
4.7.2	MSCs.....	48
4.7.3	Test di inibizione batterica.....	50
5	Conclusioni.....	54
6	Bibliografia.....	56

## Abbreviazioni

BP-gly: N,N-bi(fosfonometil)glicina

CaCl<sub>2</sub>: cloruro di calcio

CAPS: acido N-cicloesil-3-amminopropansulfonico

CTAB: cetiltrimetilammonio bromuro

DOX: doxorubicina

EtOH: etanolo

HAP: idrossiapatite

HEPES: acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazineetansulfonico

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 3H<sub>2</sub>O: fosfato di potassio monobasico

MBP: metilen-bifosfonato

MeOH: metanolo

MIC: concentrazione minima inibitoria

MSCs: cellule staminali mesenchimali

MSN: nanoparticelle di silice mesoporosa

MTN: nanoparticelle di titania mesoporosa

MZN: nanoparticelle di zirconia mesoporosa

MTN@BP-gly: nanoparticelle di titania funzionalizzate con N,N-bi(fosfonometil)glicina

MTN@HAP: nanoparticelle di titania funzionalizzate con una shell di idrossiapatite

MTN@P-ac.asc.: nanoparticelle di titania funzionalizzate con acido 2-fosfo-L-ascorbico

MZN@BP-gly: nanoparticelle di zirconia funzionalizzate con N,N-bi(fosfonometil)glicina

MZN@HAP: nanoparticelle di zirconia funzionalizzate la shell di idrossiapatite

MZN@MBP: nanoparticelle di zirconia funzionalizzate con MBP

MZN@P-ac.asc.: nanoparticelle di zirconia funzionalizzate con acido 2-fosfo-L-ascorbico

NA: Nutrient Agar

NaAc: acetato di sodio

NaF: fluoruro di sodio

NaOH: idrossido di sodio

OD<sub>600</sub>: densità ottica a 600 nm

P-ac.asc.: acido 2-fosfo-L-ascorbico

TEOS: tetraetil-ortosilicato

Ti(OPr)<sub>4</sub>: butossido di titanio

TSA: Tryptone Soy Agar

Zr(OBut)<sub>4</sub>: butossido di zirconio

ZP: Potenziale Zeta

# 1 Introduzione

## 1.1 Osteosarcoma

Il cancro è una delle patologie che maggiormente affligge il nostro millennio <sup>(1)</sup> e da studi statistici condotti negli ultimi anni risulta essere la principale causa di morte nei paesi sviluppati, dopo le malattie cardiovascolari <sup>(2)</sup>.

In particolare, l'osteosarcoma è un tipo di neoplasia ad elevato grado di malignità costituito da cellule mesenchimali che producono matrice ossea in grande quantità provocando la formazione di agglomerati di cellule ossee, come si può notare in figura 1.1 <sup>(3,4)</sup>.



**Figura 1.1: Crescita atipica di matrice ossea <sup>(5)</sup>.**

L'osteosarcoma è il tumore maligno dell'apparato scheletrico più frequente in età pediatrica ed adolescenziale, probabilmente correlato al rapido accrescimento; colpisce le ossa lunghe nel 90% dei casi e l'incidenza in Italia si attesta attorno a 0,8-1 casi per 100.000 abitanti, con un'incidenza di circa 500 nuovi casi per anno <sup>(4)</sup>. Gli osteosarcomi convenzionali vengono classificati in carcinoma di tipo osteoblastico, condroblastico e fibroblastico, in base al tipo di matrice prodotta dalle cellule malate <sup>(6)</sup>, ma in generale la prognosi e l'evoluzione della malattia sono molto simili. Le cellule responsabili dell'avanzare della patologia sono le U2OS, una linea cellulare isolata per la prima volta nel 1964 da osteosarcoma della tibia <sup>(7)</sup>.

Presentano, come tutte le cellule tumorali, un metabolismo alterato, che comporta una proliferazione indipendente dai segnali di crescita, la promozione di angiogenesi e la conseguente infiltrazione nei tessuti adiacenti ed infiammazione degli organi o tessuti interessati.

Le tecniche oggi utilizzate nella cura dell'osteosarcoma prevedono l'exeresi chirurgica della lesione ed il trattamento delle metastasi (che si verificano nel 85% dei casi <sup>(8)</sup>) con approccio chemioterapico.

In generale le terapie convenzionali presentano dei limiti significativi, tra i quali ci sono una distribuzione non specifica del farmaco nei tessuti, una concentrazione insufficiente nel sito tumorale, un'elevata citotossicità ed il verificarsi di fenomeni di resistenza nei confronti del chemioterapico <sup>(9)</sup>. Per ridurre al minimo questi problemi i nuovi obiettivi terapeutici sono focalizzati verso una sempre maggior selettività e specificità di azione farmacologica sulle cellule tumorali e ad una possibile successiva rigenerazione dei tessuti andati distrutti sia dalla patologia che dall'approccio chirurgico/farmacologico.

Una delle tecniche più promettenti prevede l'utilizzo di nanoparticelle usate come carrier per veicolare il farmaco in maniera il più possibile selettiva e fattori di crescita organo-specifici a fini rigenerativi.

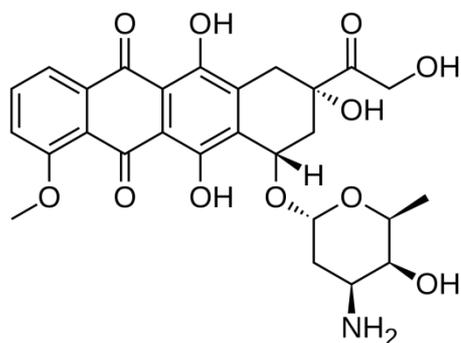
## **1.2 Trattamento farmacologico dell'osteosarcoma**

Attualmente i farmaci d'elezione per la cura di questa patologia sono il cisplatino, l'ifosfamide e la doxorubicina (oggetto di questo studio), utilizzati sia in monoterapia che in associazione, che nelle pratica clinica vengono spesso usati in associazione con il Methotrexate<sup>®</sup>, anche se un recente studio dell'Italian Sarcoma Group (ISG/OS-1) <sup>(10)</sup> ha dimostrato che l'aggiunta di ifosfamide ad una terapia associata con cisplatino e doxorubicina, dimostra che non migliora la sopravvivenza dei pazienti trattati, ma ne aumenta la tossicità ematologica.

### **1.2.1 Doxorubicina**

La doxorubicina, anche conosciuta con il nome commerciale di Andriamicina<sup>®</sup> o Rubex<sup>®</sup>, è un farmaco anti-neoplastico appartenente alla classe delle antracicline <sup>(11)</sup>, antibiotici anti-

neoplastici utilizzati nella cura di tumori quali: osteosarcoma, adenocarcinoma della mammella, neoplasie polmonari, vescicali, alcuni tipi di linfomi ed il neuroblastoma in stadio avanzato.



**Figura 1.2: Molecola di Doxorubicina**

È un farmaco citotossico, in quanto si inserisce parallelamente tra le basi del DNA <sup>(12)</sup> inibendo la sintesi di acidi nucleici, la mitosi e provocando aberrazioni cromosomiche.

Gli effetti collaterali riguardano la mielotossicità, ovvero l'inibizione della produzione della frazione corpuscolata del sangue da parte del midollo osseo, e la cardiotoxicità, dovuta alla morte dei cardiomiociti indotta dalla molecola stessa <sup>(3)</sup>; questa però può essere significativamente ridotta somministrando il farmaco in infusione continua della durata di 24 h, senza per questo ridurne l'efficacia terapeutica, ma è comunque legata alla dose cumulativa, che non deve superare i 450-500 mg/m<sup>2</sup>. Il rischio di sviluppo della cardiomiopatia, che si manifesta con tachicardia, alterazioni dell'ECG o insufficienza cardiaca, si presenta in circa il 10% dei pazienti <sup>(13)</sup>.

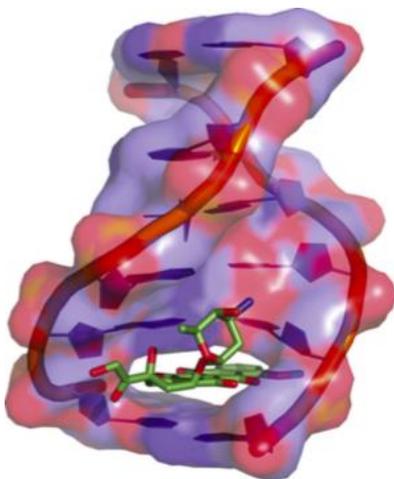
### **1.2.1.1 Meccanismo d'azione**

La doxorubicina è un farmaco intercalante, in grado cioè di inserirsi trasversalmente tra le basi del DNA, bloccando l'attività della topoisomerasi II (enzima coinvolto nel meccanismo di superavvolgimento del DNA) e bloccando la trascrizione <sup>(14)</sup>.

La topoisomerasi è presente nella forma di tipo a (Top2a), sovrapprodotta nelle cellule cancerose ma del tutto assente in quelle normali, e di tipo b (Top2b), virtualmente assente nelle

cellule tumorali ma presente in quelle non patologiche <sup>(14)</sup>. La doxorubicina distrugge le cellule neoplastiche legandosi a Top2a e al DNA innescando l'apoptosi. Il team di Edward T. H. Yeh, direttore del Dipartimento di Cardiologia all'Anderson Center, però, ha visto che il farmaco si lega anche a Top2b nei cardiomiociti determinando la cardiotoxicità <sup>(15)</sup>.

Provoca, inoltre, la formazione di superossidi, composti radicalici altamente reattivi che danneggiano in modo permanente la molecola del DNA <sup>(16, 17)</sup>. La molecola di doxorubicina, infatti, è un chinone e può essere trasformata in semi-chinone dall'aggiunta di un elettrone da parte della NADPH-ossidoreduttasi. La molecola che si ottiene reagisce rapidamente con l'ossigeno producendo ROS che danneggiano il DNA in modo irreversibile.



**Figura 1.3: Azione intercalante delle basi della Doxorubicina <sup>(18)</sup>.**

La doxorubicina, inoltre, è un chelante del ferro ed il complesso doxorubicina-ferro provoca la conversione del perossido di idrogeno in radicali idrossilici. Questi radicali, che sono la causa dello stress ossidativo, provocano il danneggiamento della molecola di DNA e l'apoptosi cellulare <sup>(19)</sup>.

Per queste sue caratteristiche il farmaco colpisce le cellule in rapida proliferazione, quali le cellule cancerose, avendo però effetti tossici anche nei confronti delle cellule sane del midollo osseo, della mucosa orale ed intestinale e dei bulbi piliferi.

### **1.2.1.2 Farmacocinetica**

Il farmaco viene somministrato come sale dell'acido cloridrico, è molto stabile ad un pH compreso tra 3.5 e 6.0, mentre degrada sempre più velocemente all'aumentare del pH da 6.5 a 12.0 <sup>(20)</sup>.

La somministrazione endovenosa di doxorubicina è seguita da una rapida clearance (10 mL/min) e un legame tissutale significativo. L'emivita terminale è approssimativamente di 30 ore ed è parzialmente metabolizzata in doxorubicinolo, metabolita alcolico che è 20-40 volte più attivo nell'inibire la contrattilità miocardica, ed in aglicone <sup>(13)</sup>.

L'escrezione biliare e fecale rappresentano le principali vie di eliminazione.

### **1.2.2 Vie di somministrazione**

Attualmente i farmaci chemioterapici vengono somministrati sia per via parenterale che per os, ma a causa degli effetti avversi, si cercano vie alternative di somministrazione, in modo tale che possano essere meno dannosi nei confronti dell'organismo e più specifici nella loro azione verso le cellule target.

Un'alternativa promettente potrebbe essere la nanomedicina e nello specifico il drug delivery, mediante l'utilizzo di nanoparticelle.

### 1.3 Nanotecnologie

La nanotecnologia è la disciplina che riguarda la manipolazione della materia su scala atomica e molecolare, con l'obiettivo di ottenere materiali con determinate caratteristiche chimico-fisiche <sup>(21)</sup>.

Negli ultimi decenni si è sviluppato un interesse sempre maggiore attorno alle nanotecnologie ed i campi di applicazione sono molteplici: sensoristica, elettronica, informatica, medicina, imaging, targeting, biologia e chimica <sup>(22, 26)</sup>.

I materiali nanostrutturati, infatti, presentano caratteristiche differenti rispetto ai materiali bulk, dal momento che possono acquisire proprietà catalitiche (nanoparticelle di oro <sup>(23)</sup>), di conduzione elettrica e del calore (nanoparticelle magnetiche <sup>(24)</sup>) o proprietà ottiche (quantum dots <sup>(25)</sup>). Tra gli esempi più noti, le nanoparticelle di silice e quelle polimeriche sono utilizzate come nanocarrier e sono facilmente funzionalizzabili; i quantum dots e i nanotubi di carbonio sono dei semiconduttori utilizzati nella fotoluminescenza e nella conduzione termica ed elettrica; i metalli nobili e gli ossidi del ferro presentano proprietà magnetiche, paramagnetiche e catalitiche.

Le proprietà delle nanoparticelle che costituiscono questi materiali sono moltissime e sono meglio dettagliate in figura 1.4.

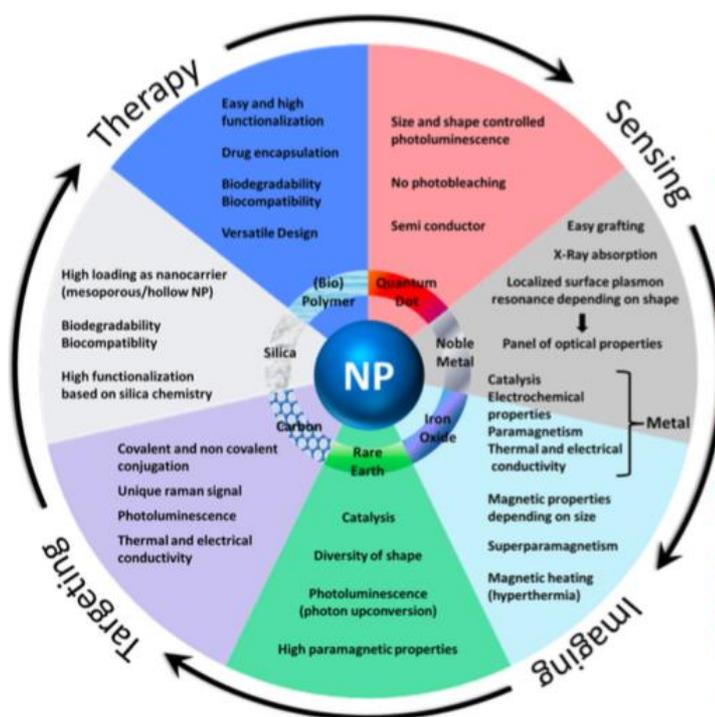


Figura 1.4: I nanomateriali rivestono particolare importanza nel campo della sensoristica, dell'imaging, del targeting e della nanomedicina <sup>(22)</sup>.

Un'altra importante applicazione delle nanoparticelle è il loro utilizzo nel nanodelivery, ovvero nella veicolazione controllata e localizzata del farmaco.

## 1.4 Drug delivery

L'utilizzo di materiali porosi di dimensioni nanometriche nel campo del drug delivery ha attirato un grande interesse nell'ultimo decennio <sup>(9)</sup> e il campo più promettente per la sua applicazione è quello medico, finalizzato al rilascio sostenuto e localizzato di farmaci.

La loro somministrazione tramite l'impianto o l'iniezione di sistemi di rilascio permette, infatti, di superare i limiti delle terapie convenzionali <sup>(27)</sup> legate alla somministrazione di farmaci in base al rapporto mg/kg di peso corporeo nell'unità di tempo.

I vantaggi di un rilascio mirato sono legati sia alla riduzione della dose di farmaco da somministrare, sia alla riduzione degli effetti collaterali dovuti ad una circolazione sistemica e poco specifica del farmaco libero.

Il rilascio controllato, mediato ad esempio da nano- e/o microsistemi (come nanoparticelle, liposomi, micelle, nanocapsule) permetterebbe inoltre di diminuire il numero di somministrazioni <sup>(28)</sup>. La possibilità di introdurre un ulteriore livello di modifiche con lo scopo di rilasciare in maniera specifica il cargo reagendo a particolari stimoli di tipo fisico, chimico o biologico, potrebbe infine aumentare la specificità e la selettività di azione.

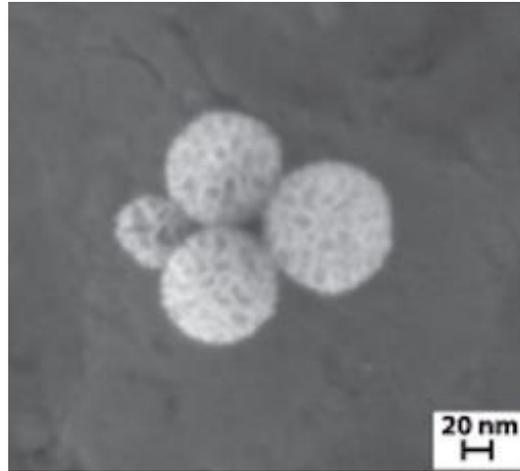
In questo contesto, i meccanismi di veicolazione possono essere passivi o attivi. Un esempio di indirizzamento passivo può essere l'accumulo di un chemioterapico all'interno di un tumore grazie alla differente permeabilità del tessuto sano rispetto a quello malato, anche chiamato effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention) <sup>(29)</sup>.

Il tessuto neoplastico dell'osteosarcoma, infatti, presenta una struttura molecolare ed una vascolarizzazione alterate rispetto al tessuto sano e manca del drenaggio linfatico. Per questo macromolecole, come liposomi, micelle o farmaci, possono facilmente penetrare la massa tumorale, ma difficilmente riescono ad uscirne, grazie alla mancanza di un drenaggio efficiente <sup>(30)</sup>.

L'indirizzamento attivo, invece, prevede di decorare la superficie di questi sistemi con molecole target, come anticorpi monoclonali chimerici, in grado di riconoscere selettivamente le cellule malate <sup>(31)</sup>.

Tra i materiali che possono essere utilizzati per il drug delivery, le nanoparticelle mesoporose sembrano essere particolarmente promettenti nella ricerca contro il cancro, in quanto

presentano dimensioni dei pori compresi tra i 2 e i 50 nm di diametro ed elevata area superficiale; sono quindi delle ottime candidate per veicolare farmaci antitumorali<sup>(32)</sup>.



**Figura 1.5: Esempio di nanoparticelle mesoporose di silice<sup>(32)</sup> in cui è ben visibile la porosità superficiale.**

In questo lavoro di tesi sono state studiate nanoparticelle di silice, titania e zirconia.

#### **1.4.1 Diossido di silicio-SiO<sub>2</sub>**

Il diossido di silicio, o silice, è il composto di silicio più comune presente sulla crosta terrestre; date le sue ottime proprietà chimiche e fisiche, tra cui stabilità a diverse temperature e pH e biocompatibilità<sup>(33)</sup>, è utilizzato nel campo dell'elettronica, nell'industria alimentare, nell'ingegneria biomedica e in medicina.

È anche noto come E551, agente antiagglomerante presente nei cibi di consumo quotidiano ed è particolarmente indicato contro l'osteoporosi, le malattie cardiovascolari e l'ipertensione<sup>(33)</sup>.

Le nanoparticelle di silice possono essere sintetizzate in diverse forme e sono particolarmente indicate per il loro utilizzo come nanodelivery<sup>(34)</sup>, in quanto presentano una struttura altamente ordinata ed un'area superficiale che permettono un'elevata capacità di caricamento ed allo stesso tempo promuovono un rilascio controllato del farmaco.

Inoltre, grazie alla presenza di gruppi silanolici sulla superficie, è possibile modificare chimicamente le nanoparticelle favorendo l'adsorbimento di molecole come proteine, peptidi o fattori di crescita organo-specifici.

Tra i metodi di sintesi più noti delle nanoparticelle di silice troviamo il metodo Stober, processo sol-gel in catalisi basica <sup>(35)</sup>, ed un metodo Stober modificato da Grun et al. utilizzando un surfattante cationico <sup>(36)</sup>.

Per le caratteristiche sopra citate le nanoparticelle di silice sono particolarmente indicate per il drug delivery e le terapie contro il cancro <sup>(37)</sup> e sono state utilizzate come carrier nel trasporto della doxorubicina <sup>(38, 39)</sup>.

La silice viene anche studiata per la sua attività antimicrobica <sup>(40)</sup>. Cousin et al. <sup>(41)</sup>, infatti, hanno dimostrato che le nanoparticelle di silice inibiscono l'adesione batterica del biofilm orale.

#### **1.4.2 Diossido di titanio-TiO<sub>2</sub>**

Il diossido di titanio, o titania, è un materiale ampiamente studiato; grazie alle sue proprietà chimiche, termiche e fotochimiche, all'assenza di tossicità e al suo elevato indice di rifrazione è il pigmento bianco maggiormente utilizzato <sup>(42)</sup>.

In medicina il titanio è utilizzato per la realizzazione di protesi, impianti orali ed extraorali e vari dispositivi per la cura del paziente.

La titania può essere sintetizzata in forma di nanoparticelle e acquisisce proprietà fotocatalitiche; per questo viene impiegata nelle celle solari, per la realizzazione di materiali autopulenti e per processi di disinquinamento ambientale <sup>(43, 44)</sup>, nelle vernici per la degradazione di inquinanti ambientali come gli ossidi dell'azoto, anche noti come NO<sub>x</sub>, o di molecole organiche come tricloroetilene ed il metil-terzbutil-etero presenti nelle acque di scarico <sup>(45)</sup>.

Un'altra caratteristica fondamentale, che ha reso questo materiale molto interessante negli ultimi anni, è l'attività antitumorale indotta dalla luce <sup>(46, 47)</sup>, che gli permette di essere particolarmente interessante nel mondo della nanomedicina.

Un'altra applicazione di queste nanoparticelle è il loro utilizzo come agenti antimicrobici, proprietà attribuibile alla loro struttura, forma e dimensione.

Le nanoparticelle di titania, infatti, inducono la produzione di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) che, per effetto dello stress ossidativo, danneggiano irreversibilmente il DNA; inoltre la loro attività fotocatalitica sembra essere un valido aiuto nell'eradicazione dei biofilm batterici <sup>(40)</sup>.

Tra i metodi sintetici delle nanoparticelle di titania troviamo la sintesi di Chen e Mao, processo sol-gel in catalisi basica <sup>(42)</sup> ed un metodo sol-gel modificato da Jing et al. in catalisi acida <sup>(48)</sup>.

### **1.4.3 Diossido di zirconio-ZrO<sub>2</sub>**

Il diossido di zirconio, o zirconia, è un materiale noto per elevate resistenza e dilatazione termica <sup>(49)</sup>.

È presente in natura in tre forme cristallografiche, cubica, tetragonale e monoclinica <sup>(50)</sup> e presenta un ampio spettro di applicazioni che lo rendono particolarmente interessante, principalmente in ambito medico, in quanto è utilizzato nelle protesi ossee e dentali <sup>(51)</sup>.

Può essere sintetizzato sotto forma di nanoparticelle e, data la sua elevata capacità di adsorbire molecole sulla sua superficie, viene utilizzato nella rimozione di metalli quali fosforo, arsenico (V), cadmio (II), piombo (II), mercurio (II) presenti nelle acque di scarico e nei rifiuti industriali <sup>(52)</sup>.

Recentemente queste nanoparticelle sono state impiegate nel drug delivery come nanocarrier per veicolare molecole di farmaci antitumorali, in quanto sono biocompatibili e presentano importanti proprietà per applicazioni biomediche e caricamento di farmaci <sup>(53)</sup>.

Tra i metodi di sintesi di queste nanoparticelle, il più interessante è il metodo sol-gel, in particolare la sintesi di Sponchia et al. che sfrutta un surfattante neutro <sup>(53)</sup>.

### 1.4.3.1 Affinità Zirconia – Fosfati

Le nanoparticelle di zirconia presentano un'elevata affinità con i bifosfonati, una classe di farmaci in genere utilizzati per inibire il riassorbimento osseo dovuto sia a cause fisiologiche, come l'osteoporosi<sup>(54,55)</sup>, che a cause patologiche, come neoplasie e/o metastasi ossee.

Strutturalmente, queste molecole sono dei derivati inorganici di pirofosfati, composti naturali in cui due gruppi fosfato sono legati da un'esterificazione, come si può notare in figura 1.6.

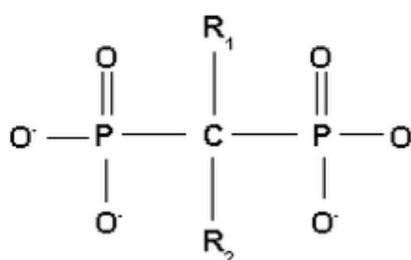


Figura 1.6: Esempio di molecola di bifosfonato

## 1.5 Funzionalizzazione

La funzionalizzazione viene effettuata prima di tutto per garantire la stabilizzazione delle nanoparticelle, le quali tendono ad aggregare per ridurre l'energia del sistema; l'introduzione di una molecola sulla superficie, infatti, può impedire tale processo e garantire una monodispersione grazie, per esempio, all'ingombro sterico della molecola stessa o ad un effetto di repulsione elettrostatica.

Inoltre, può modificare la carica superficiale a seconda dell'applicazione, ritardare l'opsonizzazione ed infine l'introduzione di gruppi funzionali potrebbero essere utilizzati per reazioni successive, per esempio come crosslinker per superfici<sup>(56)</sup>

## 1.6 Medicina rigenerativa

La medicina rigenerativa mira alla riparazione di difetti che riguardano organi danneggiati e a ripristinare la loro normale funzionalità biologica <sup>(57)</sup>.

Nello specifico, il termine “medicina rigenerativa” è utilizzato per indicare quelle tecniche mediche che sfruttano il potenziale di particolari cellule, le cellule staminali, progenitori non ancora maturi che presentano il potenziale di potersi differenziare in diverse linee cellulari.

Attualmente si distinguono tre tipi di terapie: la terapia genica, la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale <sup>(57)</sup>.

La terapia genica e cellulare vengono testate a livello clinico per il trattamento di malattie rare, mentre l'ingegneria tissutale è un settore delle biotecnologie che comprende vari aspetti di medicina, biologia cellulare e ingegneria per riparare o rigenerare tessuti umani.

In genere le terapie attuali prevedono la sostituzione dell'organo danneggiato tramite un trapianto da donatore, ma comporta notevoli svantaggi per il paziente, tra cui immunosoppressione e necessità di avere un donatore compatibile <sup>(58, 59)</sup>.

In medicina rigenerativa, invece, questo problema viene superato dall'utilizzo di cellule autologhe (del paziente stesso) o allogene (di un soggetto della stessa specie) <sup>(60)</sup>, altamente differenziate e che mantengono la loro capacità di proliferare.

Le cellule più promettenti in questo tipo di terapia sono le cellule staminali <sup>(61)</sup> che non sono specializzate e sono in grado di differenziarsi indefinitamente, dando origine a cellule specializzate, grazie alla presenza di molecole quali fattori di crescita che ne permettono lo sviluppo e la differenziazione.

I fattori di crescita sono dei mediatori solubili che, grazie a recettori specifici, stimolano in modo autocrino, paracrino o endocrino la proliferazione, migrazione e soprattutto differenziazione delle cellule staminali.

Esempi di fattori di crescita sono l'EGF (Epidermal Growth Factor) o l'FGF<sub>2</sub> (Fibroblast Growth Factor), specifico per la crescita e la differenziazione delle cellule mesenchimali <sup>(65)</sup>.

Il processo che porta alla specializzazione di queste cellule è chiamato differenziazione e le cellule staminali vengono suddivise in base al grado di specializzazione <sup>(62)</sup>, infatti esse possono essere di quattro tipi: totipotenti, in grado di differenziarsi in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale, derivano da embrioni allo stadio di 4-8 cellule (dopo 1-3 giorni dalla fecondazione); pluripotenti, cellule embrionali allo stadio di blastocisti (dopo 4-14 giorni dalla fecondazione) capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre diversi foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma); multipotenti, cellule staminali

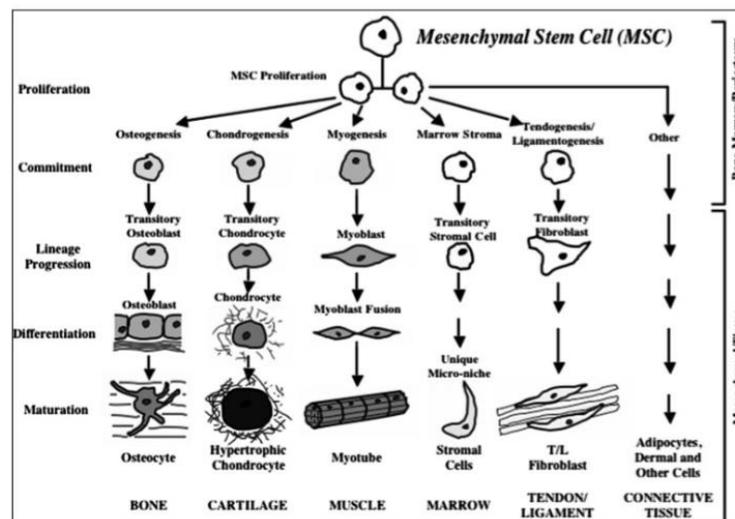
adulte in grado di differenziare in tessuti appartenenti allo stesso foglietto embrionale; unipotenti, presenti nei tessuti adulti, altamente organo-specifiche, sono in grado di auto-rinnovarsi e differenziare nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento <sup>(63)</sup>.

Già da tempo tra le cellule staminali adulte sono state identificate le cellule staminali ematopoietiche (HSC) da cui originano tutte le cellule emopoietiche, cellule staminali nervose (NSC) da cui differenziano neuroni, oligodendrociti, condroblasti, ma più di recente sono state le cellule staminali mesenchimali (MSCs, Mesenchymal Stem Cells) ad attirare l'interesse dei ricercatori.

### 1.6.1 Cellule Staminali Mesenchimali (MSC)

Le MSCs sono cellule staminali adulte con caratteristiche di multipotenzialità ed elevata capacità proliferativa; sono, quindi, delle buone candidate per la terapia cellulare e la medicina rigenerativa.

Questa linea cellulare è in grado di differenziare in tessuti di origine mesenchimale, tra cui stroma midollare, tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo e muscolare scheletrico, come si può notare in figura 1.7 <sup>(65)</sup>. Inoltre secernono un ampio spettro di macromolecole che fungono da immuno-regolatori e per rigenerare il tessuto <sup>(62, 64)</sup>.



**Figura 1.7: Differenziazione delle MSCs in diversi tipi di cellule quali osteoblasti, condroblasti, muscolari, midollari, tendinee e fibroblasti.**

Le MSCs hanno quindi attirato l'attenzione per sviluppare future terapie cellulari e geniche in quanto sono facilmente ottenibili da tessuti adulti (superando problematiche di tipo etico), possono essere facilmente espanse e presentano un fenotipo superficiale scarsamente riconosciuto dai linfociti T, famiglia di globuli bianchi preposti alla difesa contro batteri, virus e cellule cancerose <sup>(66)</sup>.

Data la loro natura ipo-immunogenica, si consente il trapianto allogenico, che viene ben tollerato <sup>(67)</sup>, e la loro plasticità può essere sfruttata per una completa rigenerazione di tessuti danneggiati.

Alcuni studi hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo delle MSCs nel trattamento di difetti dell'osso, dati confermati anche nell'uomo in trial clinici dove sono state iniettate con successo, in sede di danno, MSCs autologhe coltivate *ex vivo* in pazienti affetti da patologie ossee <sup>(68)</sup>.

La combinazione della terapia genica con la terapia cellulare, utilizzando le MSCs, costituisce un'ottima via nella medicina rigenerativa, in quanto le MSCs presentano elevati potenziale replicativo e sopravvivenza.

Possono, quindi, essere sfruttate come trasportatori di geni o proteine all'interno di organi o tessuti che necessitano di una terapia genica particolare; infine, anche l'ingegneria tissutale potrebbe costituire un ulteriore campo di applicazione di queste cellule per ottenere tessuti ed organi utili per il trapianto.

Con questa tecnica, infatti, sarebbe possibile far proliferare le MSCs su uno scaffold apposito <sup>(69)</sup>.

In questo lavoro di tesi ci si è focalizzati sulle cellule staminali ossee, in particolare gli osteoblasti: le MSCs, infatti, possono migrare nella zona danneggiata, proliferare e seguire la linea di differenziazione cellulare che porta alla formazione di osteoblasti <sup>(70)</sup>, cellule genitrici degli osteociti.

La shell di idrossiapatite è stata scelta in quanto da un lato potrebbe simulare la matrice extracellulare delle cellule, e dall'altro potrebbe costituire una fonte di calcio e fosforo, due elementi essenziali per la vita delle cellule stesse. Potrebbero, quindi, costituire un ottimo scaffold per la crescita di quest'ultime. Inoltre, è stata indagata la tossicità delle nanoparticelle nei confronti dei batteri, in particolare l'*Escherichia coli*, in quanto gli scaffolds rappresentano un sito piuttosto sensibile alle infezioni microbiche.

## 2. Scopo

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare con un processo sol-gel <sup>(36, 53)</sup> nanoparticelle di zirconia, silice e titania, che, come riportato in letteratura, sono carriers utilizzati nel drug delivery, e di confrontarle dal punto di vista della tossicità nei confronti di cellule neoplastiche, U2OS, mesenchimali, MSCs, e di batteri, quali *Escherichia coli* ATCC 25922.

I carriers in questione sono stati anche caricati con doxorubicina, farmaco antineoplastico d'elezione per la cura dell'osteosarcoma, per eseguire dei test di loading e release.

La funzionalizzazione delle nanoparticelle di zirconia e titania è stata effettuata con due bifosfonati, un fosfonato ed una shell di idrossiapatite, finalizzata sia a scopi terapeutici che rigenerativi, mentre le nanoparticelle di silice non sono state funzionalizzate in quanto non presentano la stessa affinità con il fosfato.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 Materiali

I reagenti utilizzati per la sintesi delle nanoparticelle e le successive funzionalizzazioni sono stati i seguenti: *esadecilammmina* 90% (Alfa Aesar), *EtOH* 99,8% (AnalaR NORMAPUR), *NaF*, *Zr(OBut)<sub>4</sub>* 80%, *CTAB* 98%, *NaOH*, *TEOS* 98%, *MeOH* 99,8%, *Ti(OBut)<sub>4</sub>* 97%, *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* 99%, *CaCl<sub>2</sub>* 93%, *N,N-Bi(fosfonometil)glicina*, *Acido 2-fosfo-L-ascorbico* (Sigma Aldrich), *Metilen-Bifosfonato* gentilmente sintetizzato e fornito dal gruppo del prof. Alessandro Scarso, *acqua milliQ*, *Doxorubicina*, terreno di coltura *HyClone McCoy's 5A Media*, terreno di coltura *DMEM Low Glucose*, terreni di coltura *Agar Batteriologico Purificato* e *Tryptone Soy Agar* (Biolife).

### 3.2 Caratterizzazioni

I campioni di nanoparticelle sono state analizzate dal punto di vista morfologico e strutturale al FE-SEM (Field Emission – Scanning Electron Microscope) Zeiss Sigma VP. L'analisi statistica per la determinazione del diametro medio è stata eseguita tramite il software ImageJ, misurando per ogni batch almeno 1000 NPs.

L'area superficiale dei campioni è stata calcolata tramite l'equazione BET e la dimensione dei pori grazie alla teoria BJH. Le isoterme sono state ottenute tramite adsorbimento e desorbimento di azoto a 77°K.

Le misure di Zeta Potential sono state condotte all'università di Verona utilizzando lo strumento Zetasizer Nano SZ3600 ed al VEGA con NICOMP 380 ZLS.

Le misure allo spettrofotometro UV-VIS per valutare l'efficienza di caricamento e rilascio delle nanoparticelle sono state condotte utilizzando l'Agilent 8453.

Per le misure di XRPD è stato utilizzato lo strumento Philips X'Pert con geometria di Bragg Brentano.

La lettura dei pozzetti per valutare la mortalità cellulare è stata effettuata con lo strumento TECAN M1000Pro.

Le foto riguardanti i test di inibizioni sull'*E. coli* sono state acquisite grazie a Perkin Elmer Geliance 600 Image System.

### 3.3 Metodi

#### 3.3.1 Sintesi di nanoparticelle di zirconia

In un pallone contenente 90,26 mL di una soluzione 0,042 M di esadecilammina in EtOH sono stati aggiunti 0,366 mL di una soluzione 0,1M di NaF e 0,622 mL di acqua milliQ.

Contemporaneamente sono stati preparati 2,07 mL di una soluzione di EtOH con una concentrazione di 1,22 M di Zr(OBut)<sub>4</sub>.

La soluzione di precursore è stata aggiunta goccia a goccia nella soluzione di esadecilammina e la reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione overnight.

Il giorno seguente per fermare la reazione la soluzione è stata centrifugata per 15 min a 9000 g e sono stati eseguiti tre lavaggi successivi con EtOH e acqua milliQ. Il pellet è stato lasciato ad asciugare sotto cappa tutta la notte.

Una volta recuperato, la polvere è stata pesata, posta in una bomba al teflon e risospesa in 12,5 mL di EtOH e 6,25 mL di acqua milliQ per grammo di polvere. In seguito, è stata posta in stufa a 170°C per 16h per il trattamento idrotermale.

Al termine, il campione è stato lavato con EtOH e acqua milliQ fino a completa asciugatura; è stato, quindi, posto in un pallone in bagno a olio a 120°C e collegato alla linea da vuoto per l'estrazione del surfattante per tutta la notte.

Al termine del processo, il campione è stato lavato nuovamente con EtOH e acqua milliQ e macinato.

#### 3.3.2 Sintesi di nanoparticelle di silice

In un becher è stata aggiunta una soluzione 0,0054 M di CTAB in 250 mL di acqua milliQ e 1,75 mL di una soluzione di NaOH 2M.

Sotto vigorosa agitazione sono stati aggiunti 38 mL di esano e, formatasi l'emulsione, l'agitazione è stata bloccata per separare le due fasi.

Sono stati aggiunti 2,5 mL di TEOS alla fase superiore e la soluzione è stata posta sotto vigorosa agitazione per 4h.

Al termine, la soluzione è stata lavata con acqua milliQ e MeOH ed è stata lasciata ad asciugare.

La polvere così ottenuta è stata macinata e posta a calcinare a 550°C per 6h.

### 3.3.3 Sintesi di nanoparticelle di titania

In un pallone contenente 80 mL di una soluzione 0,02 M di esadecilammina in EtOH sono stati aggiunti 0,3 mL di una soluzione 0,1 M di NaF e 0,6 mL di acqua milliQ.

Contemporaneamente sono stati preparati 2,93 mL di una soluzione EtOH con una concentrazione di 1,13 M di Ti(OBut)<sub>4</sub>.

La soluzione di precursore è stata aggiunta goccia a goccia lentamente nella soluzione di esadecilammina e la reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione overnight.

Il giorno seguente per fermare la reazione la soluzione è stata centrifugata per 15 min a 9000 g e sono stati eseguite tre lavaggi successivi con EtOH e acqua milliQ. Il pellet è stato lasciato ad asciugare sotto cappa per tutta la notte.

Una volta recuperato, la polvere è stata pesata, posta in una bomba al teflon e risospesa in 12,5 mL di EtOH e 6,25 mL di acqua milliQ per grammo di polvere. In seguito è stata posta in stufa a 160°C per 16 h per il trattamento idrotermale.

Al termine, il campione è stato lavato con EtOH e acqua milliQ fino a completa asciugatura; è stato, quindi, posto in un pallone in bagno a olio a 120°C e collegato alla linea da vuoto per l'estrazione del surfattante per tutta la notte.

Al termine del processo, il campione è stato lavato nuovamente con EtOH e acqua milliQ e macinato.

### 3.3.4 Funzionalizzazioni

La funzionalizzazione delle nanoparticelle è stata eseguita su campioni di zirconia e titania con le molecole riportate in tabella 3.1.

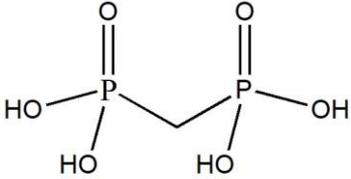
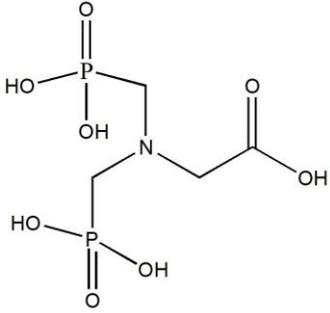
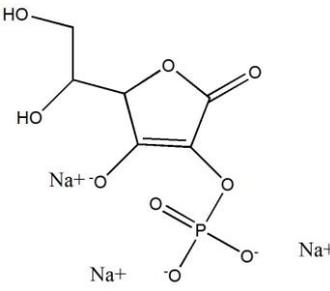
	Concentrazione	Molecola
Metilen-bifosfonato (MBP)	5 mM	
N,N-bi(fosfonometil)glicina	5 mM	
Acido 2-fosfo-L-ascorbico	5 mM	
Idrossiapatite	1:10 rispetto alle NPs	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$

Tabella 3.1: Molecole utilizzate per la funzionalizzazione delle nanoparticelle di zirconia e titania.

Le concentrazioni dei bifosfonati, del fosfonato e dell'acido ascorbico sono state scelte in modo da ottenere l'efficienza massima di grafting density \* attorno alle nanoparticelle.

La concentrazione di idrossiapatite, invece, è stata scelta in modo da ottenere una shell il più uniforme possibile sulla superficie delle nanoparticelle di zirconia. In particolare è stata scelta la concentrazione 1:10 in rapporto molare in quanto permette di ottenere una shell uniforme sulla superficie delle NPs <sup>(71)</sup>.

La funzionalizzazione con queste molecole è stata eseguita sulle nanoparticelle di zirconia, in quanto è nota l'elevata affinità esistente tra zirconio e fosforo <sup>(72, 73)</sup>, e sulle nanoparticelle di titania, le quali hanno presentato un comportamento analogo alla zirconia.

La funzionalizzazione è avvenuta lasciando sotto agitazione le nanoparticelle con le diverse soluzioni di bifosfonato e acido ascorbico in acqua milliQ, per un'ora a temperatura ambiente.

Al termine, la soluzione è stata centrifugata per 10 min ed il pellet così ottenuto è stato risospeso in tre diverse soluzioni, acetato di sodio 20 mM a pH 4,5, HEPES 20 mM (acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinetansulfonico) a pH 7,5 e CAPS 20 mM (acido N-cicloesil-3-amminopropansulfonico) a pH 10.

\*Calcolo della grafting density:

$n^\circ \text{ molecole/m}^2 = n^\circ \text{ molecole caricate} / (\text{area superficiale} * \text{mg di NPs})$

$GD = (1 / \text{area molecola (nm}^2)) / n^\circ \text{ Avogadro}$

### 3.3.5 Sintesi della shell di idrossiapatite

Per la sintesi della shell di idrossiapatite <sup>(74)</sup> sono stati prelevati 100 mg di nanoparticelle di zirconia e posti in un pallone a reagire con 3,4 mL di una soluzione di  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0,24 M a pH 12.

La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 2h in bagno a olio a 50°C.

Al termine, sono stati aggiunti goccia a goccia 2 mL di una soluzione di  $CaCl_2$   $6,21 \times 10^{-2}$  M e la soluzione è stata trasferita in una bomba al teflon per essere posta in muffola a 120°C per 20h; è stata lavata con EtOH e acqua milliQ e la polvere così ottenuta è stata macinata prima della caratterizzazione e dei test.

Tutte le nanoparticelle sintetizzate sono state caratterizzate mediante BET per un'analisi dell'area superficiale e dimensione dei pori, SEM per un'indagine morfologica e strutturale, XRD per un'analisi della struttura cristallografica e Zeta Potential per valutare la carica superficiale al variare del pH.

### **3.3.6 Loading e release**

#### **3.3.6.1 Loading**

Il caricamento delle nanoparticelle è stato eseguito preparando diverse sospensioni di nanoparticelle di silice, zirconia e titania da 0,5 mL 5 mg/mL, alle quali è stata aggiunta DOX 1 mg/mL utilizzando quattro diversi solventi quali acqua milliQ, NaAc, HEPES e CAPS.

Le sospensioni così preparate sono state lasciate sotto vigorosa agitazione overnight ed al termine sono state centrifugate per 10 min. Il surnatante è stato prelevato ed è stato analizzato all'UV-VIS per quantificare la DOX assorbita dalle nanoparticelle.

$$\text{Loading (\%)} = \frac{(\text{Quantità di DOX iniziale}) - (\text{quantità di DOX restante})}{\text{NPs caricate}} \times 100$$

#### **3.3.6.2 Release**

Il processo di release è stato eseguito preparando diverse sospensioni da 15 mL con una concentrazione compresa tra 0,022 mg/mL e 0,033 mg/mL di nanoparticelle, concentrazione scelta in modo da rispettare la linearità della legge di Lambert – Beer; le sospensioni sono state lasciate sotto agitazione e sono stati eseguiti dei prelievi a tempi prestabiliti (0, 10, 30, 60, 120, 240, 480 e 1440 minuti).

La soluzione così prelevata è stata centrifugata per 5 min. Il surnatante è stato recuperato ed è stato analizzato all'UV-VIS per quantificare il progressivo rilascio della DOX.

I solventi utilizzati sono stati acqua milliQ e tre diversi tamponi: NaAc 20 mM a pH 4,5, HEPES 20 mM a pH 7,3 e CAPS 20 mM a pH 10, scelti per valutare la possibile modulabilità del rilascio del farmaco in condizioni di pH differenti.

$$\text{Release (\%)} = \frac{(\text{Quantità di DOX nel surnatante})}{(\text{Quantità di DOX caricata inizialmente})} \times 100$$

### 3.3.7 Citotossicità

Per i test di citotossicità sono state utilizzate le linee cellulari U2OS e MSCs, mentre per i test sui batteri è stato utilizzato l'*Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 3.3.7.1 U2OS

Le U2OS sono state coltivate nel terreno McCOY'S, lavate con PBS e quindi trattate con tripsina (a diverse concentrazioni in base al tipo cellulare).

In seguito, sono stati eseguiti tre lavaggi con il terreno di coltura e una centrifuga a 1200 g per 5 min.

Per la conta delle cellule è stata utilizzata la camera di Burkner, uno strumento grazie al quale è stato possibile quantificare le cellule al microscopio ottico.

Le cellule sono state, quindi, aggiunte ai pozzetti (circa 500 cellule per pozzetto) e lasciate per 24 h in incubatore a 37°C.

### **3.3.7.2 Cellule Staminali mesenchimali**

Le MSCs sono state coltivate nel terreno DMEM Low Glucose e la procedura seguita è stata la stessa descritta nel paragrafo 3.2.7.1.

Al termine delle 24 h sono stati aggiunti i campioni ai vari pozzetti in diverse concentrazioni e le cellule sono state lasciate in incubatore a 37°C per 72h.

Al termine, è stato eliminato il terreno e in ogni pozzetto sono stati aggiunti 20 µL di Cell Titer-Glo Luminescent che induce una reazione enzimatica che rileva la quantità di ATP, la quale correla positivamente con la vitalità cellulare.

### **3.3.7.3 Escherichia coli**

L'*Escherichia coli* ATCC 25922, un batterio gram-negativo, è stato utilizzato per i test di tossicità antimicrobica con le nanoparticelle.

È stato eseguito un test su piastra ed un test in liquido.

Per quanto riguarda il test su piastra, la piastra iniziale è stata preparata strisciando un'aliquota di cultura batterica da stock in glicerolo sul terreno Nutrient Agar e lasciata ad incubare a 37°C overnight.

Al termine, le colonie formatesi sono state utilizzate sia per l'inoculo in piastra che per quello in liquido; sono state, infatti, prelevate due colonie distinte, inserite in due tubi a doppia ventilazione con il terreno e poste nuovamente ad incubare a 37°C overnight.

Successivamente è stato misurato il valore di Densità ottica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) e sono state preparate delle diluizioni seriali in 4 mL di terreno per ottenere 400 CFU circa su ogni piastra.

Il terreno delle piastre è stato preparato aggiungendo le seguenti concentrazioni di nanoparticelle di zirconia, silice e titania: 0,25, 1 e 4 mg/mL.

Sono state preparate, inoltre, due piastre per il controllo negativo e due di contaminazione per escludere la presenza di altri ceppi batterici.

Per il test in liquido è stata eseguita la stessa procedura descritta precedentemente, ma in questo caso le nanoparticelle sono state aggiunte al terreno presente nei tubi da inoculo (con un

volume finale di 2 mL) e sono stati eseguiti prelievi successivi a tempi prestabiliti e misurati all'UV-VIS.

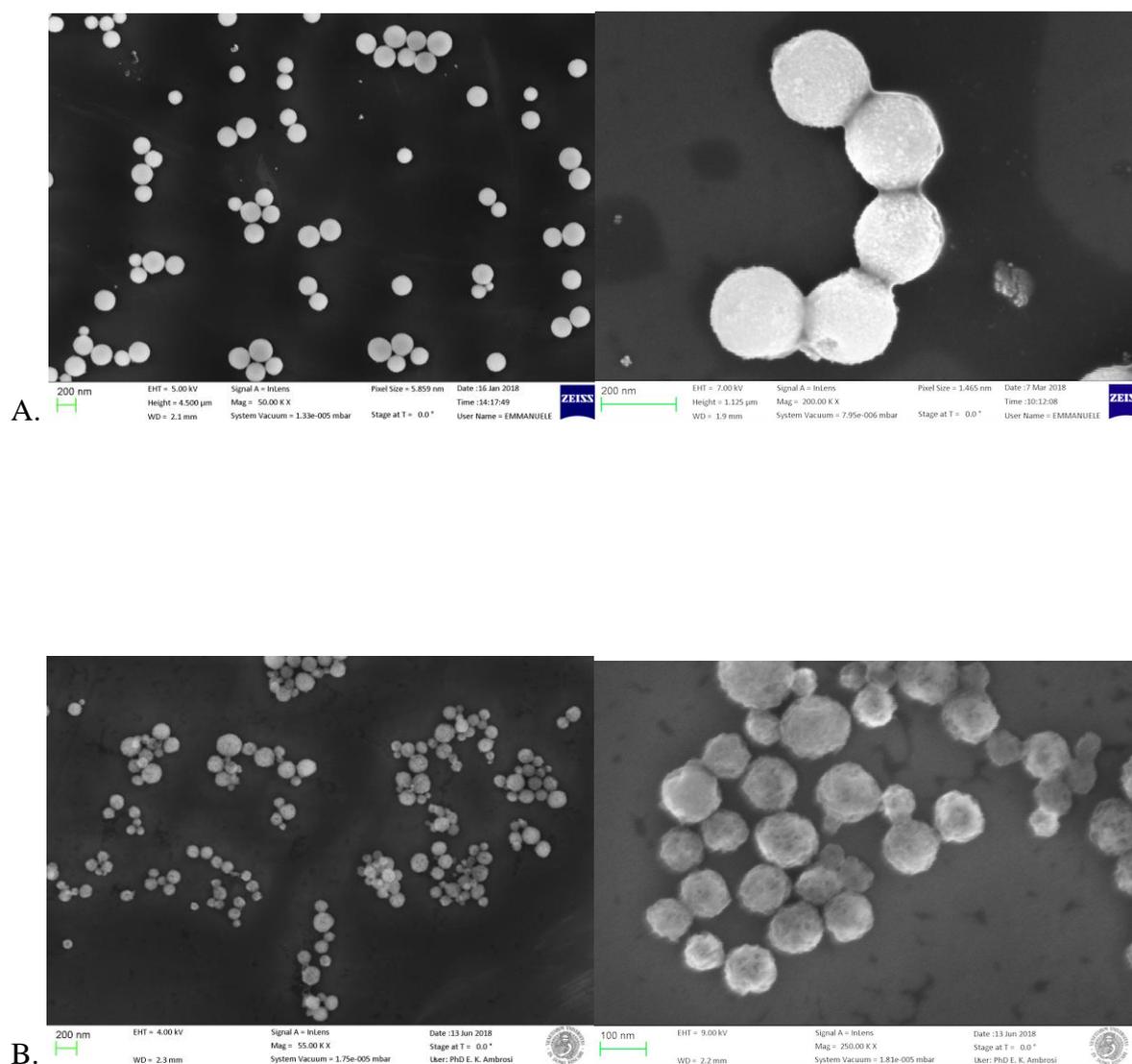
Tutti i test sono stati eseguiti in duplicato ed in condizioni di sterilità.

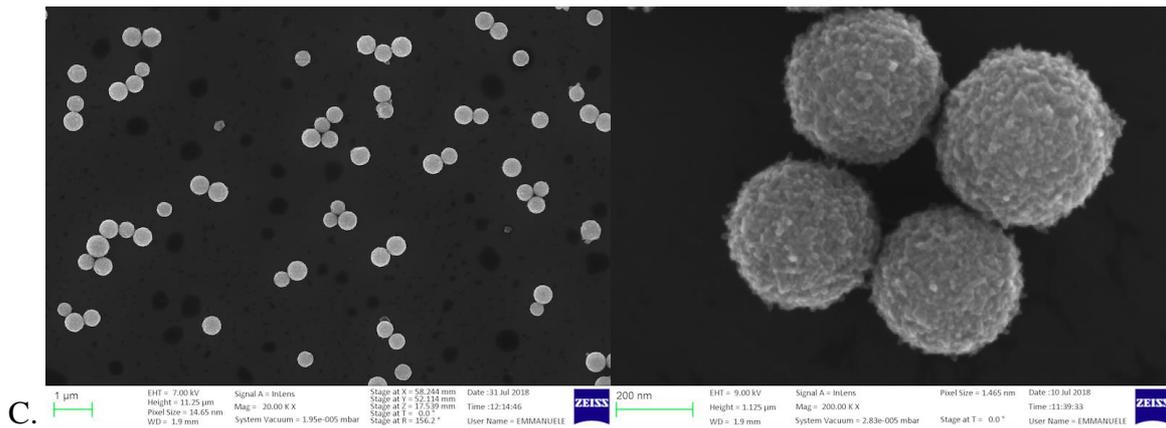
## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Analisi morfologica e strutturale

Inizialmente, i campioni sono stati analizzati al microscopio elettronico a scansione (SEM) per una verifica della struttura morfologica.

Si riportano in figura 4.1 le immagini dei campioni analizzati.





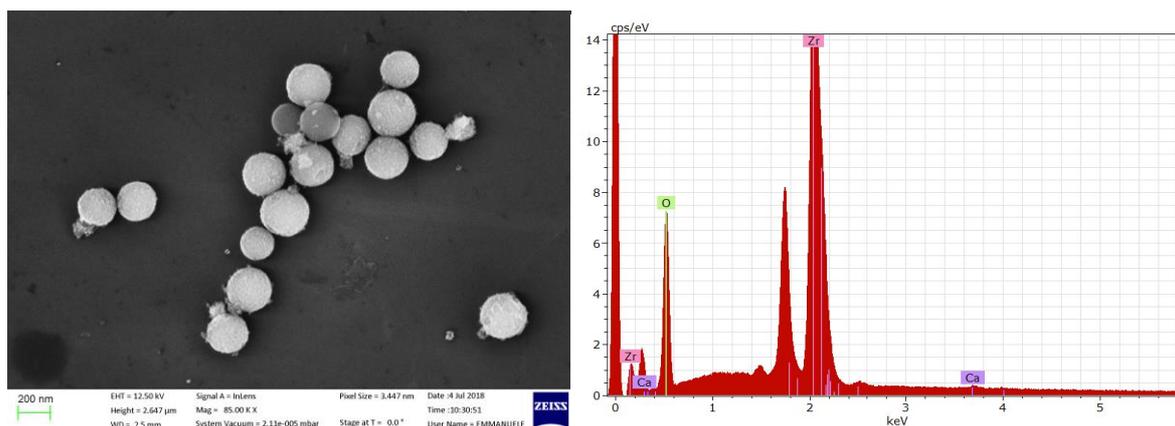
**Figura 4.1: Immagini SEM di nanoparticelle di zirconia (A), silice (B) e titania (C). Sulla sinistra di A e C si nota la monodispersione delle nanoparticelle, mentre in B si evidenzia una minor omogeneità. Sulla destra, invece, si evidenzia la superficie rugosa delle stesse, riconducibile alla loro porosità.**

Le immagini riportate si riferiscono rispettivamente alle nanoparticelle di zirconia (figura A), nanoparticelle di silice (figura B) e alle nanoparticelle di titania (figura C).

I campioni di zirconia e titania risultano essere monodispersi e di forma sferica, mentre le nanoparticelle di silice, pur essendo anch'esse di forma sferica, sono meno omogenee.

L'analisi dimensionale è stata effettuata mediante il software di analisi di immagini ImageJ su 1000 nanoparticelle per campione e ha permesso di valutarne le dimensioni:  $274 \pm 39$  nm per la zirconia,  $110 \pm 17$  nm per la silice e  $453 \pm 43$  nm per la titania.

Per i campioni di zirconia rivestiti dalla shell di idrossiapatite, oltre alla valutazione morfologica eseguita al SEM, è stata effettuata anche una microanalisi mediante spettroscopia EDX per verificare la presenza di calcio e fosforo, i due elementi caratteristici dell'idrossiapatite, come si vede in figura 4.2.



**Figura 4.2: Immagine SEM di nanoparticelle di zirconia rivestite da una shell di idrossiapatite (a sinistra) e spettro EDX (a destra) in cui si evidenziano i picchi dello zirconio e del calcio.**

Come si evince dalla figura 4.2, l'immagine SEM (a sinistra) rivela la presenza di alcuni depositi sulla superficie delle nanoparticelle di zirconia, probabilmente riconducibili alla formazione di idrossiapatite.

Lo spettro EDX (a destra) mostra la presenza di calcio (ad un valore di  $K\alpha$  pari a 3,69 keV), anche se molto bassa. Infatti se ne calcola una concentrazione di 0,75% in peso e 1,7% atomico rispetto alla concentrazione totale di calcio e zirconio presenti.

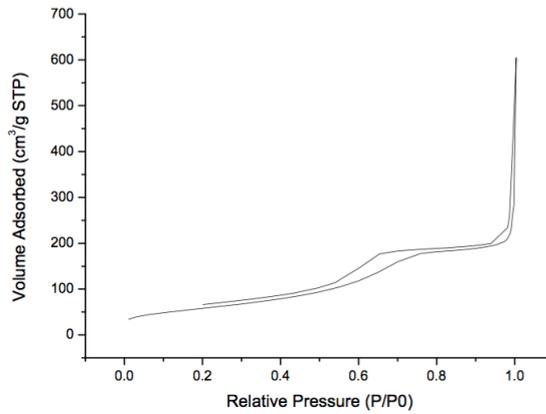
Il fosforo, però, elemento costitutivo dell'idrossiapatite, non si evidenzia in quanto presenta un valore di  $K\alpha$  molto simile a quello dello zirconio, quindi non è possibile accertare la sua presenza.

#### 4.2 Fisisorbimento di $N_2$

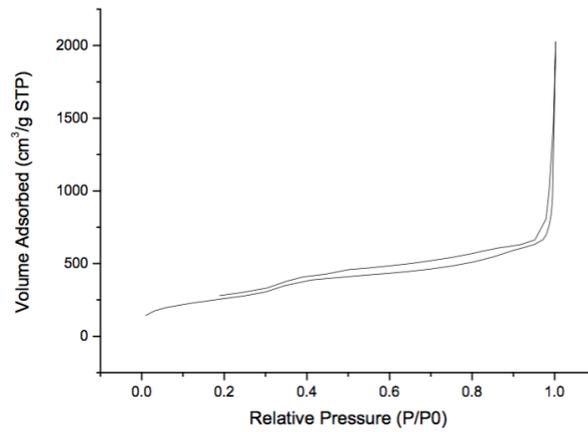
Successivamente i campioni sono stati sottoposti all'analisi superficiale a punto singolo per valutare l'area superficiale e la dimensione dei pori.

La zirconia presenta un'area superficiale di  $199 \pm 2$ , la silice di  $1012 \pm 4$  e la titania di  $78 \pm 1$   $m^2/g$ .

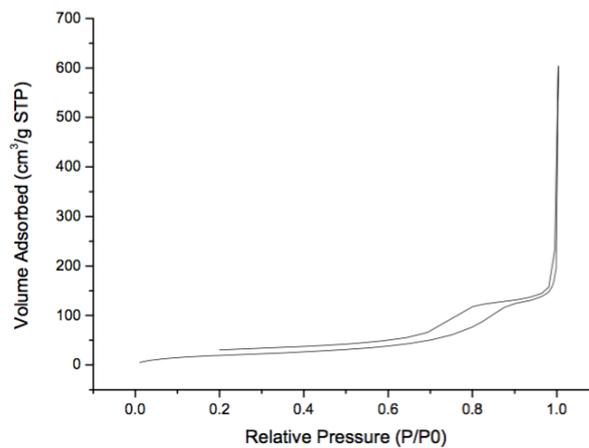
Tutti e tre i tipi di nanoparticelle presentano l'isoterma di tipo IV, secondo la classificazione di Langmuir, caratteristica dei sistemi mesoporosi, come si può notare in figura 4.3.



A.



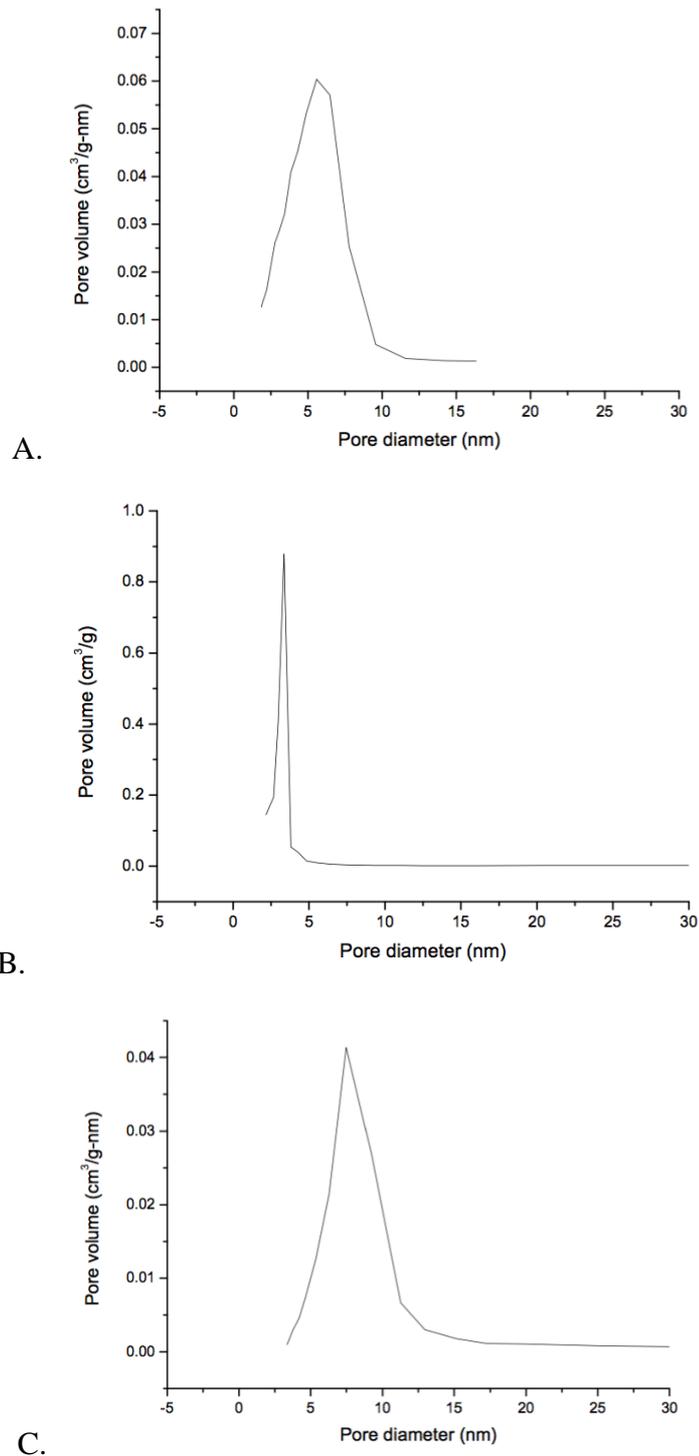
B.



C.

**Figura 4.3: Curve di fisisorbimento di N<sub>2</sub> delle nanoparticelle di zirconia (A), silice (B) e titania (C), tutte isoterme di tipo IV specifiche di sistemi mesoporosi.**

Per quanto riguarda la dimensione dei pori delle nanoparticelle, in figura 4.4 si riportano le distribuzioni dei diversi campioni secondo la teoria BJH.



**Figura 4.4: Distribuzione dei pori nei campioni di zirconia (A), silice (B) e titania (C). Si evidenzia una distribuzione piuttosto stretta, indice di una certa omogeneità della porosità delle nanoparticelle.**

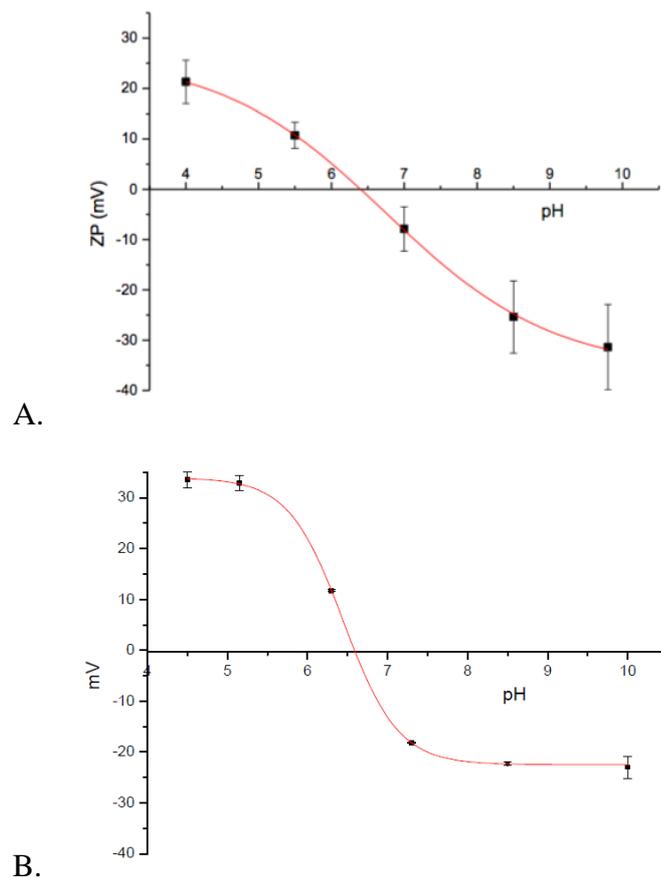
Dalle distribuzioni riportate in figura 4.4 è stato possibile ricavare il diametro dei pori, di 4,5 nm per la zirconia, 12,1 nm per la titania e 4,6 nm per la silice.

Dall'analisi dei campioni e delle curve di fisisorbimento ottenute, si evince che tutti i batches esaminati attengono ad un sistema mesoporoso, in quanto le dimensioni dei pori sono comprese tra i 2 e i 50 nm.

### 4.3 Zeta Potential

Le misure di Zeta Potential sono state eseguite per valutare la carica superficiale delle nanoparticelle al variare del pH.

Inizialmente sono state analizzate le nanoparticelle di zirconia e titania non funzionalizzate, come riportato in figura 4.5.



**Figura 4.5: ZP di nanoparticelle di zirconia (A) e di titania (B). Si nota che il valore di ZP varia da valori positivi a valori negativi all'aumentare del pH e si evidenzia il punto isoelettrico, che si attesta tra un pH 6 e un pH 7 sia per la zirconia che per la titania.**

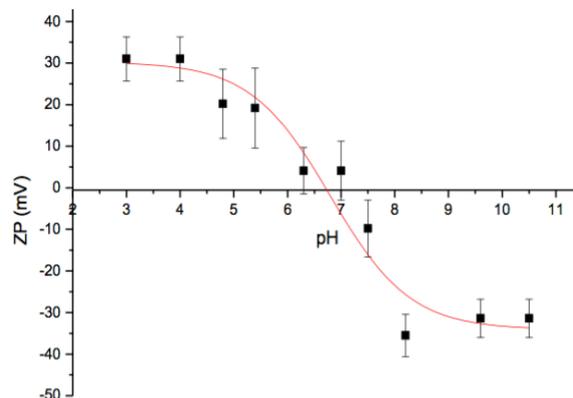
Come si nota in figura 4.5, le curve dei due tipi di nanoparticelle sono analoghe, quindi alle stesse condizioni di pH le nanoparticelle assumono un comportamento simile.

Il valore del potenziale assume valori sempre più negativi all'aumentare del pH, questo perché le nanoparticelle sono protonate a bassi pH, presentando quindi una carica positiva, e deprotonate a pH elevati, presentando una carica negativa. In particolare si nota una variazione da 20 mV a pH 4 fino a -30 mV ad un pH 10 per la zirconia, mentre da 33 mV a pH 4,5 fino -24 mV a pH 10 per la titania.

Il punto isoelettrico si evidenzia ad un pH compreso tra 6 e 7 sia per la zirconia che per la titania.

In seguito sono state analizzate le nanoparticelle di zirconia funzionalizzate con una shell di idrossiapatite.

In figura 4.6 se ne descrive la curva.

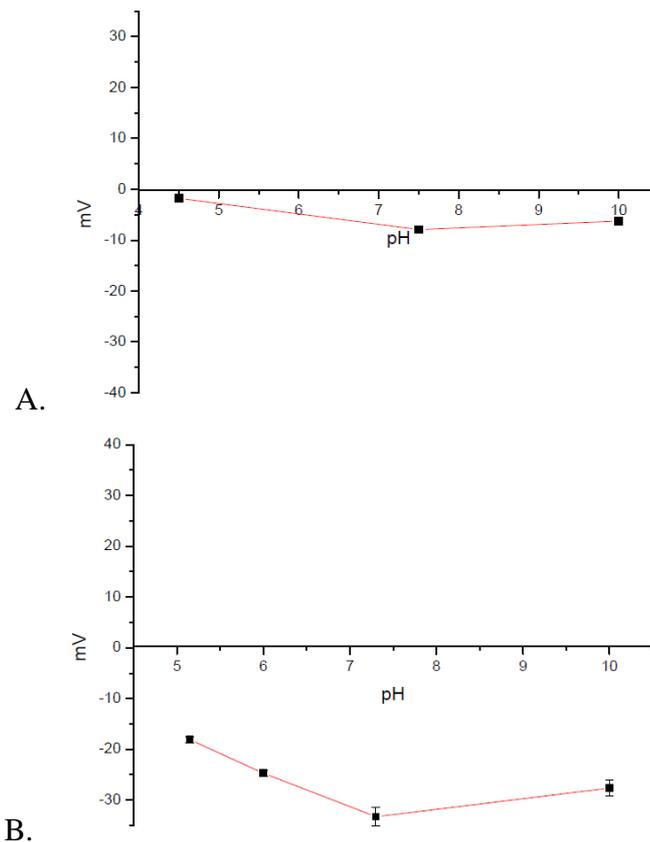


**Figura 4.6: ZP di nanoparticelle di zirconia rivestite con una shell di idrossiapatite; si evidenzia un comportamento sovrapponibile a quello delle nanoparticelle di zirconia.**

Come si evidenzia in figura 4.6 il comportamento di questo campione è analogo a quello delle nanoparticelle di zirconia tal quali al variare del pH.

È stato misurato, inoltre, lo ZP delle nanoparticelle funzionalizzate con i bifosfonati ed il fosfonato.

In figura 4.7 si riportano i grafici corrispondenti alle nanoparticelle di zirconia e titania funzionalizzate con MBP.

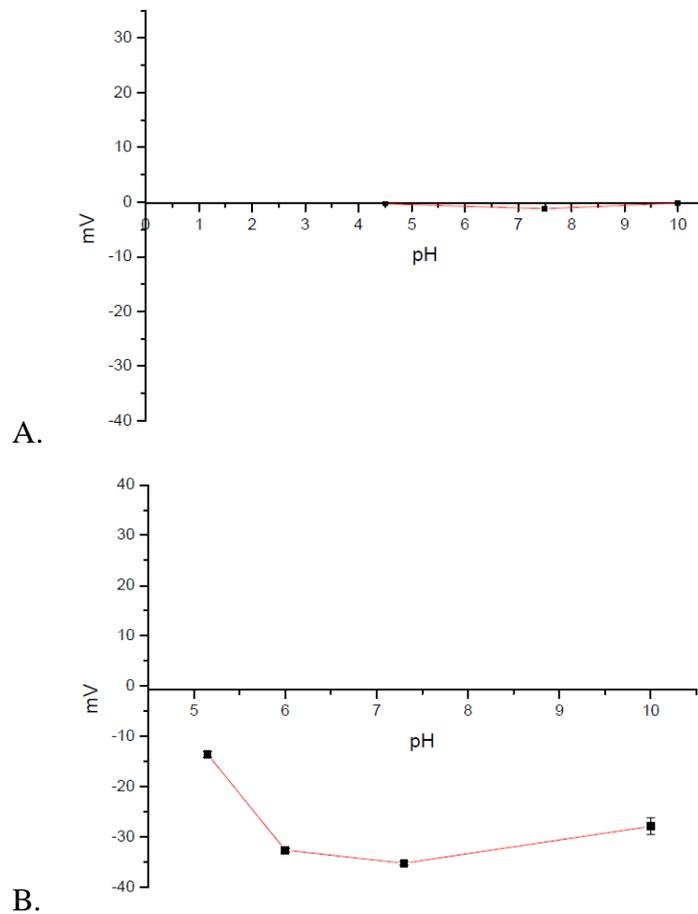


**Figura 4.7: ZP di nanoparticelle funzionalizzate con MBP di zirconia (A) e titania (B). Si nota che il potenziale assume valori sempre più negativi all'aumentare del pH fino a raggiungere un plateau.**

Come si può notare in figura 4.7 le nanoparticelle funzionalizzate con MBP (figura A per la zirconia e figura B per la titania) presentano un valore di ZP negativo anche a pH acido.

Per entrambi i batches, infatti, ad un pH 5 si ha un valore di -20 mV ed il potenziale diminuisce fino a raggiungere -30 mV a pH 7,3 quando raggiunge un plateau.

Per quanto riguarda le nanoparticelle funzionalizzate con BP-gly, si riportano i grafici corrispondenti in figura 4.8.



**Figura 4.8: ZP di nanoparticelle funzionalizzate con BP-gly di zirconia (A) e titania (B). Si nota che la curva B presenta un andamento analogo rispetto a quelle funzionalizzate con MBP, mentre la curva A non evidenzia significative variazioni di ZP.**

Come si evince dalla figura 4.8, le nanoparticelle di titania (figura B) presentano un andamento paragonabile a quello delle nanoparticelle funzionalizzate con MBP mentre la zirconia (figura A) non presenta significative variazioni di potenziale.

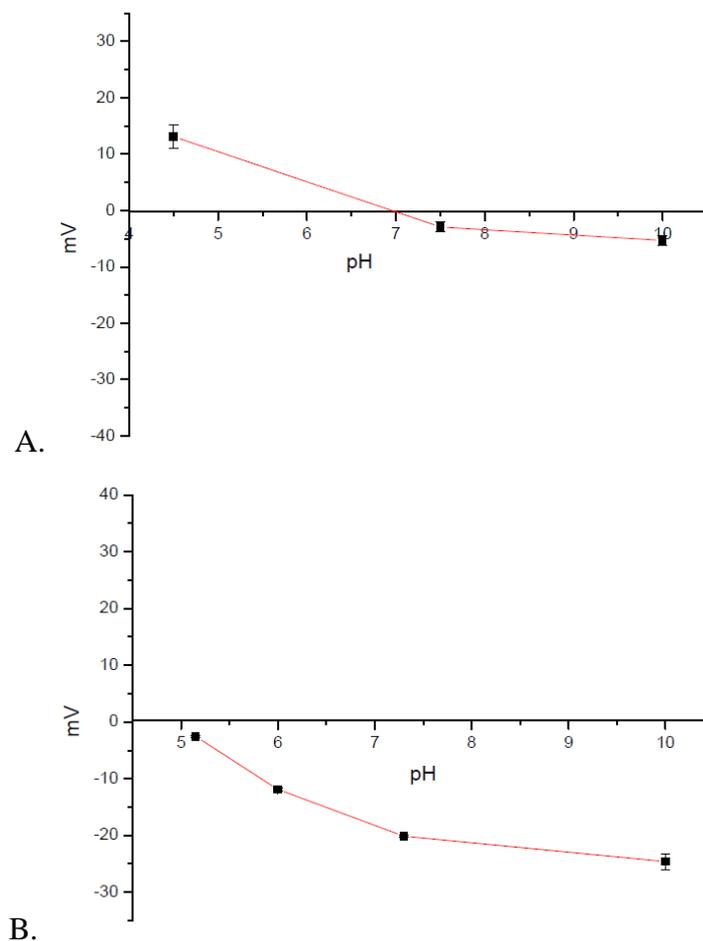
Per la titania, infatti, lo ZP varia da -15 mV ad un pH 5 a -35 mV ad un pH 7,3 dove raggiunge un plateau; per la zirconia, invece, il potenziale resta attorno allo zero, con una variazione da -0,31 a pH 4,5 fino ad un minimo di -1,2 a pH 7,5.

Ciò può essere dovuto ad una funzionalizzazione non ottimale.

In generale, però, si può notare che a pH elevati il potenziale tende a restare costante, probabilmente dovuto al fatto che i bifosfonati iniziano a dissociare.

Ciò potrebbe spiegare il leggero aumento del potenziale verso valori di pH più positivi.

Infine, si riportano i grafici dello ZP delle nanoparticelle funzionalizzate con P-ac.asc, in figura 4.9.



**Figura 4.9:** ZP di nanoparticelle funzionalizzate con P-ac.asc. di zirconia (A) e titania (B). Si nota che le nanoparticelle di titania seguono un andamento sovrapponibile alle precedenti, mentre quelle di zirconia presentano un andamento leggermente diverso, per quanto i valori di ZP diminuiscano all'aumentare del pH.

Come si nota in figura 4.9, la curva del potenziale delle nanoparticelle di titania (figura B) è paragonabile a quella delle precedenti nanoparticelle funzionalizzate, infatti il potenziale varia da -2,5 a pH 5,2 fino a -24,6 a pH 10.

La curva di ZP della zirconia, invece, pur presentando un andamento decrescente verso valori negativi, è leggermente differente rispetto alle precedenti funzionalizzazioni di campioni di zirconia. Il potenziale varia da 13,1 a pH 4,5 fino a -5,3 a pH 10.

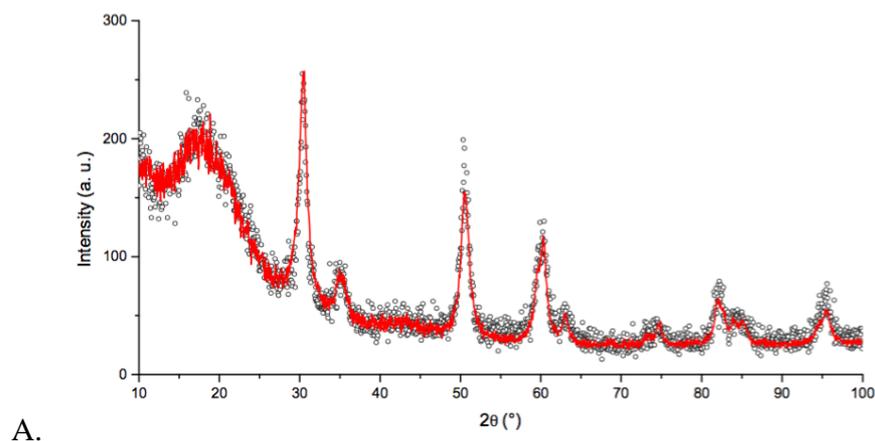
Le nanoparticelle di silice non sono state funzionalizzate in quanto, da studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio, non presentano affinità con il fosfato; per questo motivo non è stato ritenuto necessario valutare lo ZP.

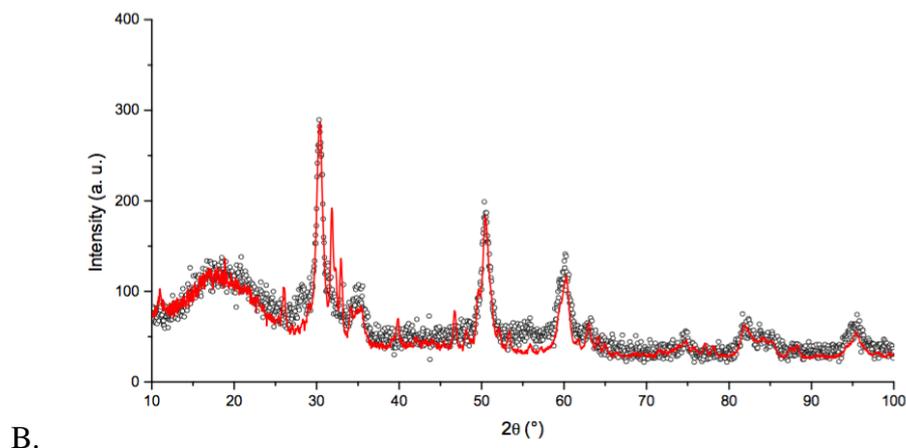
La funzionalizzazione potrebbe essere eseguita con APTES o CEST, molecole che presentano un'elevate affinità con la silice.

#### 4.4 XRPD

I campioni sono stati sottoposti ad analisi tramite diffrazione raggi X.

In figura 4.10 si riportano i grafici relativi all'analisi di un campione di MZN e di MZN@HAP.





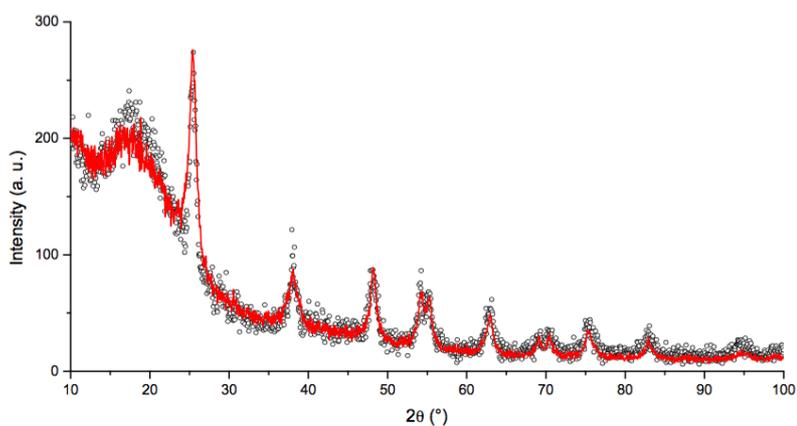
B.

**Figura 4.10: Analisi XRD dei campioni di MZN (A) e MZN@HAP (B). Il campione MZN risulta essere in fase tetragonale, mentre il campione MZN@HAP presenta il 50,2% di fase tetragonale ed il 49,8% di fase monoclinica.**

Come si evidenzia in figura 4.10, il campione di zirconia presenta una fase cristallografica tetragonale, mentre il campione funzionalizzato con la shell di idrossiapatite presenta il 50,2% di fase tetragonale ed il 49,8% di fase monoclinica.

Quest'analisi non ha permesso di rilevare la fase esagonale, caratteristica dell'idrossiapatite (71).

È stato analizzato anche il campione di MTN e se ne riporta il grafico in figura 4.11.



**Figura 4.11: Analisi XRD del campione MTN, il quale risulta essere in fase anatasio, con una dimensione dei cristalliti pari a 4,6 nm.**

Come si vede in figura 4.11, il campione di titania presenta la fase cristallografica anatasio.

Dall'analisi ai raggi X è stato possibile determinare, grazie all'equazione di Debye Scherrer, le dimensioni dei cristalliti dei campioni studiati, in particolare 4,6 nm per la titania e 4,2 nm per la zirconia; per quanto riguarda la zirconia con la shell di idrossiapatite le dimensioni dei cristalliti sono di 7,0 nm per quelli in fase tetragonale e di 2,3 nm in fase monoclina.

#### 4.5 Loading

Il processo di loading della doxorubicina all'interno delle nanoparticelle è stato eseguito per valutare l'efficienza di caricamento del farmaco antitumorale all'interno dei pori delle stesse.

Il test è stato eseguito su nanoparticelle di MZN, MSN, MTN e MZN@HAP.

Si riportano in tabella **4.1** i dati relativi ai loading delle nanoparticelle.

<b>Campione</b>	<b>Efficienza di loading in acqua milliQ (wt/wt)</b>
MZN	10 %
MSN	3 %
MTN	17 %
MZN@HAP	10 %

**Tabella 4.1:** Si nota che le MZN e le MZN@HAP presentano entrambe un caricamento del 10%, le MSN un'efficienza pari al 3% mentre le MTN pari al 17%.

Come si può notare in tabella 4.1, i risultati di loading delle nanoparticelle di MZN evidenziano un'efficienza di caricamento del 10% di DOX rispetto al peso delle nanoparticelle, efficienza analoga a quella delle nanoparticelle di MZN@HAP.

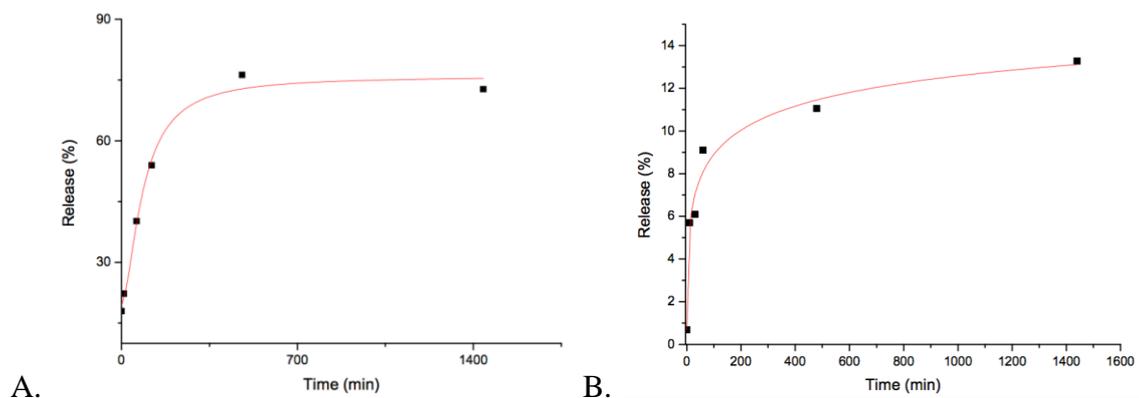
Per quanto riguarda le nanoparticelle di MTN si evidenzia un'efficienza di caricamento del 17%, mentre le nanoparticelle di MSN mostrano un'efficienza di loading pari al 3%.

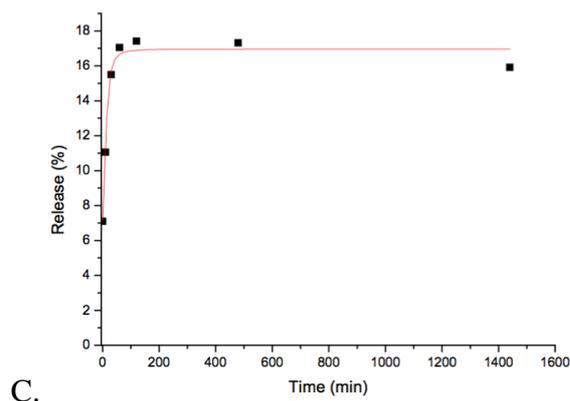
La differenza nell'efficienza di loading della DOX all'interno delle nanoparticelle può essere riconducibile a due fattori: da un lato le dimensioni dei pori, dall'altro lato il solvente utilizzato per il caricamento (acqua milliQ in questo caso), il quale può favorire o meno l'assorbimento del farmaco in quanto la variazione della forza ionica del solvente può influire positivamente o negativamente sul loading.

#### 4.6 Release

Il processo di release della doxorubicina è stato eseguito per valutare la quantità di doxorubicina che, una volta caricata all'interno delle nanoparticelle, viene rilasciata nel tempo in diverse condizioni di pH.

È stato testato il rilascio delle nanoparticelle di zirconia a tre diversi pH per valutare il diverso release della DOX all'esterno dei pori delle nanoparticelle, come si riporta in figura 4.12.





**Figura 4.12: Test di release della DOX dalle nanoparticelle di zirconia a diversi valori di pH: pH 4 (A), pH 6,5 (B) e pH 10 (C).**

Come si nota in figura 4.12, la curva di rilascio del farmaco a pH 4 (figura A) presenta una pendenza elevata fino a 120 min, indicando un veloce rilascio della DOX, per poi diminuire fino a 480 min quando raggiunge un plateau dopo aver rilasciato circa l'80% del farmaco.

Per quanto riguarda il rilascio a pH 6,5 (figura B) si nota un rapido release nei primi 120 min, per poi rallentare significativamente fino a 1440 min (24 h), quando raggiunge un plateau ad un valore di release di circa 14%.

A pH 10 (figura C), invece, si nota che la DOX viene rilasciata molto rapidamente nei primi 60 min e si raggiunge rapidamente un plateau dopo un release di circa il 18%; ciò può essere dovuto al fatto che a quel valore di pH si instaura un equilibrio tra la quantità di DOX in entrata nei pori e quella rilasciata nell'ambiente esterno.

Da notare, inoltre, che a pH 10 la DOX cambia colore e vira verso il rosso scuro in quanto degrada rapidamente all'aumentare del pH <sup>(20)</sup>.

È stato testato solo il rilascio delle nanoparticelle di zirconia in quanto le tempistiche dell'esperimento non hanno permesso di effettuare altre prove sugli altri campioni caricati.

#### 4.7 Test di tossicità nei confronti di linee cellulari e ceppi batterici

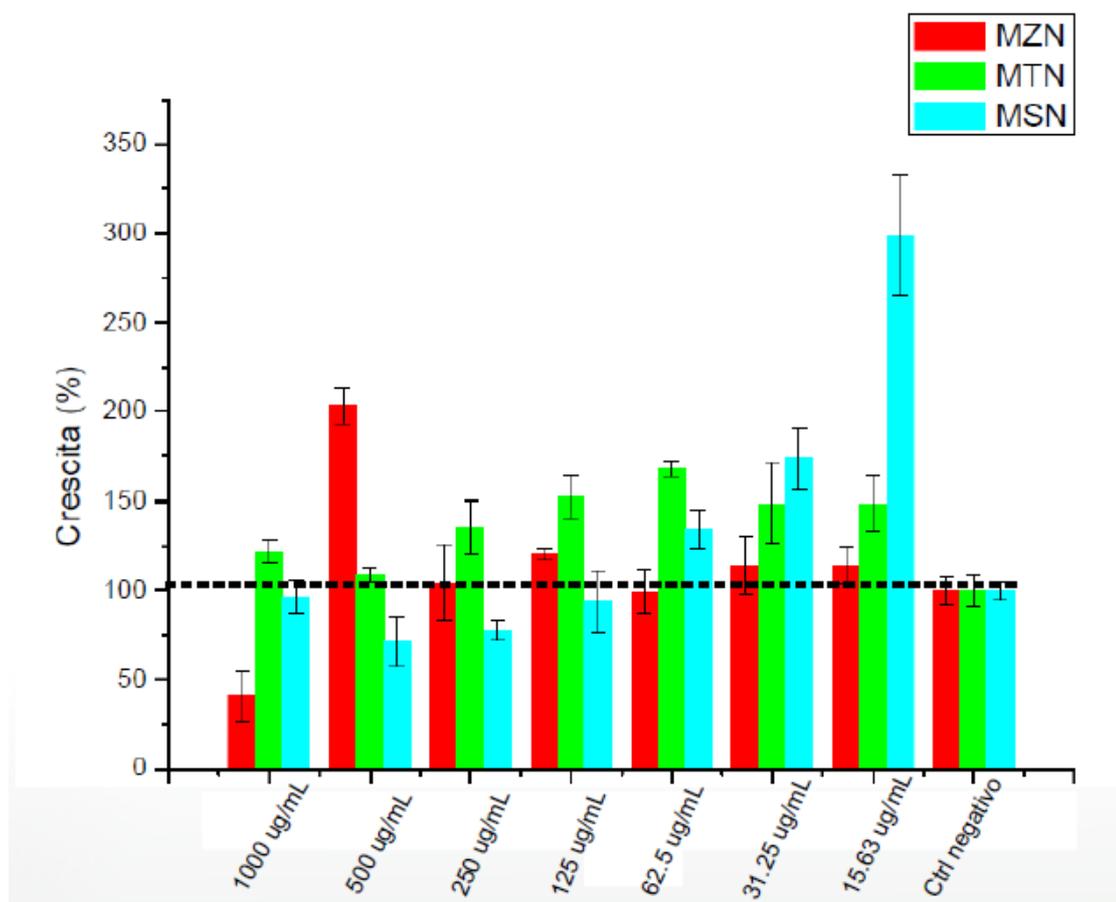
I test sono stati effettuati per valutare la tossicità delle nanoparticelle nei confronti della linea cellulare U2OS e MSCs e nei confronti dell'*E. coli*.

##### 4.7.1 U2OS

Su questa linea cellulare sono stati testati i campioni di nanoparticelle con e senza funzionalizzazione.

Sono state testate concentrazioni di nanoparticelle decrescenti da 1000  $\mu\text{g/mL}$  a 15,6  $\mu\text{g/mL}$  con fattore di diluizione 2.

Si riporta un grafico in figura 4.13 in cui si esprime la crescita cellulare al variare della concentrazione del campione testato.

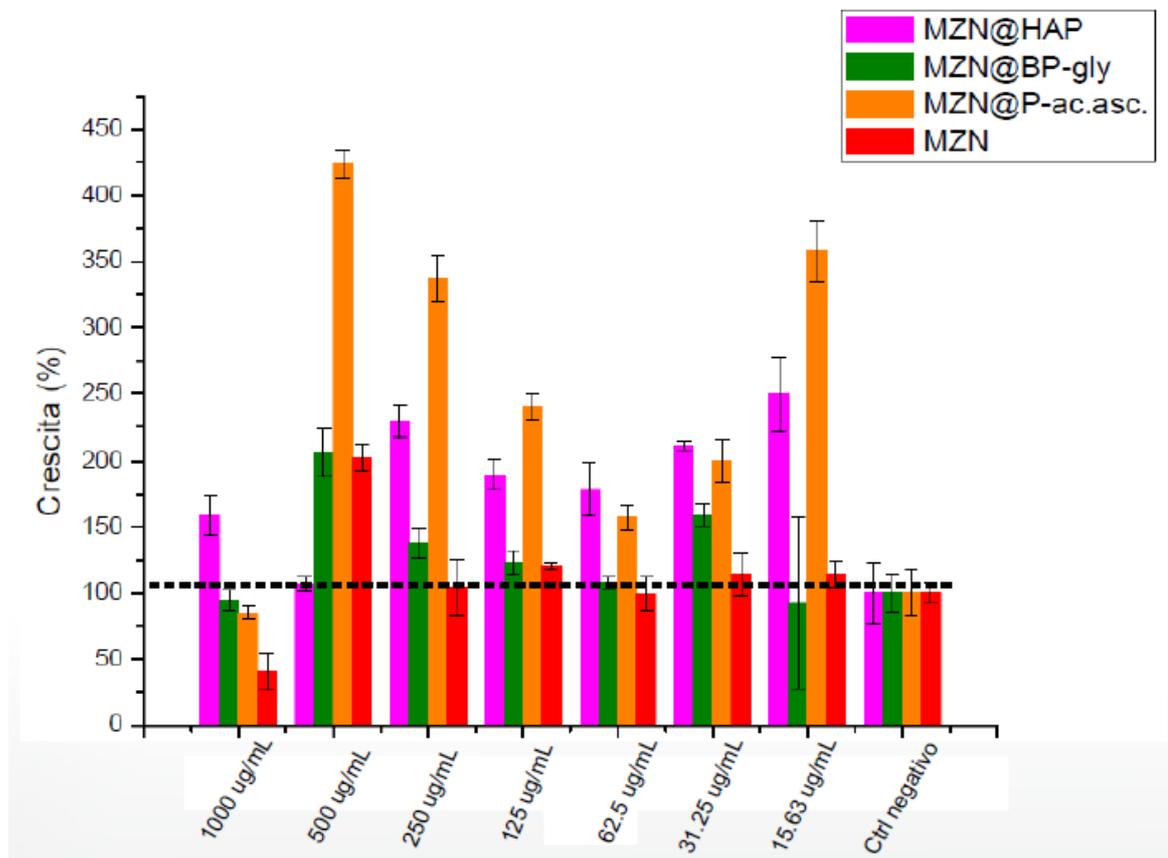


**Figura 4.13: Confronto della crescita delle U2OS trattate con nanoparticelle di MZN (rosso), MTN (verde) e MSN (azzurro). Si evidenzia un'inibizione del 60% della crescita cellulare da parte delle MZN alla concentrazione di 1000  $\mu\text{g/mL}$  ed una citotossicità da parte delle MSN fino a 125  $\mu\text{g/mL}$ .**

Come si nota in figura 4.13 le nanoparticelle di zirconia presentano un effetto di inibizione di crescita delle cellule del 60% a concentrazioni di 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; la silice sembra mostrare un'inibizione di circa il 25% a 500  $\mu\text{g/mL}$  e del 20% a 250  $\mu\text{g/mL}$ , dato supportato in letteratura <sup>(75)</sup>; si nota, però, come a 1000  $\mu\text{g/mL}$  non sembri mostrare citotossicità, ma ciò potrebbe rientrare nella normale variabilità di un sistema biologico.

La titania, invece, non mostra alcun effetto di tossicità rispetto al controllo negativo.

La stessa prova è stata ripetuta per i campioni di NPs funzionalizzate, come si vede in figura 4.14.



**Figura 4.14: Confronto della crescita delle U2OS trattate con nanoparticelle di MZN@HAP (rosa), MZN@BP-gly (verde), MZN@P-ac.asc. (arancione) e MZN (rosso). Le nanoparticelle così funzionalizzate non mostrano citotossicità e, rispetto alle MZN, sembra che la funzionalizzazione favorisca la crescita cellulare.**

Come si vede in figura 4.14 le nanoparticelle non mostrano citotossicità nei confronti delle U2OS; sembra, inoltre, che la funzionalizzazione favorisca la crescita cellulare rispetto al

controllo negativo, in particolare l'acido 2-fosfo-L-ascorbico, molecola scelta in quanto da letteratura <sup>(71, 77)</sup> sembra favorire il differenziamento delle MSCs in osteoblasti, e l'idrossiapatite, materiale biocompatibile e naturalmente presente nell'organismo, che da un lato costituisce una fonte di calcio e fosforo, due elementi essenziali per la vita delle cellule, e dall'altro simula la matrice extracellulare.

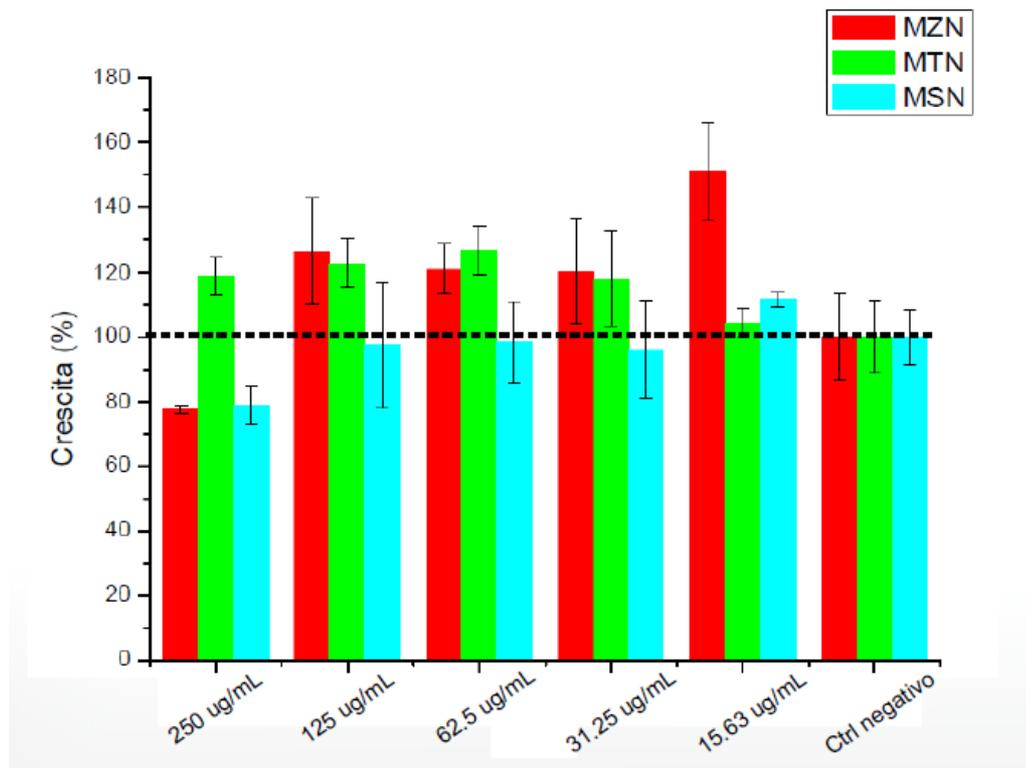
Queste nanoparticelle potrebbero costituire un ottimo candidato per la messa a punto di uno scaffold per la crescita delle stesse.

#### 4.7.2 MSCs

Su questa linea cellulare sono stati testati i campioni di nanoparticelle con e senza funzionalizzazione.

Per ogni campione di nanoparticelle, sono state testate concentrazioni decrescenti da 250 µg/mL a 15,6 µg/mL con fattore di diluizione 2.

In figura 4.15 si riporta il grafico con le NPs tal quali.

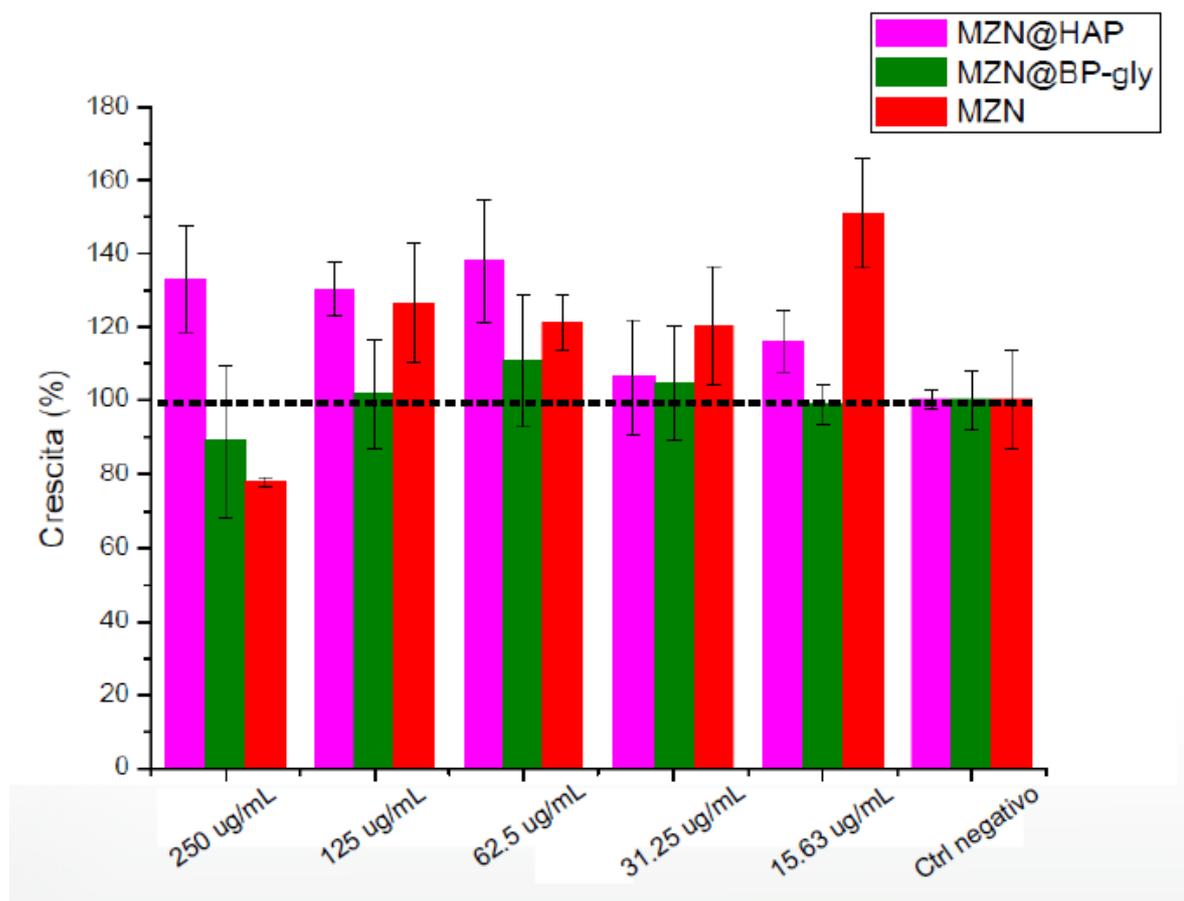


**Figura 4.15: Confronto della crescita delle MSCs trattate con nanoparticelle di MZN (rosso), MTN (verde) e MSN (azzurro). Si nota che solo la silice e la zirconia presentano un'inibizione del 20% nella crescita cellulare.**

Come si vede in figura 4.15 le nanoparticelle di zirconia e silice mostrano un effetto di inibizione nella crescita cellulare del 20%, rispetto al controllo negativo, solo alla concentrazione di 250 ng/mL, mentre la titania non presenta alcuna citotossicità.

Questa variazione rispetto al controllo negativo, però, potrebbe rientrare nell'intervallo di variabilità dei sistemi biologici.

Successivamente sono state testate le nanoparticelle funzionalizzate, utilizzando le stesse concentrazioni, come riportato nel grafico in figura 4.16.



**Figura 4.16: Confronto della crescita delle MSCs trattate con nanoparticelle di MZN@HAP (rosa), MZN@BP-gly (verde) e MZN (rosso). Solo le MZN presentano un'inibizione di crescita del 20% rispetto al controllo negativo.**

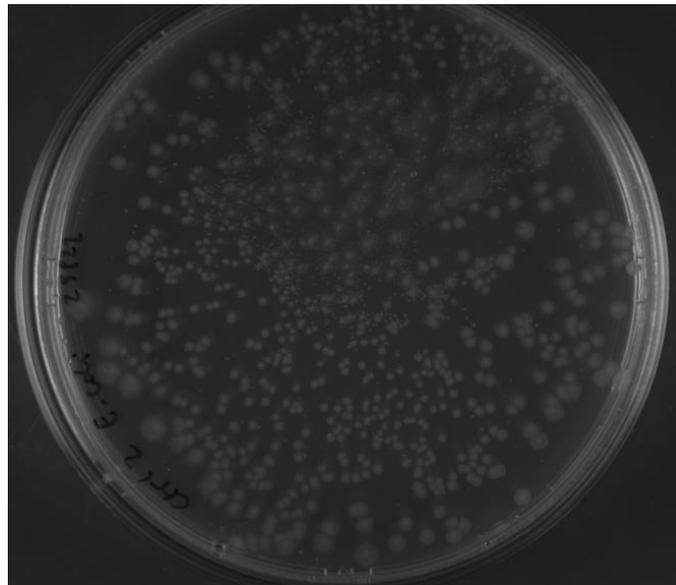
Come si nota in figura 4.16 l'andamento della crescita cellulare è analogo a quello visto per le U2OS, in quanto la funzionalizzazione con idrossiapatite ed il bisfosfonato sembra favorire la crescita cellulare, per i motivi precedentemente esposti.

Test successivi da eseguire riguardano le MSCs da trattare con le stesse nanoparticelle a concentrazioni maggiori, paragonabili a quelle delle U2OS.

#### 4.7.3. Test di inibizione batterica

I test di tossicità delle nanoparticelle su un ceppo modello di *E. coli* sono stati condotti utilizzando concentrazioni crescenti dei campioni di nanoparticelle all'interno del terreno di coltura, 0,25, 1 e 4 mg/mL.

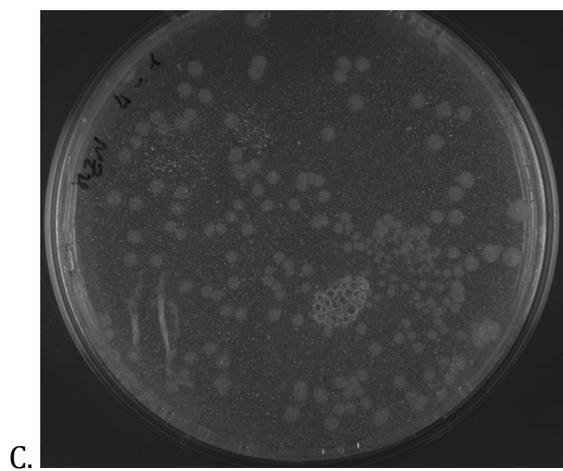
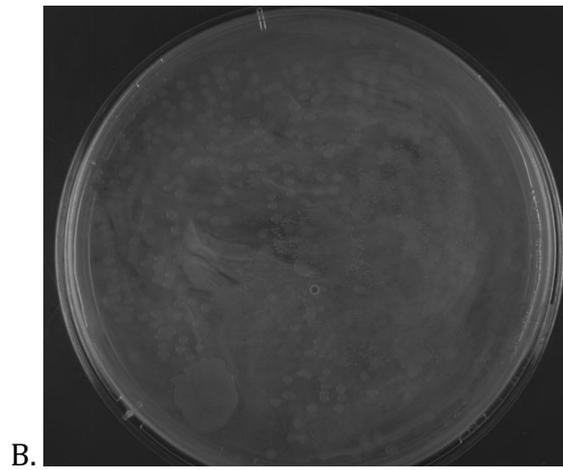
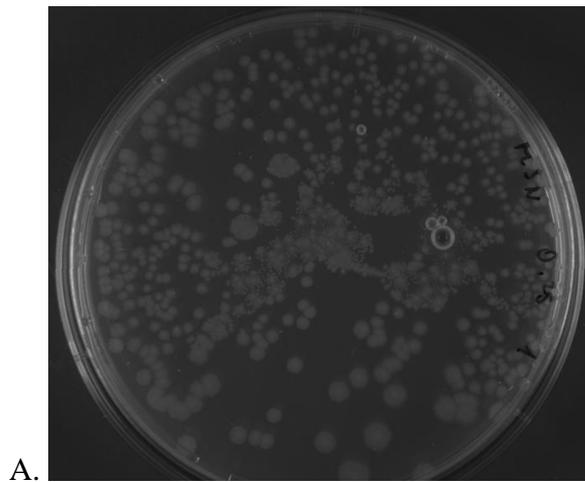
In figura 4.17 si riporta un esempio di piastra del controllo negativo.



**Figura 4.17: Esempio di piastra del controllo negativo, senza la presenza di nanoparticelle nel terreno di coltura.**

Come si può notare in figura 4.17, la piastra presenta le colonie caratteristiche della crescita dell'*E. coli* sul terreno di coltura privo di nanoparticelle.

In figura 4.18, invece, si riportano tre esempi di piastre con le nanoparticelle nel terreno.



**Figura 4.18: Esempi di piastre con la presenza di nanoparticelle nel terreno, in particolare nanoparticelle di silice (A), di titania (B) e zirconia (C).**

In figura 4.18 sono stati riportati degli esempi di piastre preparate aggiungendo diverse concentrazioni di nanoparticelle di silice, titania e zirconia al terreno di coltura, in particolare 0,25, 1 e 4 mg/mL.

Tutte le piastre risultano essere piuttosto simili, senza poter apprezzare la tossicità nella crescita del batterio testato; solo alle concentrazioni più elevate di nanoparticelle nel terreno di coltura, 4 mg/mL, si evidenzia una variazione nella morfologia delle colonie, in quanto risultano più grandi ma meno numerose.

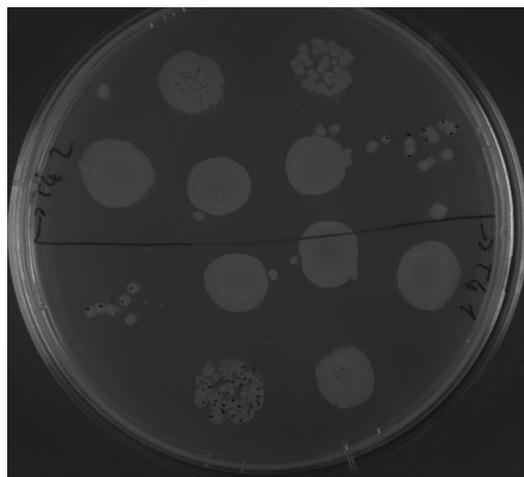
Ciò potrebbe indicare da un lato che queste concentrazioni siano troppo basse per poter rilevare una certa tossicità nei confronti di questo ceppo batterico oppure, dall'altro, che la diversa morfologia delle colonie sia attribuibile ad un effetto di tossicità.

Per quanto riguarda il test in liquido, invece, l'analisi all'UV-VIS non è stata ottimale in quanto le nanoparticelle hanno riportato uno scattering troppo elevato.

Di conseguenza sono state preparate le spot plate, un metodo che permette di effettuare le diluizioni seriali della coltura batterica sulla piastra.

Sebbene il test su piastra sia più immediato nella valutazione della crescita microbica, il test in liquido permette di individuare le cellule vive senza quantificare l'OD<sub>600</sub>, valore che potrebbe essere inficiato dallo scattering delle nanoparticelle.

In figura 4.19 se ne riporta un esempio.



**Figura 4.19:** Esempio di spot plate in cui, in duplicato, si riportano le diluizioni seriali effettuate sulla piastra.

In figura 4.19 si riporta un esempio di uno spot plate in cui si riportano, in duplicato, le diluizioni seriali della cultura di *E. coli*.

Tutte le piastre sono state preparate con le stesse diluizioni e in duplicato, ma risultano essere paragonabili fra loro, senza evidenziare una significativa variazione nella crescita dell'*E. coli*.

Solo le nanoparticelle di titania sembrano presentare un certo effetto di tossicità alla concentrazione di 4 mg/mL, quindi bisognerebbe campionare maggiormente nel range di concentrazioni tra 1 e 4 mg/mL.

In generale, però, si può dire che tutti i campioni testati non presentino un significativo effetto di tossicità nei confronti dell'*E. coli*.

## 5. Conclusioni

Questo lavoro di tesi mirava a sintetizzare tre tipi di nanoparticelle che, caricate con un farmaco antitumorale e funzionalizzate, potessero essere confrontate relativamente ai test di citotossicità nei confronti di cellule tumorali e staminali.

I test effettuati con le nanoparticelle di zirconia, silice e titania tal quali non hanno evidenziato alcuna citotossicità nei confronti di entrambe le linee cellulari; il campione di silice, invece, ha mostrato un certo effetto di inibizione nella crescita sia delle cellule U2OS che delle MSCs.

Analogamente, si può dire che le nanoparticelle funzionalizzate non mostrino alcuna citotossicità e sembrano favorire la crescita cellulare, forse per la presenza dei bifosfonati che fungono da fonte di fosforo, un elemento essenziale per la vita delle cellule.

Le nanoparticelle di zirconia rivestite con la shell di idrossiapatite, in particolare, mostrano un effetto maggiore nella crescita delle cellule, grazie alla presenza di fosforo e calcio; potrebbero, quindi, essere delle ottime candidate, da un lato per mimare la matrice extracellulare, dall'altro per fungere da scaffold per la crescita delle cellule stesse.

Per quanto riguarda il test di tossicità sull'*E. coli*, si è evidenziato un effetto di inibizione della crescita batterica solo alle concentrazioni più elevate di nanoparticelle di zirconia e titania presenti nel terreno di coltura; bisognerebbe, quindi, ripetere tutti gli esperimenti campionando il range di concentrazione compreso tra 1 mg/mL e 4 mg/mL, gap in cui si evidenzia un effetto di inibizione, utile per il calcolo della MIC.

Le nanoparticelle sono state, poi, caricate con il farmaco antitumorale doxorubicina per eseguire i test di loading e release ma sarebbe interessante ripetere i test anche sui campioni di nanoparticelle di zirconia, silice e titania con e senza funzionalizzazione, per indagare il diverso release del farmaco; inoltre, sarebbe interessante valutare la diversa citotossicità delle nanoparticelle caricate con la doxorubicina rispetto al farmaco utilizzato in forma libera.

Le prospettive future di questo lavoro riguardano gli utilizzi delle nanoparticelle nel campo della medicina rigenerativa, un ambito in cui si prevede l'utilizzo di cellule staminali per la riparazione di organi danneggiati.

Prima di tutto, tutti i campioni dovrebbero essere testati a concentrazioni maggiori sulle MSCs, in quanto i test effettuati non hanno evidenziato alcuna citotossicità.

Altre prove da eseguire riguarderebbero test di differenziazione delle MSC (Mesenchymal Stem Cells) in osteoblasti, cellule progenitrici degli osteociti; ciò potrebbe essere promettente per le terapie contro l'osteosarcoma.

Le nanoparticelle infatti, opportunamente funzionalizzate o caricate con molecole come i fattori di crescita, potrebbero favorire la differenziazione delle cellule e la loro proliferazione. Potrebbero, inoltre, come le nanoparticelle funzionalizzate con idrossiapatite, fungere da scaffold per la loro crescita.

## 6. Bibliografia

1. Jemal, F. Bray, M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, *Global cancer statistics*, *Cancer J Clin* 61 (2011) 69-90
2. G. Kibria, H. Hatakeyama, H. Harashima, *Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system*, *Arch. Pharm. Res.*37 (2014) 4-15
3. [www.airc.it](http://www.airc.it)
4. [www.ior.it](http://www.ior.it)
5. [www.eclinicalworks.com](http://www.eclinicalworks.com)
6. R. A. Durfee, M. Mohammed, H. H. Luu, *Review of osteosarcoma and current management*, *Rheumatol Ther* 3 (2016) 221-243
7. [www.microscopyu.com](http://www.microscopyu.com)
8. S. ferrari, E. Palmerini, M. E. Abate, *Osteosarcoma: tra presente e futuro*, *hematology meeting reports* 2007 1:(6)
9. M. Shahbazi, B. Herranz & Hèlder, A. Santos, *nanstructured porous Si-based nanoparticles for targeted drug delivery*, *Biomater.* (2012) 296-312
10. [www.italiansarcomagroup.org](http://www.italiansarcomagroup.org)
11. [www.aimac.it](http://www.aimac.it)
12. O. Tacar, P. Sriamornsak, C. R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery sistems*, *J. of Pharmacy* 65 (2012) 157-170
13. [www.torinomedica.it](http://www.torinomedica.it)
14. M. Baglioni, *Doxorubicina coniugata alla albumina umana lattosaminata: azione antineoplastica sui carcinomi epatocellulari indotti nel ratto dalla dietilnitrosammina*, Università degli Studi di Bologna 2008
15. S. Zhang, X.Liu, T. Bawa-Khalfe, L. Lu, Y. L. Lyu, L. Liu, E. T. H. Yeh, *Identification of molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*, *Nature medicine* 18 (2012) 1639-1642
16. C. F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, Howard, *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*, *Pharmacogenet Genomics*21 (2011) 440-446
17. C. Carvalho, R. X. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. J. Oliveira, M. S. Santos, P. I. Moreira, *Doxorubicin: the good, the bad and the ugly*, *Current Medicinal Chemistry* 16

- (2009) 3267-3285
18. F. Yang, S. S. Teves, C. J. Kemp, S. Henikoff, *Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1845 (2014) 84-89
  19. Y. Chen, P. Jungsuwadee, M. Vore, D. A. Butterfield, D. K. St. Clair, *Collateral damage in cancer chemotherapy*, *Molecular Interventions* 7 (2007) 3
  20. A. Scomparin, *Sviluppo di nuovi sistemi nanovettoriali per il rilascio controllato e selettivo di farmaci e molecole attive*, Università degli Studi di Padova 2011-2013
  21. L. Lippiello, *Lo sviluppo a livello mondiale delle nanotecnologie*, Università degli Studi di Roma La Sapienza 2004-2005
  22. G. De Crozals, R. Bonnet, C. Farre, C. Chaix, *Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: a strategic guide*, *Nano Today* 11 (2016) 435-463
  23. B. Hvolbaek, T. V. W. Janssens, B. S. Clausen, H. Falsig, C. H. Christensen, J. K. Nørskov, *Catalytic activity of Au nanoparticles*, *Nano Today* 2 (2007) 4
  24. L. L. Vatta, R. D. Sanderson, K. R. Koch, *Magnetic nanoparticles: properties and potential applications*, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 1793-1801
  25. K. Grieve, P. Mulvaney, F. Grieser, *Synthesis and electronic properties of semiconductor nanoparticles/quantum dots*, *Colloid and Interface Science* 5 (2000) 168-172
  26. S. M. Janib, A. S. Moses, J. A. Mackay, *Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 62 (2010) 1052-1063
  27. [www.chim.unipr.it](http://www.chim.unipr.it)
  28. G. Adamo, *Sviluppo di nanocarriers per il drug release controllato di biomolecole nella terapia antitumorale*, Università degli Studi di Padova 2011-2013
  29. K. Greish, *Enhanced permeability and retention effect for selective targeting of anticancer nanomedicine: are we there yet?*, *Drug Discovery Today: Technologies* 9 (2012) 161-166
  30. S. R. Grobmyer, B. M. Moudgil, *Cancer Nanotechnology – methods and protocols*, 2010
  31. P. Kocbek, N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, J. Kristl, *Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody*, *J. of Controlled Release* 120 (2007) 18-26
  32. H. Gustafsson, S. Isaksson, A. Altskar, K. Holmberg, *Mesoporous silica nanoparticles with controllable morphology prepared from oil-in-water emulsions*, *J. of Colloid and Interface Science* 467 (2016) 253-260

33. H. Jaganathan, B. Godin, *Biocompatibility assessment of Si-based Nano- and Micro-particles*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 1800-1819
34. X. Huang, L. Li, N. Hao, H. Liu, D. Chen, F. Tang, *The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance and biocompatibility in vivo*, *ACS Nano* 5 (2011) 5390-5399
35. I. Ab Rahman, V. Padavettan, *Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependant properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites – A review*, *J. of Nanomaterials*, 2012
36. S. Wu, C. Mou, H. Lin, *Synthesis of mesoporous silica nanoparticles*, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3862
37. Y. Wang, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, L. Hu, Q. Zhang, T. Jiang, S. Wang, *Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine*, 11 (2015) 313-327
38. M. Prokopowicz, *haracterization of low-dose doxorubicin-loaded silica-based nanocomposites*, *Applied Surface Science* 427 (2018) 55-63
39. M. prokopowicz, J. Zèglin'ski, A. Gandhi, W. Saeicki, S. A. M. Tofail, *Bioactive silica-based drug delivery systems containing doxorubicin hydrochloride: in vitro studies*, *Colloids and Surfaces B* 93 (2012) 249-259
40. A. Kherzerlou, M. Alizadeh-Sani, M. Azizi-Lalabadi, A. Ehsani, *Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens T including bacteria, fungi, parasites and viruses*, *Microbial Pathogenesis* 123 (2018) 505-526
41. B. G. Cousins, H. E. Allison, P. J. Doherty, C. Edwards, M. J. Garvey, D. S. Martin, R. L. Williams, *Effects of nanoparticulate silica substrate in cell attachment of Candida albicans*, *J. of Applied Microbiology* 102 (2007) 757-765
42. X. Chen, S. S. Mao, *Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications and applications*, 107 (2007) 2891-2959
43. R. Zhang, A. A. Elzatahry, S. S: Al-Deyab, D. Zhao, *Mesoporous titania: from synthesis to application*, *Nano Today* 7 (2012) 344-366
44. A. Fujishima, T. N. Rao, D. A. Tryk, *Titanium dioxide photocatalysis*, 1 (2000) 1-21
45. B. Rezaei, H. Mosaddeghi, *Applications of titanium dioxide nanocoating*, *Nano-Technology in Environments Conference – 2006*
46. E. Stefanou, A. Evangelou, P. Falaras, *Effects of UV-irradiated titania nanoparticles on cell proliferation, cancer metastasis and promotion*, *Catalysis Today* 151 (2010) 58-63
47. T. Peng, D. Zhao, K. Dai, W. Shi, K. Hirao, *Synthesis of titanium dioxide nanoparticles*

- with mesoporous anatase wall and high photocatalytic activity*, J. Phys. Chem. 109 (2005) 4947-4952
48. J. Jing, J. Feng, W. Li, W. W. Yu, *Low-temperature synthesis of water-dispersible anatase titanium dioxide nanoparticles for photocatalysis*, J. of Colloid and Interface Science 396 (2013) 90-94
49. [www.ceramtec.it](http://www.ceramtec.it)
50. O. S. A. El-Ghany, A. H. Sherief, *Zirconia based ceramics, some clinical and biological aspects: review*, Future Dental Journal 2 (2016) 55-64
51. P. F. Manicone, P. R. Iommetti, L. Raffaelli, *An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications*, J. of Dentistry 35 (2007) 819-826
52. H. Liu, X. Sun, C. Yin, C. Hu, *Removal of phosphate by mesoporous ZrO<sub>2</sub>*, J. of Hazardous Materials 151 (2008) 616-622
53. G. Sponchia, E. Ambrosi, F. Rizzolio, M. Hadla, A. Del Tedesco, C. Russo Spena, G. Toffoli, P. Riello, A. Benedetti, *Biocompatible tailored zirconia mesoporous nanoparticles with high surface area for theranostic applications*, J. Mater. Chem. B, 2015, 3, 7300
54. M. T. Drake, B. L. Clarke, S. Khosla, *Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice*, Mayo Clin. Proc. 83 (2008) 1032-1045
55. J. H. Lin, *Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties*, Drug Metabolism 18 (1996) 75-85
56. P L. Suarez, M. Garcìa-Cortès, M. T. Feàndez-Arguelles, J. R. Encinar, M. Valledor, F. J. Ferrero, J. C. Campo, J. M. Costa-Fernàndez, *Functionalized phodphorescent nanoparticles in (bio)chemical sensing and imaging – A review*, Analytica Chimica Acta 2018
57. [www.hsr.it](http://www.hsr.it)
58. A. S. Mao, D. J. Mooney, *Regenerative medicine: current therapies and future directions*, PNAS 112 (2015) 14452-14459
59. C. Mason, P. Dunnill, *A brief definition of regenerative medicine*, Regen. Med. 3 (2008) 1-5
60. L. Buckler, *Opportunities in regenerative medicine*, Bioprocess International 2011
61. V. S. Nirmalanandhan, G. S. Sittampalam, *Stem cells in drug discovery, tissue engineering, and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges*, J. of Biomolecular Screening 14 (2009) 755-768
62. A. I. Caplan, *Adult Mesenchymal Stem Cells for tissue engineering versus regenerative*

- medicine, J. of Cellular Physiology* 2007
63. S. Gioventù, *Nuove frontiere per le cellule staminali: metodologia di bancaggio e criopreservazione della polpa dentale*, Università degli Studi di Milano 2012-2013
  64. K. H. Kraus, C. Kirker-Head, *Mesenchymal Stem Cells and bone regeneration*, *Veterinary Surgery* 35 (2006) 232-242
  65. B. Short, N. Brouard, T. Occhiodoro-Scott, A. Ramakrishnan, P. Simmons, *Mesenchymal Stem Cells*, 34 (2003) 565-571
  66. C. Gotherstrom, O. Ringdèn, C. Tammik, E. Zetterberg, M. Westgren, K. Le Blanc, *immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells*, *J. Obstet Gynecol.* 1 (2004) 239-245
  67. P. Batten, N. Rosenthal, M. H. Yacoub, *Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance*, *Biol. Sc.* 362 (2007) 1343-1356
  68. R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S. M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, M. Marcacci, *Repair of large bone defects with use of autologous bone marrow stromal cells*, *Eng. J. Medicina* 5 (2001) 385-386
  69. A. Ulrich, P. Stock and Joseph, *Tissue engineering: current state and prospects*, *Annual review of medicine*, 52 (2001) 443-451
  70. M. Krampera, G. Pizzolo, G. Aprili, M. Franchini, *Mesenchymal Stem Cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair*, 39 (2006) 678-683
  71. B. Leonetti, *Mesoporous zirconia nanoparticles for biomedical applications – Characterization, functionalization and case studies as antibiofouling agents*, Università Ca' Foscari di Venezia 2017
  72. H. Liu, X. Sun, C. Yin, C. Hu, *Removal of phosphate by mesoporous ZrO<sub>2</sub>*, *J. of Hazardous Materials* 151 (2008) 616-622
  73. J. D. Wang, A. Clearfield, G. Peng, *Preparations of layered zirconium phosphonate/phosphate, zirconium phosphonate/phosphite and related compounds*, *Materials Chemistry and Physics*, 35 (1993) 208-216
  74. Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen, X. Wang, *Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template*, *Materials Letters* 60 (2006) 1484-1487
  75. L. Sun, Y. Li, X. Liu, M. Jin, L. Zhang, Z. Du, C. Guo, P. Huang, Z. Sun, *Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles*, *Toxicology in Vitro* 25 (2011) 1619-1629
  76. A. Spina, L. Sorvillo, F. Di Maiolo, A. Esposito, R. D'Auria, D. Di Gesto, E. Chiosi, S.

Naviglio, Inorganic phosphate enhances sensitivity of human osteosarcoma U2OS cells to doxorubicin via p53-dependent pathway, *J. of Cellular Physiology* 228 (2013) 198-206

77. E. Fiorentini, *Modulazione del differenziamento osteogenico di precursori mesenchimali umani per applicazioni di ingegneria tissutale*, Alma 2012