

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

IDROGELI TERMORESPONSIVI PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI ANTIPROLIFERATIVI NELLA PREVENZIONE DELLE ADERENZE POST-OPERATORIE

Relatori:
Chiar.ma Prof.ssa Giuseppina Sandri
Dr. Marco Ruggeri

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Gaia Ferrari
Matricola: 500992

Anno Accademico 2025/2026

Alla mia famiglia

SOMMARIO

I. INTRODUZIONE 1

1. Sindrome Aderenziale 1

1.1 Definizione 1

1.2 Complicanze 2

1.3 Adesiolisi 2

1.4 Eziopatogenesi 3

2. Anatomia e fisiologia del peritoneo 3

3. Fisiopatogenesi e fasi del processo 4

3.1 Evento lesivo e fase infiammatoria 5

3.2 Deposizione di fibrina 6

3.4 Infiltrazione dei fibroblasti e fibrosi 7

3.5 Formazione delle aderenze 8

4. Transizioni cellulari 8

4.1 Transizione dei macrofagi dei fenotipi M1-M2 8

4.2 Transizione mesoteliale-mesenchimale delle cellule mesoteliali 9

5. Dispositivi anti-aderenziali 11

5.1 Membrane solide 12

5.2 Idrogeli 13

6. Polimeri 15

6.1 Polimeri sintetici 15

6.2 Polimeri naturali 16

7. Principi attivi antiproliferativi 21

8. Strategie per la veicolazione di principi attivi scarsamente solubili 25

8.1 Complessi di ciclodestrine 25

8.2 Nanosistemi a base lipidica 28

II. SCOPO DEL LAVORO 33

III. PARTE SPERIMENTALE 35
1. Materiali 35
2. Metodi 36
2.1 Preparazione di idrogeli a base di metilcellulosa e acido ialuronico 36
2.2 DoE - Design of Experiment 36
2.3 Caratterizzazione reologica 37
2.3.1 Test di viscosità 38
2.3.2 Stress sweep test 38
2.3.3 Oscillation test 39
2.3.4 Rampa di temperatura 39
2.3.5 Test di bioadesione – sinergismo reologico 40
2.4 Effetto dei sali (serie di Hofmeister) 40
2.4.1 Effetto dei sali sulla temperatura di gelazione 40
2.4.2 Effetto dei sali sulla viscosità 42
2.5 Tilt test 42
2.6 Test di stabilità reologica 42
2.7 Test di siringabilità 42
2.8 Sprayability test 42
2.9 Preparazione di complessi attivo-ciclodestrine 43
2.9.1 Efficienza di complessazione 44
2.10 Preparazione di SLNs mediante tecnica dell'omogeneizzazione a caldo 45
2.10.1 Efficienza di incapsulamento 46
2.10.2 DLS (Dynamic Light Scattering) ed (ELS) Electrophoretic Light Scattering 47
2.10.3 NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) 49
2.11 Preparazione degli idrogeli caricati con l'attivo 50
2.12 Celle di Franz 51
2.12.1 Studio di rilascio del principio attivo 51

2.12.2 Test di degradazione 52
IV. RISULTATI 53
1. Sviluppo e caratterizzazione degli idrogeli termosensibili 53
1.1 DoE - Design of Experiment 53
1.2 Caratterizzazione reologica 56
1.2.1 Test di viscosità 56
1.2.2 Stress Sweep test 56
1.2.3 Oscillation Test 59
1.2.4 Rampa di temperatura 60
1.2.5 Sinergismo Reologico 62
1.3 Effetto dei sali (serie di Hofmeister) 63
1.3.1 Effetto dei sali sulla temperatura di gelazione 63
1.3.2 Effetto dei sali sulla viscosità 65
1.4 Tilt test 66
1.5 Test di stabilità reologica 68
1.6 Test di siringabilità 69
1.7 Sprayability test 70
2. Sviluppo e caratterizzazione dei sistemi di veicolazione del principio attivo 72
2.1 Efficienza di complessazione e di incapsulamento 72
2.2 Caratterizzazione chimico-fisica delle SLN 72
3. Incorporazione del principio attivo negli idrogeli e caratterizzazione dei sistemi finali 73
3.1 Studio di rilascio del principio attivo mediante celle di Franz 73
3.2 Test di degradazione mediante celle di Franz 74
V. CONCLUSIONI 76
VI. BIBLIOGRAFIA 78

I. INTRODUZIONE

1. Sindrome Aderenziale

1.1 Definizione

Le aderenze rappresentano un'importante sfida clinica della chirurgia addominale e pelvica. Si tratta infatti di complicanze che si verificano nel 50-90% degli interventi chirurgici come, ad esempio, in operazioni chirurgiche addominali a cielo aperto. L'incidenza è minore nel caso di laparoscopie, poiché in chirurgia laparoscopica si effettuano piccole incisioni (da 0,5 a 1 cm) attraverso cui vengono inseriti una microcamera (laparoscopio) e gli strumenti chirurgici dedicati. [1]

La sindrome aderenziale consiste nella formazione di tessuto cicatriziale anomalo tra visceri e visceri (aderenze viscero-viscerali) oppure tra visceri e parete (viscero-parietali). La sindrome aderenziale può localizzarsi in diversi sedi operatorie e può essere distinta in sindrome aderenziale pelvica, addominale, peridurale (a seguito di un intervento al midollo spinale), pericardica (a seguito di chirurgia cardiaca o pericardite), peritendinea (causate da operazioni chirurgiche in seguito a rottura del tendine), capsulite del tunnel carpale, capsulite adesiva della spalla. [2]

Le aderenze post-operatorie possono essere di tre tipologie: aderenze formate nei siti operatori, aderenze formate in siti non operatori e aderenze formate dopo la lisi di aderenze precedenti. [3]

Le aderenze sono un serio problema, non solo a livello clinico e sociale ma anche economico: l'impatto che hanno sui costi di ospedalizzazione e di assistenza sanitaria è notevole. [4] In *Figura 1* è possibile osservare il tessuto connettivale cicatriziale formatosi in seguito ad una operazione chirurgica.

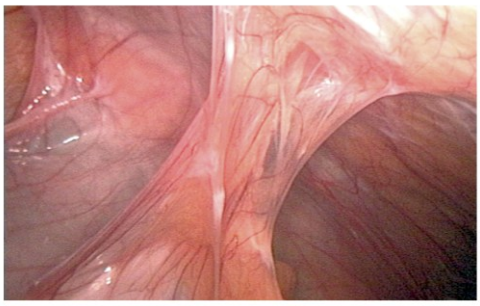


Figura 1: l'immagine riporta le aderenze post-operatorie successive a chirurgia ginecologica (www.delmont-imaging.com).

1.2 Complicanze

Le aderenze peritoneali postoperatorie sono una delle principali cause di morbilità, con conseguenti molteplici complicanze, molte delle quali possono manifestarsi diversi anni dopo l'intervento chirurgico iniziale.

In genere, anche se si formano aderenze dopo un'operazione chirurgica, non è necessario alcun trattamento a meno che queste non causino una complicazione, come un'ostruzione dell'intestino tenue. Quest'ultima può verificarsi anche dopo anni dall'evento chirurgico e causa sintomi come: crampi, distensione addominale e nausea. Un'ostruzione intestinale può essere pericolosa per la vita se non curata e potenzialmente letale. [5]

Questi ispessimenti connettivali che uniscono organi normalmente separati, alterandone la normale fisiologia, possono infatti causare: ostruzione in sede, dolore addominale cronico, infertilità e complicanze durante gli interventi successivi.

La formazione di aderenze nella cavità uterina a seguito di traumi chirurgici prende il nome di sindrome di Ascherman e causa amenorrea, rischio di aborto, dolore pelvico e infertilità. Inoltre, la malattia adesiva può diventare una condizione medica cronica con significativa morbilità e senza terapia efficace.

1.3 Adesiolisi

Attualmente, l'adesiolisi (rimozione chirurgica) è l'unico trattamento disponibile per le complicanze correlate alle aderenze, ma la successiva operazione comporta un elevato rischio di morbilità e aumenta la probabilità di futura formazione di aderenze, rendendo necessari nuovi approcci terapeutici.

In caso in cui sia necessaria la rimozione delle aderenze (adesiolisi), si ricorre a procedure laparoscopiche per ripristinare la normale anatomia e funzionalità degli organi. [6]

Tuttavia, questo secondo intervento chirurgico, può causare ulteriori traumi nella sede dell'intervento e aumentare il rischio di recidive di aderenze più gravi. [7]

L'adesiolisi da sola è insufficiente a causa del suo rischio significativo di enterotomia involontaria e dell'incapacità di prevenire la successiva formazione di aderenze.

Durante l'adesiolisi laparoscopica possono infatti verificarsi diverse complicazioni come il sanguinamento nella cavità addominale e la perforazione intestinale. [8]

1.4 Eziopatogenesi

Le aderenze sono bande fibrose che si formano come risposta naturale a varie cause, tra cui la chirurgia che ne rappresenta la causa più frequente. [9]

Gli interventi chirurgici non sono però la sola causa delle aderenze, esse infatti possono formarsi in risposta insulti come la radioterapia o a causa di patologie come: morbo di Crohn, diverticolite, endometriosi, malattia infiammatoria pelvica, peritonite, neoplasie, endometriosi e dialisi peritoneale a lungo termine. [10]

È stato dimostrato che diversi fattori aumentano il rischio di sviluppo di aderenze post-operatorie.

Tra questi ci sono polimorfismi genetici dell'antagonista del recettore dell'interleuchina-1, inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 e nell'inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina. [11]

Anche trattamenti come la radioterapia, soprattutto se preceduta da interventi chirurgici, può promuovere la formazione di aderenze, danneggiando gli organi e promuovendo processi di cicatrizzazione anomala.

2. Anatomia e fisiologia del peritoneo

Il peritoneo è una membrana sierosa che riveste la cavità addominale. Consiste di due parti: il peritoneo viscerale, che riveste gli organi contenuti nella cavità, e il peritoneo parietale, che riveste la superficie interna della parete corporea.

Il peritoneo parietale e quello viscerale sono connessi attraverso foglietti sierosi chiamati mesenteri.

Il peritoneo è un organo dinamico, capace di adattare la propria struttura e le proprie funzioni a diverse condizioni fisiologiche e patologiche. Esso svolge un ruolo nella regolazione delle risposte infiammatorie, nello scambio del liquido peritoneale e nella prevenzione della fibrosi nella cavità addominale. Una sua alterazione patologica può provocare aderenze fibrotiche e ascite, ovvero accumulo di liquido sieroso nella cavità addominale.

Il peritoneo origina dal mesoderma la sua superficie più interna è formata dal mesotelio, un monostrato di cellule mesoteliali con un diametro cellulare di circa 25 μm.

Le cellule mesoteliali sono lunghe, piatte e sottili, con un elevato rapporto citoplasma/nucleolo e microvilli specializzati sulla superficie apicale.

Il peritoneo parietale è sensibile alla pressione, al dolore, alla temperatura e alle lacerazioni. Il peritoneo viscerale non è suscettibile a queste sensazioni, ma è sensibile allo stiramento e all'irritazione chimica.

L' irrorazione sanguigna del peritoneo parietale proviene dalle arterie della parete addominale e dalle arterie pelviche parietali. L'irrorazione sanguigna del peritoneo viscerale proviene dalle arterie mesenterica, celiaca e pelvica viscerale.

Il sangue venoso del peritoneo viscerale drena nella vena porta , mentre quello del peritoneo parietale drena nelle vene sistemiche, ritornando alla vena cava .

Il rivestimento del peritoneo nella cavità addominale è differente in funzione del sesso dell'individuo. Nelle donne il peritoneo riveste ovaie, utero e tube di Falloppio mentre negli uomini, i testicoli, la prostata e le vescicole seminali che si trovano in posizione extraperitoneale.

Il peritoneo, sia viscerale che parietale, ha una composizione strutturale simile costituita da tre strati distinti: il mesotelio, una lamina basale e lo stroma submesoteliale.

La lamina basale è un sottile foglio di matrice extracellulare (ECM) formata prevalentemente da collagene e proteoglicani. Si trova in contatto diretto con la superficie inferiore del mesotelio.

Lo stroma sub-mesoteliale è invece lo strato di tessuto connettivo sotto alla lamina basale, ed è costituito da matrice extracellulare e cellule, tra cui le staminali.

Le membrane sierose sono suscettibili all'invasione batterica. La risposta infiammatoria del peritoneo è una risposta a più fasi che porta al reclutamento di cellule immunitarie come macrofagi, monociti , e neutrofili. Inoltre, le cellule mesoteliali secernono una serie di mediatori infiammatori in risposta a questi leucociti reclutati.

Il peritoneo danneggiato può creare aderenze fibrotiche. Non solo la transizione fenotipica delle cellule mesoteliali conferisce loro invasività e proliferazione abnorme, ma le cellule mesoteliali sono anche protagoniste della formazione di aderenze attraverso il controllo dei processi di coagulazione e fibrinolisi. [12], [13]

3. Fisiopatogenesi e fasi del processo

La formazione di aderenze è un processo dinamico in cui i tessuti traumatizzati chirurgicamente si legano tra loro attraverso ponti di fibrina e cellule coinvolte nei processi di riparazione tissutale. [14]

Questo intero processo è complesso e può essere suddiviso in *(vedi Figura 2)*:

1. Evento lesivo

2. Fase infiammatoria
3. Deposizione di fibrina
4. Infiltrazione dei fibroblasti e fibrosi
5. Formazione dell'aderenza

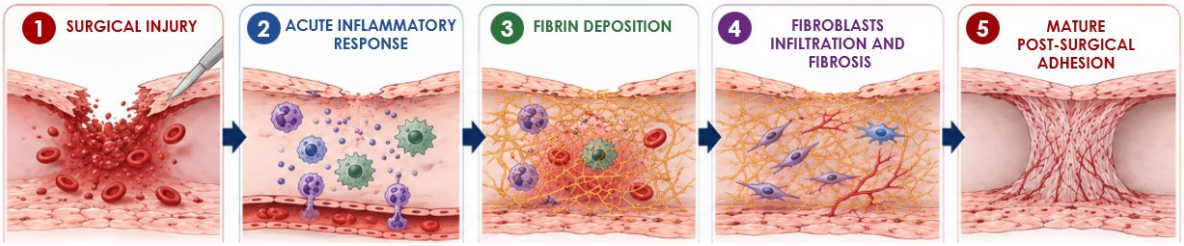


Figura 2: fasi del processo di formazione delle aderenze.

3.1 Evento lesivo e fase infiammatoria

L'operazione chirurgica causa un danneggiamento del rivestimento mesoteliale sulla membrana basale.

Nelle ore immediatamente successive all'evento lesivo, definito il momento zero, inizia la fase infiammatoria caratterizzata da dilatazione dei vasi sanguigni e rilascio dell'essudato sierosanguigno ricco di fibrina.

L'esposizione della membrana basale danneggiata induce il reclutamento di neutrofili e monociti, e il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che promuovono l'infiammazione e l'attivazione della cascata della coagulazione.

Le piastrine, frammenti cellulari responsabili della coagulazione, una volta attivate, rilasciano fibrinogeno e fibrina ma anche mediatori dell'infiammazione come prostaglandine, trombossani, citochine, chemochine responsabili della chemioattrazione leucocitaria. Questi a loro volta richiamano macrofagi, neutrofili e cellule epiteliali nel sito della lesione, rafforzando l'infiammazione e aumentando la permeabilità vascolare.

Mentre i macrofagi reclutano nuove cellule mesoteliali sulla superficie danneggiata, la cascata della coagulazione prosegue attraverso l'immagazzinamento nelle piastrine del loro fattore di crescita (PDGF) responsabile della migrazione e della proliferazione cellulare.

In condizioni fisiologiche, ogni volta che la coagulazione viene innescata, parallelamente, anche il sistema fibrinolitico viene attivato.

Protagonista della fibrinolisi è l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) che converte il plasminogeno in plasmina, proteasi che degrada i coaguli di fibrina.

Il sistema fibrinolitico degrada anche i componenti della matrice extracellulare (ECM) attraverso le metalloproteasi della matrice (MMP). Tuttavia, le citochine infiammatorie

regolano la formazione di inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI), riducendo così l'attività fibrinolitica. Infiammazione e coagulazione sono, dunque, processi paralleli ma strettamente interconnessi. Le citochine infiammatorie regolano la cascata della coagulazione, mentre le proteasi della coagulazione regolano l'infiammazione influenzando la produzione di citochine e fattori di crescita.

Tra le citochine infiammatorie ci sono: TGF-β1 (fattore di crescita trasformante-β), TNF-α (fattore di necrosi tumorale α), interleuchina (IL) di tipo IL-1, IL-6 e IL-12. In particolare, l'IL-6 avvia la cascata della coagulazione attraverso l'attivazione del fattore tissutale mentre TNF-α e IL-1 sono stimolati da fibrina e fibrinogeno. [15]

3.2 Deposizione di fibrina

Dopo una prima fase infiammatoria si ha l'attivazione della cascata della coagulazione.

La trombina interviene perché responsabile del taglio proteolitico che porta alla conversione del fibrinogeno in monomeri di fibrina. Quest'ultima polimerizza in un coagulo insolubile inglobando piastrine, frammenti cellulari responsabili della coagulazione, e cellule circolanti.

Durante la cascata della coagulazione, si ha uno squilibrio tra la deposizione di fibrina e la risposta fibrinolitica. Il sistema fibrinolitico svolge un ruolo vitale nella degradazione della fibrina, e nella degradazione dei componenti della matrice extracellulare (ECM) attraverso le metalloproteasi della matrice (MMP).

Le aderenze si verificano quando la deposizione di fibrina supera la fibrinolisi, ovvero quando lo sviluppo aberrante della fibrina è bilanciato da una risposta fibrinolitica inadeguata.

Tutte le lesioni causano ischemia locale, insulto responsabile di un calo nell'afflusso di sangue e ossigeno.

L'ipossia aumenta l'espressione di inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI), compromettendo la funzionalità fibrinolitica.

Protagonista della fibrinolisi è il plasminogeno, un proenzima inattivo che viene convertito in plasmina (PA) dall'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e dall'attivatore del plasminogeno urochinasi (u-PA).

L'inibizione dell'attivatore del plasminogeno ostacola la conversione del plasminogeno in plasmina, enzima protagonista della fibrinolisi. [16], [17]

Inoltre, le citochine riducono la sintesi dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) da parte delle cellule mesoteliali umane mentre promuovono l'espressione del fattore tissutale

procoagulatorio e dell'antifibrinolitico (PAI-1), spiegando una maggiore tendenza alla deposizione di fibrina. [18]

I fattori di crescita che promuovono l'angiogenesi modulano l'espressione dei componenti e degli inibitori fibrinolitici, dove la via del fattore di crescita trasformante beta (TGF-β) agisce da mediatore

I coaguli di fibrina, formatisi in seguito al calo della risposta fibrinolitica, fungono da impalcatura per l'adesione delle cellule infiammatorie e fibroblasti che, insieme alla formazione di vasi sanguigni, portano alla deposizione di matrice organizzata e alle conseguenti aderenze.

3.4 Infiltrazione dei fibroblasti e fibrosi

In condizioni normali, l'organismo attiva il sistema della fibrinolisi (tramite l'attivatore del plasminogeno) entro 72-120 ore, permettendo al mesotelio di rigenerarsi senza aderenze. Se la fibrina non viene degradata entro i primi 5-7 giorni, la struttura temporanea diventa permanente. La deposizione di monomeri di fibrina permette di creare un'impalcatura polimerica all'interno della quale i fibroblasti possono aderire e produrre componenti della ECM. All'interno di questa matrice fibrinosa, le cellule polimorfonucleate (PMN), i macrofagi e le cellule mesoteliali migrano, proliferano e si differenziano. I mastociti sono responsabili del rilascio del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e partecipano alla fibrosi attraverso la produzione di istamina che stimola la proliferazione dei fibroblasti. [19]

La ECM è organizzata in strutture altamente complesse costituite da diversi tipi di collagene, glicoproteine, glicosaminoglicani e proteoglicani.

Il suo rimodellamento coinvolge l'azione di una serie di enzimi proteolitici come: serina proteasi, metalloproteinasi (MMP) e cisteina proteasi. [20]

Le membrane sierose delle cavità peritoneale sono rivestite da un monostrato epiteliale chiamato mesotelio che, in condizioni fisiologiche, secerne lubrificanti come glicosamminoglicani che impediscono la formazione di aderenze. In seguito a un insulto, le cellule mesoteliali assumono un fenotipo profibrotico.

Lo stress ossidativo inibisce la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo antinfiammatorio, causando ulteriormente lo squilibrio del sistema fibrinolitico e la deposizione di collagene. [21]

A tal proposito, il fattore di crescita trasformante beta (TGF-β) è considerata una molecola chiave della fibrosi tissutale. Nelle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), nelle cellule

endoteliali e nei fibroblasti, aumenta la sintesi di proteine dell'ECM, come fibronectina, collagene e PAI-1, anche a basse concentrazioni.

Anche l'angiotensina II (AngII) riveste un ruolo importante, poiché è in grado di attivare vie di segnalazione implicate nella fibrosi e gli stessi segnali cellulari di TGF- β indipendentemente da quest'ultimo. [22] , [23]

I fibroblasti nelle aderenze sovraesprimono collagene di tipo I e III, metalloproteinasi della matrice-1 (MMP-1), inibitore tissutale della metalloproteinasi-1 (TIMP-1), fibronectina, fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), cicloossigenasi-2 (COX-2) e fattore di crescita trasformante (TGF-β). [17]

3.5 Formazione delle aderenze

L'adesione dei fibroblasti promuove la deposizione di collagene nel tessuto connettivo, trasformando la fibrina in tessuto cicatriziale fibroso.

Essi presentano recettori per l'istamina, prodotta in grandi quantità dai mastociti in caso di infiammazione.

Quando l'istamina si lega a tali recettori, si promuove l'accumulo di collagene, la proliferazione dei fibroblasti e la loro attivazione in miofibroblasti che secernono una quantità extra di matrice del tessuto connettivo e collagene, instaurando il processo fibrotico. [24]

Inoltre, i fibroblasti si trasformano in un fenotipo di adesione in condizioni di ipossia, aumentando la produzione di fattore inducibile dall'ipossia-1- alfa (HIF-1α) e fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) necessari per riossigenare il tessuto ipossico. [9]

Promotori della neovascolarizzazione sono: fattore di crescita trasformante beta (TGF-β), fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) che stimola una maggiore espressione di fibronectina, collagene 1 e laminina della matrice extracellulare. [25]

Le aderenze mature rappresentano il punto finale dell'adesiogenesi patologica a seguito di una lesione. Entro 7-10 giorni dall'intervento, le aderenze progrediscono da bande fibrose morbide e traslucide a strutture opache, vascolarizzate e ricche di collagene. [5]

4. Transizioni cellulari

4.1 Transizione dei macrofagi dei fenotipi M1-M2

I globuli bianchi o leucociti sono cellule del sistema immunitario, di cui esistono monociti e granulociti. Dai primi derivano i macrofagi, mentre i secondi, chiamati anche cellule polimorfonucleate (PMN), sono a loro volta distinti in: neutrofili, eosinofili e basofili. I

neutrofili e i macrofagi hanno attività fagocitaria grazie alla presenza al loro interno di lisosomi e alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).
Gli eosinofili intervengono nelle reazioni allergiche e in risposta a infezioni parassitarie mentre i basofili secernono eparina ed istamina. I leucociti sono attratti dalle sostanze chimiche rilasciate dalle cellule danneggiate muovendosi verso la sede dell'infiammazione. Si parla di marginazione ovvero reclutamento leucocitario verso l'endotelio danneggiato. La specializzazione dei macrofagi in particolari microambienti spiega la loro eterogeneità. Nella sede dell'infiammazione si verifica una drastica perdita di macrofagi residenti, dovuta all'adesione tissutale, all'emigrazione o alla morte, è un fenomeno definito "reazione di scomparsa dei macrofagi". Questo induce il reclutamento di monociti ematici, loro precursori, e l'incremento della proliferazione dei macrofagi residenti rimasti.
I macrofagi secernono fattore di crescita trasformante beta (TGF-β) responsabile della proliferazione e dell'attivazione dei fibroblasti, assieme al fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) immagazzinato nelle piastrine.
I macrofagi esistono in due fenotipi: M1 e M2.
Il fenotipo M1 è pro-infiammatorio e promuove la secrezione del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α) ed interleuchine come IL-6 e IL-1. in presenza di interleuchine come IL-4 e IL-13 diventa fenotipo M2.
Il fenotipo M2 è antinfiammatorio e promuove la secrezione di IL-10, la riparazione dei tessuti e la guarigione delle ferite.
In vivo, i macrofagi possono adottare una varietà di fenotipi funzionali a seconda di cambiamenti sottili e continui nel microambiente tissutale. Pertanto, la polarizzazione M1/M2 delle funzioni dei macrofagi può essere considerata come un quadro concettuale semplificato perché il fenotipo dei macrofagi può considerarsi plastico, una continuità di stati polarizzati riprogrammabili reversibilmente. [26]

4.2 Transizione mesoteliale-mesenchimale delle cellule mesoteliali

Le cellule mesoteliali formano il mesotelio, un sottile strato di tessuto che riveste gli organi interni e le membrane sierose come pleura, peritoneo e pericardio. Embriologicamente derivano dal mesoderma, foglietto embrionale mediano tra ectoderma ed endoderma ed esprimono caratteristiche mesenchimali come mobilità e proliferazione. [27]
Il mesoderma è infatti originatore di tessuto connettivo, muscolare, ossa e apparato circolatorio, mentre l'ectoderma origina il tessuto nervoso e l'epidermide e l'endoderma forma apparato digerente e respiratorio.

Le cellule mesoteliali presentano una tipica polarità apico-basale e giunzioni cellula-cellula.

La polarità apico-basale è la proprietà strutturale e funzionale che definisce l'orientamento asimmetrico di queste cellule, caratterizzate da due domini con caratteristiche morfologiche differenti, appunto perché rivestono cavità sierose.

Una volta attivate, le cellule mesoteliali secernono mediatori dell'infiammazione e richiamano cellule infiammatorie e immunitarie nel sito della lesione. Inoltre, sono importanti regolatori dei livelli di fibrina nelle cavità sierose in seguito a lesioni.

Le cellule mesoteliali mediano l'infiammazione anche attraverso la sintesi locale di acido ialuronico che è in grado di sequestrare i radicali liberi e avviare risposte di riparazione dei tessuti. La sintesi dei frammenti di acido ialuronico è aumentata dall'esposizione a interleuchine IL-1 e IL - 6, al fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α), al fattore di crescita trasformante beta (TGF-β) e al fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF).

Le cellule mesoteliali sintetizzano molecole della ECM, tra cui collagene elastina e fibronectina.

Dopo la transizione mesoteliale-mesenchimale (MMT), le cellule mesoteliali perdono le giunzioni cellulari e la polarità apico-basale. Acquisiscono così un fenotipo simile ai fibroblasti con una maggiore capacità di migrazione e invasione.

L'acquisizione di caratteristiche mesenchimali è la conseguenza di una profonda riprogrammazione genetica che conferisce alle cellule la capacità di produrre collagene e fibronectina.

Il fenotipo di adesione è caratterizzato da un aumento dell'espressione di fibronectina, collagene di tipo I e III rispetto a quella dei fibroblasti normali, principalmente promosso dal fattore di crescita trasformante beta (TGF-β).

I fibroblasti sono le cellule principali del tessuto connettivo. Queste cellule sono responsabili della produzione e del mantenimento di tutte le fibre del tessuto connettivo. Producono: acido ialuronico, matrice extracellulare, collagene ed elastina. Sono quindi responsabili della formazione fisica delle aderenze.

I mediatori della risposta infiammatoria, come il fattore di crescita trasformante beta (TGF-β), promuovono il distacco delle cellule mesoteliali e la perdita del loro fenotipo epiteliale.

Le citochine come le interleuchine IL-1 e IL-13 agiscono sui fibroblasti stimolando la sintesi di collagene. [28], [29]

Il tessuto cicatriziale nella sindrome aderenziale si forma quando i fibroblasti si attivano trasformandosi in miofibroblasti che poi vanno in apoptosi.

La transizione mesoteliale-mesenchimale avviene anche in condizioni neoplastiche, la distruzione della polarità promuove il distacco cellulare e la progressione metastatica. [30]

5. Dispositivi anti-aderenziali

Poiché la formazione di aderenze post-operatorie ha origine durante l'operazione chirurgica, per prevenire la loro formazione per prima cosa è necessario manipolare delicatamente i tessuti, eseguire una accurata emostasi, effettuare l'irrigazione periodica del campo operatorio, attuare una buona profilassi delle infezioni, prevenire l'esposizione a corpi estranei.

Eseguire una precisa e delicata operazione chirurgica non è però sufficiente; sono disponibili dispositivi per la prevenzione delle aderenze, come barriere fisiche o idrogeli termo-responsivi. Questi sistemi devono essere inerti, riassorbibili, devono avere un tempo di permanenza adeguato e non devono contrastare il processo di riparazione fisiologico post-operatorio. I dispositivi presenti ora in commercio, a base di acido ialuronico, collagene, destrano, cellulosa, riducono le aderenze post- operatorie senza però annullare la probabilità che si formino.

I presidi possono essere sito specifici o non sito specifici, idrogeli o barriere fisiche.

I dispositivi barriera sono stati testati o commercializzati in varie forme, tra cui soluzioni polimeriche, membrane solide, preformati o idrogel reticolabili in situ.

Alcune delle principali limitazioni dei dispositivi esistenti includono un breve tempo di permanenza nel sito di somministrazione, difficoltà nella manipolazione o nel fissaggio ai tessuti e incompatibilità con le procedure laparoscopiche. Un altro svantaggio spesso correlato alle membrane o alle forme di idrogel preformato è la relativa difficoltà nel determinare a priori le dimensioni e la forma dell'area da coprire. [31]

Inoltre, ancorare saldamente queste barriere fisiche al sito chirurgico richiede sutura, il che aumenta il rischio di lesioni secondarie.

Per risolvere questo problema sono stati realizzate delle barriere antiadesive definite "Janus", ad indicare le distinte proprietà fisico-chimiche esibite dai lati opposti o dalle regioni eterogenee del materiale, conseguenza dell'utilizzo di una miscela di polimeri che presentano proprietà tecnologiche differenti.

Di strategie Janus esistono anche idrogeli, disponibili anche in cerotti, con struttura multistrato e miscele polimeriche, la cui interazione sinergica conferisce ottime proprietà antiadesive e adesive asimmetriche.

Questi idrogeli possono veicolare nanoparticelle in un'architettura che consente il rilascio simultaneo o controllato di più agenti terapeutici. [7], [32], [33]

5.1 Membrane solide

La formazione delle aderenze si può impedire tramite barriere solide che separano due o più superfici tissutali. Questi materiali bloccano il contatto diretto tra due superfici sierose danneggiate adiacenti per i primi 5-7 giorni del processo di guarigione.

Una barriera adesiva peritoneale ideale dovrebbe essere biocompatibile, non immunogenica, biodegradabile, sicura e stabile. Inoltre, dovrebbe essere fissata nel punto di applicazione senza punti metallici o suture.

Esistono film a base di polimeri naturali, come acido ialuronico o cellulosa, e di polimeri sintetici, come acido polilattico o politetrafluoroetilene. Oltre alla separazione meccanica, le membrane solide possono veicolare agenti terapeutici antiproliferativi.

Sono stati sviluppati diversi tipi di agenti barriera, inclusi materiali assorbibili e non assorbibili.

Tra gli agenti assorbibili ci sono: cellulosa rigenerata ossidata, carbossilmetilcellulosa o acido ialuronico, mentre tra i materiali non assorbibili ci sono: politetrafluoroetilene espanso e poliglicole.

Questi richiedono suture di fissaggio e una seconda operazione chirurgica per la loro rimozione dal sito.

Le membrane antiaderenziali trovano il loro impiego soprattutto dopo interventi chirurgici quali resezioni intestinali, isterectomie e cesarei, oltre a interventi chirurgici nelle regioni toracica e pelvica.

L'efficacia di una barriera si basa in gran parte sulla sua capacità di aderire bene alle superfici, indipendentemente dall'area anatomica interessata, e di rimanere stabile per tutta la durata del processo di guarigione, senza influire negativamente sul recupero postoperatorio. [34], [35], [36]

Esempi di membrane solide utilizzate come dispositivi anti-aderenziali:

- *barriere riassorbibili e adesive*

  Si tratta di barriere capaci di riassorbirsi dopo una settimana, il periodo critico necessario per la guarigione dei tessuti.

  Tra queste ci sono barriere in carbossimetilcellulosa e sodio ialuronato come Seprafilm® o in cellulosa ossidata rigenerata come Interceed®.

Si tratta di idrogeli preformati formanti una barriera che non necessita di fissaggio al tessuto mediante sutura. Immediatamente dopo il loro posizionamento sulla zona della ferita, il materiale costituente diventa una sostanza morbida e gelatinosa che ricopre completamente il sito danneggiato. [37], [38]

Vengono tipicamente usate in caso procedure chirurgiche a cielo aperto, sono difficilmente utilizzate in laparoscopia o in chirurgia mininvasiva perché necessitano di ampie incisioni per essere localizzati.

Esistono anche barriere adesive costituite da polimeri sintetici.

Ne è un esempio il cerotto SupraSeal®, costituito da polimeri biocompatibili di D- e L-lattide, carbonato di trimetilene e ε-caprolattone. Anche Prevadh® è una membrana riassorbibile e adesiva a base di collagene suino, polietilenglicole (PEG) e glicerolo.

- *barriere non riassorbibili e non adesive*

  Ne sono un esempio barriere in politetrafluoroetilene come Preclude®, in polietilenglicole e polibutilene tereftalato come Polyactive® e in politetrafluoroetilene espanso come Gore-tex®.

  Queste barriere agiscono come uno scudo meccanico, impedendo la formazione di adesione durante la finestra di riepitelizzazione di 5–7 giorni. Poiché il materiale non è adesivo, di solito richiede una sutura in posizione. [39], [40]

- *barriere riassorbibili ma non adesive*

  Ne sono un esempio barriere in acido polilattico come Surgiwrap® o in polietilenglicole (EO) e acido polilattico (LA) come Repel-CV®. [7]

  Sono realizzate con un materiale biodegradabile, trasparente ma non adesivo che, dunque, richiede sutura. [41]

5.2 Idrogeli

Un idrogelo è un colloide formato da catene polimeriche disperse in acqua. Si definisce colloide una miscela in cui la sostanza non è completamente solubilizzata nel solvente ma dispersa finemente in esso. La capacità degli idrogel di assorbire acqua deriva dai gruppi funzionali idrofili legati alla catena polimerica, mentre la loro resistenza alla dissoluzione è dovuta ai legami incrociati tra le catene della rete.

L'idrogelo, come rete polimerica idrofila reticolata tridimensionalmente, è capace di gonfiarsi e sgonfiarsi reversibilmente in acqua. Le transizioni di volume possono avvenire anche in risposta a stimoli come: pH, temperatura, luce, campo elettrico, campo magnetico, suono, interazione molecolare con specie radicaliche o altri reagenti di natura chimica.

Gli idrogeli sintetici presentano una lunga durata, un'elevata capacità di assorbimento dell'acqua e un'elevata resistenza. Inoltre, possono essere modificati per ottenere degradabilità e funzionalità desiderate.

Gli idrogeli omopolimerici sono costituiti da una singola specie di monomero, gli idrogeli copolimerici sono costituiti da due o più specie monomeriche mentre gli idrogeli interpenetranti multipolimerici (IPN) sono costituiti da più componenti polimerici indipendenti che formano reticolazioni non-dipendenti.

Gli idrogel si formano mediante la reticolazione di catene polimeriche disperse in un mezzo acquoso attraverso reticolazione fisica o chimica.

La capacità di un idrogelo di ripristinare le proprietà meccaniche iniziali dopo un insulto fisico è possibile grazie al ripristino delle interazioni molecolari di tipo: elettrostatico, legami a idrogeno, interazioni idrofobiche e interazioni ospite-ospitante incapsulate.

I gel termoresponsivi subiscono una transizione di fase in risposta a uno stimolo termico esterno di tipo positivo o negativo. Nel primo caso il rigonfiamento aumenta con l'aumentare della temperatura, mentre nel secondo, il rigonfiamento aumenta al diminuire della temperatura.

Idrogeli costituiti da polimeri come cellulosa e suoi derivati presentano intrinseche proprietà di termogelificazione mentre polimeri idrogeli di acido ialuronico diventano termoresponsivi quando combinati a copolimeri come poloxamero o altri. [42], [43], [44]

Esempi di idrogeli utilizzati come dispositivi antiaderenziali:

- *gel di ialuronato ferrico 0,5%* (Intergel®) [45], [46]: questo dispositivo è stato approvato per la commercializzazione nel novembre 2001, tuttavia, nel 2003 è stata sospesa la sua distribuzione a causa di segnalazioni relative a gravi complicanze post-operatorie.
- *gel a base di acido ialuronico cross-linkato concentrato al 100%* (Hyalobarrier Gel Endo®) [47]: si tratta di una barriera anti-aderenziale biocompatibile e biodegradabile. Il gel aderisce alla superficie dei tessuti e si degrada spontaneamente dopo 7 giorni dalla sua applicazione.
- *gel di icodestrina 4% p/V* (Adept®) *e gel di destrano 70* (Hyskon®) [48], [49]: l'icodestrina e il destrano sono polimeri di glucosio con attività osmotica. Introducono osmoticamente liquido nella cavità peritoneale separando meccanicamente gli organi per idroflotazione. L'utilizzo di questi dispositivi è consigliato in laparoscopia ma non in laparotomia. Destrano e derivati permettono di mantenere un serbatoio di liquido

nella cavità peritoneale per 3-4 giorni, permettendo la guarigione mesoteliale riducendo il contatto con i tessuti.

- *gel a base di PEG* (Coseal®; Spraygel®; Sprayshield®) [50], [51]: esistono idrogeli sintetici a base di polietilenglicole, sono usati come sigillante chirurgico attorno alle zone di sutura o come dispositivo spray per prevenire le aderenze.
- *gel a base di fibrina* (Tissucol®) [52]: composta da due siringhe (una con fibrinogeno/fattore XIII umano e l'altra con trombina e calcio), una volta miscelate replicano la fase finale della coagulazione, è utilizzato in emostasi ma anche per contrastare le aderenze post-operatorie.
- *gel a base di poloxamer* (Mediclore®) [53], [54]: si tratta di un gel termo-reversibile con eccellente proprietà anti-aderenziale e muco-adesiva una volta raggiunta la temperatura corporea.

6. Polimeri

Molti dispositivi anti-aderenziali sono costituiti da polimeri sintetici o naturali. Entrambi trovano impiego nelle applicazioni biomediche. [31]

6.1 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici utilizzati come componenti di dispositivi anti-aderenziali devono essere biocompatibili, biodegradabili e atossici. Inoltre, si biodegradano più lentamente dei polimeri naturali ma anche loro vengono idrolizzati nel corpo o decomposti per via enzimatica. [51]

Ad esempio, l'applicazione di barriere in film di acido polilattico (PLA), è oggetto di studio per la prevenzione delle aderenze addominali. In questo caso la componente adesiva è costituita da poli (acido lattico -*co*- etilene fosfato) (poli (LA- *co* -EEP)). [7], [55]

Anche l'acido poliacrilico (PAA), alcol polivinilico (PVA) e il poli-ε-caprolattone (PCL), permettono di realizzazione di film antiadesivi con proprietà anti-aderenziale.

[32], [56], [57], [58], [59]

I polossameri sono co-polimeri triblocco è costituito da una componente idrofila, il polietilenossido (PEO), e una componente idrofobica, il polipropilenossido (PPO), che si alternano secondo il seguente schema: PEO-PPO-PEO. Uno dei principali vantaggi di questo polimero triblocco è il suo comportamento termoreversibile.

Anche i polossameri sono studiati per la prevenzione delle aderenze postoperatorie. [60], [53]

Il politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) è un polimero non degradabile e bioinerte caratterizzato da una struttura microporosa flessibile. Per le sue proprietà, è utilizzato per la realizzazione di barriere antiaderenziali. [39], [40], [61]

Membrane in ePTFE possono essere abbinabili ad idrogeli idrofili e bioadesivi per la realizzazione di un'interfaccia adesiva. [62], [63], [64]

Infine, l'acido poliglicolico (PGA) è un poliestere termoplastico biodegradabile.

Assieme all' acido lattico forma il co-polimero poli (acido lattico-coglicolico) (PLGA), anch'esso utilizzato per contrastare le aderenze post-operatorie. [51], [63], [65]

6.2 Polimeri naturali

Il chitosano è un poliamminosaccaride naturale lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami β (1-4). Questo poliamminosaccaride presenta proprietà biologiche come biocompatibilità, biodegradabilità, atossicità e scarso potenziale allergenico. Il chitosano permette il rilascio controllato di farmaci, la mucoadesione e la gelificazione in situ. Inoltre, ha proprietà emostatiche, antimicrobiche, antiossidanti, antinfiammatorie e cicatrizzanti. [51], [66], [67]

È stato sviluppato un idrogel a base di chitosano, ottenuto tramite reticolazione in situ di legami chimici reversibili dinamici, in particolare legami idrazonici , che conferiscono al gel proprietà di auto-riparazione. [68], [69]

La gelatina è una miscela di peptidi e proteine, è un biomateriale che può essere ottenuto dagli strati della matrice extracellulare (ECM) degli animali mediante denaturazione termica o degradazione fisica e chimica del collagene. Si tratta di un materiale biocompatibile completamente riassorbibile in vivo. Miscele di chitosano e gelatina oppure l'utilizzo di gelatina reticolata, sono oggetti di studio per la prevenzione delle aderenze addominali postoperatorie attraverso la realizzazione di barriere antiadesive. [67], [70]

L'alginato è un copolimero a blocchi polisaccaridico costituito da acido α-L-guluronico e acido β-D-mannuronico. Sono state sviluppate barriere antiadesive efficaci in alginato/PEO (polietilenglicole) o PCL (policaprolattone) caricando materiali con farmaci con effetti antiadesivi per prevenire le aderenze peritoneali post-operatorie. [71], [72]

La cellulosa è un polimero costituito da unità monomeriche di glucosio D-glucopironosidico legate da legami glicosidici del tipo β (1→4).

L'unità basica della cellulosa è costituita da due molecole di glucosio unite con il legame β (1→4) glicosidico. [73]

Tra i derivati della cellulosa che trovano impiego nella prevenzione delle aderenze post-operatorie ci sono CMC (carbossimetilcellulosa) e HPMC (idrossi-propilcellulosa) grazie alla loro capacità di mantenere l'integrità strutturale dell'idrogelo e promuovere un rilascio controllato dell'attivo. [74], [75], [76]. Questi derivati sono molto studiati per la prevenzione delle aderenze. [74]

La metilcellulosa (MC) presenta proprietà come la solubilità in acqua e la gelificazione per riscaldamento. Si tratta, infatti, di una particolare gelificazione, definita termogelificazione inversa poiché favorita dal riscaldamento della soluzione anziché da un abbassamento della temperatura, come succede nella maggior parte dei casi (es: gelatina). Questo particolare comportamento è causato dalla presenza di zone idrofobiche e idrofiliche nei monomeri glucosidici della catena polimerica.

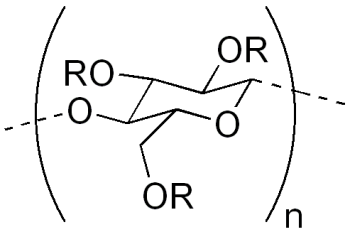
A temperatura inferiore alla gelificazione, l'acqua solvata il polimero tramite la formazione di legami a idrogeno tra quest'ultima e gli -OH del polimero. Di conseguenza, vengono a meno le interazioni intermolecolari tra le zone idrofobiche del polimero stesso.

Questa situazione è descritta come una "gabbia d'acqua" ovvero un'"impalcatura ghiacciata" attorno alla catena polimerica. Raggiunta la temperatura di gelificazione, la perdita di acqua di idratazione a causa della cinetica molecolare, espone i segmenti alchilici idrofobici dei derivati della cellulosa che sono liberi di interagire tra loro, portando alla formazione di un reticolo solido – gel. [78]

La gelificazione avviene contemporaneamente alla formazione di fibrille per riscaldamento, fibrille di catene polimeriche di MC. [79]

L'utilizzo di MC (metilcellulosa) da sola o in combinazione con HA (acido ialuronico) è un buon candidato per lo sviluppo di idrogeli idrosolubili e termoresponsivi anti-aderenziali. [80]

In letteratura sono riportati numerosi esempi di idrogeli a base di metilcellulosa sia a basso peso che alto peso molecolare, con grado di sostituzione (DS) di 1,5-1,9. [80], [81], [82]



R = H or CH_3

Figura 3: l'immagine riporta la struttura chimica della metilcellulosa (wikipedia.it).

Il destrano è un polimero ramificato, sintetizzato da batteri lattici e costituito da molecole di D-glucosio legate tra loro mediante un legame glicosidico alfa 1-6 con brevi ramificazioni nelle posizioni alfa 1-2, 1-3 e 1-4.

In clinica, il destrano ad alto peso molecolare (tra 40 e 70 kDa) è utilizzato come estensore, anticoagulante, antitrombotico, agente osmotico e lubrificante per plasma endovenoso. [83]

Destrano e derivati sono oggetti di studio per la formazione di matrici reticolabili in situ per la prevenzione delle aderenze, ne sono un esempio idrogeli iniettabili a base di carbossimetildestrano e carbossimetilcellulosa. [84]

I glicosamminoglicani sono un gruppo eterogeneo di polimeri costituiti da unità disaccaride di acido uronico, come acido D- glucuronico (GlcUA) o acido L-iduronico (IduA), e un'esosamina come N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalattosamina (GalNAc) o N-solfatoglucosamina. Alcuni glicosaminoglicani contengono nella molecola anche gruppi solforici. Questi, in aggiunta ai gruppi carbossilici, conferiscono alle molecole la proprietà di polianioni. Quando i glicosamminoglicani solforati si legano ad un asse proteico extracellulare, si hanno i proteoglicani, riserva di fattori di crescita secreti nella matrice extracellulare (ECM). [73], [29]

Tra i glicosamminoglicani ci sono: acido ialuronico, condroitin solfato, dermatan solfato, eparina ed eparan solfato.

L'acido ialuronico ha proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, antinfiammatorie, anti-angiogeniche e analgesiche. [77], [85], [86]

L'acido ialuronico è costituito da acido β-1,4 - D- glucuronico e da β-1,3- N-acetil-D-glucosamina. È l'unico GAG che non si lega alle proteine e non presenta gruppi solfato, è anche un importante componente della ECM che lega l'acqua e forma una matrice viscosa. Non viene prodotto dall'apparato di Golgi come gli altri glicosamminoglicani ma viene prodotto da un complesso enzimatico inglobato nella membrana plasmatica.

Esso viene estruso dalla membrana cellulare quando è ancora in atto la sua sintesi per mezzo della ialuronato sintasi. Nel corpo umano l'acido ialuronico, come ialuronato di sodio, si trova nel liquido sinoviale, nella pelle, nell'umor vitro, nella cartilagine, nel cordone ombelicale e viene prodotto in grande quantità durante il processo di guarigione delle ferite. L'acido ialuronico commerciale si trova sottoforma di ialuronato di sodio perché la sua forma salina è più solubile. Oggi viene principalmente prodotto via fermentazione streptococcica, attraverso la fermentazione batterica dello *Streptococcus*

zooepidemicus. Tuttavia, la presenza di endotossine batteriche nell'HA derivante dalla fermentazione streptococcica può essere un limite all'applicazione dell'HA in campo biomedico. Pertanto, la produzione di HA ricombinante è emersa come un'alternativa interessante. Sono stati utilizzati come ospiti sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi, tra cui *Bacillus* sp., *Lactococcos lactis*, *Agrobacterium* sp. ed *Escherichia coli.* [87]

Come sale è molto apprezzato nell'industria farmaceutica, alimentare e cosmetica grazie alle sue proprietà reologiche, proprietà di non-immunogenicità, biocompatibilità, biodegradabilità, muco adesività, viscoelasticità, solubilità in acqua, neutralità di pH. È noto, inoltre, che l'HA promuove la guarigione delle ferite riducendo l'infiammazione e minimizzando l'adesione dei tessuti e la formazione di cicatrici. Inoltre, ha un effetto antiossidante e antinfiammatorio, agendo sulla sintesi della prostaglandina E2 e anti-angiogenico, regolando la proliferazione dei fibroblasti. Ha potere lubrificante, inibisce la migrazione leucocitaria, comunica con citochine infiammatorie, ha effetto analgesico attraverso l'inibizione della bradichinina che sensibilizza i nocicettori quando sottoposti ad uno stimolo algogeno. [93], [95], [96]

L'acido ialuronico ha meccanismo d'azione passivo strutturante poiché può alterare le proprietà fisiche della matrice extracellulare, tra cui, ad esempio, la viscosità e l'organizzazione delle fibrille di collagene. Grazie alle sue dimensioni macromolecolari, alla marcata igroscopicità e viscoelasticità, è in grado di modulare l'idratazione tissutale e l'equilibrio osmotico. In soluzione acquosa, si ha aggregazione delle catene polimeriche con formazione di una rete grazie alle interazioni idrofobiche e ai legami H intermolecolari. Le soluzioni di HA sono caratterizzate da un comportamento non newtoniano, pseudoplastico e viscoelastico. All'aumento della velocità di taglio le catene di HA si deformano e si allineano nelle linee di flusso, e ciò si traduce in una diminuzione della viscosità, dunque, la rottura della rete polimerica è transitoria e reversibile. [88], [89]

L'acido ialuronico ad alto peso molecolare (>350 kDa) ha importanti proprietà reologiche che conferiscono elevata viscosità, stabilità meccanica e strutturale.

L'acido ialuronico a basso peso molecolare è in grado di permeare la pelle, proteggere il tessuto dai danni delle specie reattive dell'ossigeno, stimolare la guarigione delle ferite e offrire un'idratazione profonda.

Entrambe le tipologie sono utilizzate per la realizzazione di dispositivi anti-aderenziali. [85], [80], [90]

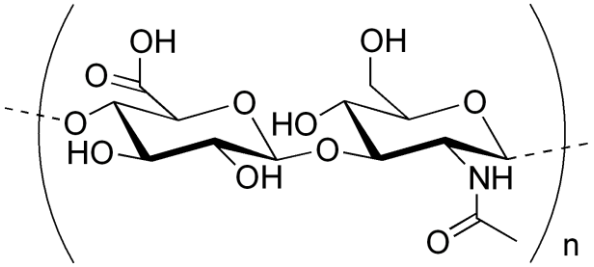


Figura 4: l'immagine riporta la struttura chimica dell'acido ialuronico (wikipedia.it).

Il dermatan solfato è un glicosamminoglicano che conferisce elasticità alla pelle, si trova nelle valvole cardiache e nei vasi sanguigni. È costituito da N-acetil-D-galattosamina-4-solfato (GalNAc-4-solfato) e acido L-iduronico (uno stereoisomero dell'acido glucuronico) unite tramite legame α-1,3. Il dermatan solfato ha proprietà antitrombotiche perché inibisce la trombina tramite il cofattore II eparinico (HCII) e inibisce l'adesione dei fibroblasti ostacolando la formazione delle aderenze. [91], [92]

Il condroitin solfato è formato da acido D-glucoronico e N-acetil-D-galattosamina-4 o 6-solfato legati da legami β(1→3) o β(1→4). Il solfato di condroitina è un importante componente strutturale della cartilagine, dei tendini e dell'aorta, conferendo resistenza alla compressione. Il condroitin solfato ha importanti proprietà: mantiene l'elasticità della cartilagine, modula i mediatori dell'infiammazione come le citochine pro-infiammatorie (IL-1β e TNF-α), ha proprietà condroprotettiva, rallenta la degradazione della cartilagine anche inibendo gli enzimi che la danneggiano, come metalloproteasi, elastasi e ialuronidasi. Questi enzimi, in condizioni di infiammazione, tendono ad attaccare e distruggere la rete di acido ialuronico e collagene che forma la cartilagine. L'eparina è un glicosaminoglicano altamente solfatato, ampiamente utilizzato come farmaco iniettabile anticoagulante. Ha la più alta densità di carica negativa che si conosca. Il suo meccanismo d'azione consiste nel legame con l'antitrombina III, un enzima inibitore della coagulazione che, a seguito del legame con l'eparina, cambia conformazione esponendo il suo sito attivo e diventando accessibile ai suoi substrati: trombina e fattore Xa. L'eparina è costituita da una parte dell'eparan solfato, derivato principalmente dai mastociti. [93]

Hanno entrambi attività antitrombotiche ma anche vasoprotettrici, antinfiammatorie e promuovono la rigenerazione tissutale. [94]

7. Principi attivi antiproliferativi

Antinfiammatori steroidei

La terapia con corticosteroidi riduce la permeabilità vascolare e il rilascio di citochine. Il loro meccanismo d'azione consiste nell'attivazione dei recettori nucleari e modulazione dell'espressione genica. L'attività antinfiammatoria dei corticosteroidi si manifesta attraverso l'inibizione della sintesi di prostaglandine e trombossani poiché si inibisce la produzione del loro precursore, l'acido arachidonico. I corticosteroidi modificano la risposta infiammatoria riducendo la permeabilità vascolare e diminuendo la secrezione di citochine e fattori chemiotattici, responsabili del richiamo cellulare e della proliferazione. Anche ormoni come il progesterone, sono antinfiammatori e possono prevenire la formazione di aderenze. Tuttavia, i corticosteroidi hanno effetti collaterali, come soppressione dell'asse ipofisi-surrene, immunosoppressione e possono ritardare la rigenerazione della ferita.

Modulatori ormonali

Tra i modulatori ormonali ci sono agonisti ormonali come l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) e inibitori ormonali come inibitori dell'aromatasi (anastrozolo) e modulatori selettivi del recettore degli estrogeni (tamoxifene). Queste molecole influenzano l'attività di PA (attivatore del plasminogeno) e MMP (metalloproteinasi della matrice) e dei loro inibitori, alterando così la fibrinolisi e riducendo la formazione di aderenze. È stato dimostrato, dunque, che uno stato ipoestrogenico contrasta la formazione delle aderenze post-operatorie. [20]

La scelta di una manipolazione ormonale come strumento per contrastare le aderenze è confermata dalla presenza di recettori degli estrogeni nel tessuto aderenziale. [95], [96], [97], [98], [99]

Antinfiammatori non steroidei (FANS)

I FANS sono antinfiammatori non steroidei, essi riducono le aderenze peritoneali mediante l'inibizione della sintesi di prostaglandine e trombossano, inoltre, diminuiscono l'aggregazione piastrinica. Gli inibitori delle citochine proinfiammatorie come fattore di crescita trasformante-beta (TGF-β), interleuchina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-α), sono molecole impiegate nella ricerca oncologica e in studi clinici per il trattamento di patologie fibrotiche. [100]

Antistaminici

Gli antagonisti dei recettori istaminici inibiscono la proliferazione dei fibroblasti e la secrezione di istamina, che è lo strumento con cui i mastociti partecipano alla fibrosi. Gli antistaminici sono solitamente utilizzati con i corticosteroidi. [20]

Antiossidanti

Tra gli antiossidanti, la vitamina E è la vitamina più studiata nella prevenzione delle aderenze grazie ai suoi effetti antiossidanti e antinfiammatori. Il blu di metilene inibisce la generazione di radicali liberi dell'ossigeno come il superossido, dunque, può prevenire efficacemente la formazione delle aderenze. Però, attraverso il suo effetto inibitorio transitorio sulla via dell'ossido nitrico, rilassa la muscolatura liscia compromettendo la pressione di rottura anastomotica durante la fase iniziale del processo di guarigione della ferita. Anche polifenoli, come la quercetina e il resveratrolo, possiedono proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e antitumorali e inibiscono la transizione mesoteliale-mesenchimale cellulare, processo che è alla base della formazione delle aderenze. [101], [102], [103]. Sono in fase di studio idrogeli responsivi alla presenza di ROS (specie reattive dell'ossigeno) per il rilascio di attivi antiossidanti. [104]

Antipertensivi

L'utilizzo di farmaci antipertensivi attivi sul sistema renina-angiotensina-aldosterone potrebbe essere una strategia per contrastare le aderenze. È noto, infatti, che l'angiotensina II ha attività proinfiammatoria, profibrotica e promuove la segnalazione di TGF-β. Inoltre, gli antagonisti del recettore dell'angiotensina di tipo 1 (AT1) riducono l'espressione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAI-1). [105]

Anticoagulanti e agenti fibrinolitici

L'eparina si lega all'antitrombina III potenziandone gli effetti di inibizione di trombina (fattore IIa) e fattore Xa, attori della cascata coagulativa. Il dicumarolo è antagonista della vitamina K, vitamina essenziale per la carbossilazione di fattori specifici della coagulazione. La pentossifillina è un derivato della metilxantina, inibisce l'aggregazione piastrinica riducendo i livelli di fibrinogeno plasmatico. [106]

Gli agenti fibrinolitici possono ridurre le aderenze, anche se possono causare complicazioni emorragiche. Sono in fase di studio anche terapie geniche che includono la somministrazione di geni t-PA (attivatore tissutale del plasminogeno) tramite vettori virali per promuovere la fibrinolisi. [25]

Antibiotici

Alcuni antibiotici sono comunemente usati per la profilassi contro le infezioni postoperatorie e la formazione di aderenze. Anche se non sono le infezioni la causa primaria delle adesioni post-operatorie, gli antibiotici possono contrastarle indirettamente: una minore infezione può portare a una minore formazione di aderenze. [3], [20]

Farmaci anti-fibrotici

Il pirfenidone è un farmaco orfano per il trattamento della fibrosi polmonare idiopatica ed ha proprietà antiaderenziali. [3], [107]

Inibisce la proliferazione dei fibroblasti, la produzione di collagene e la liberazione di mediatori dell'infiammazione.

Farmaci con proprietà pleiotropiche

Le statine sono ipocolesterolemizzanti inibitori selettivi e competitivi dell'enzima HMG-CoA reduttasi (3-idrossi-3-metiglutaril coenzima A reduttasi), l'enzima deputato alla conversione di 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A in mevalonato, un precursore fondamentale nella biosintesi del colesterolo. Le statine riducono la produzione locale di citochine pro-infiammatorie proteggono le pareti arteriose, riducono la proliferazione dei linfociti T citotossici. Le statine agiscono su mediatori infiammatori come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-α), fattore di crescita trasformante-beta (TGF-β) e molecole di adesione intercellulare (ICAM). [108], [109] Sono antiossidanti: agiscono sopprimendo vie ossidative specifiche, in particolare riducendo marker di stress ossidativo, contrastano la perossidazione lipidica e la formazione di perossinitrito. Sono antifibrotiche: inibiscono l'espressione dei fattori di crescita e modulano i marcatori profibrogenici nei fibroblasti, riducono la produzione di citochine profibrotiche. Sono antiapoptotiche ed endoteliali-riparative.

Sono antitrombotiche: interferiscono con l'attivazione piastrinica, aumentano l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e diminuiscono l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), contrastando la coagulazione senza rischio di alterare la pressione di rottura anastomotica ovvero la resistenza meccanica e integrità di un'anastomosi.

Target	*Categoria di farmaci*	*Esempi*
Infiammazione	Antinfiammatori steroidei e modulatori ormonali	desametasone; prednisone; (cortisonici)
		progesterone; (ormoni)
		tamoxifene, anastrozolo; (inibitori dell'aromatasi)
		agonisti dell'ormone di rilascio delle gonadotropine
	Antinfiammatori non steroidei (FANS)	ibuprofene; flurbiprofene; nimesulide; indometacina;
	Inibitori delle citochine proinfiammatorie	Anticorpi
	Antistaminico	difenidramina; prometazina;
	Antiossidanti	melatonina; vitamina E; superossido dismutasi; epigallocatechina-3-gallato; blu di metilene; resveratrolo; quercetina
	Antipertensivi	Farmaci attivi sul sistema renina-angiotensina-aldosterone
Coagulazione	Anticoagulanti	eparina; dicumarolo; pentossifillina;
	Agenti fibrinolitici	attivatore tissutale del plasminogeno (tPA); streptochinasi; urochinasi; pepsina; tripsina; antagonista del recettore della neurochinina 1;
Infezioni	Antibiotici	linezolid; tetraciclina; cefalosporina;
Fibrosi	Piridine	pirfenidone;
	Statine	atorvastatina; rosuvastatina;

Tabella 1: la tabella descrive i principi attivi antiproliferativi che sono utilizzabili per prevenire le aderenze post-operatorie.

8. Strategie per la veicolazione di principi attivi scarsamente solubili

8.1 Complessi di ciclodestrine

Gli zuccheri di Schardinger, più comunemente noti come ciclodestrine, sono oligosaccaridi costituiti da molecole di glucosio legate tra loro in una struttura ciclica. La α – ciclodestrina contiene sei unità di glucosio, la β - ciclodestrina sette e la γ - ciclodestrina otto.

Presentano una forma toroidale ovvero a tronco di cono con una cavità interna idrofobica e una superficie esterna idrofila. Le tre classi di ciclodestrine differiscono tra loro per grandezza dell'anello e dunque della cavità e per la solubilità in acqua.

L'α-ciclodestrina ha diametro della cavità tra 4,7-5,3 Å e solubilità di 145 g/l. La β-ciclodestrina ha diametro della cavità tra 6,0-6,5 Å e solubilità di 18,5 g/l. La γ-ciclodestrina ha diametro della cavità di 7,5-8,3 Å e solubilità di 232 g/l. L'altezza del toroide è sempre 7,9 Å. La struttura tridimensionale costringe i gruppi ossidrilici sui bordi esterni, mentre nella cavità sono presenti solo atomi di idrogeno e ponti ossigeno. Questo fa sì che la cavità centrale abbia natura idrofobica, mentre la parte esterna è idrofila: ciò si traduce nella possibilità per le ciclodestrine di ospitare molecole idrofobe all'interno della cavità e di essere solubili in acqua.

Ne risulta anche l'abilità a indurre un incremento di solubilità delle sostanze idrofobe ospitate nella cavità in acqua. Quando una molecola di polarità e dimensioni opportune viene ospitata nella cavità della ciclodestrina si forma un cosiddetto complesso di inclusione di tipo supramolecolare.

La β-ciclodestrina è la più usata nonostante abbia poca idrosolubilità in quanto possiede un numero dispari di unità e a causa dell'elevata tendenza con la quale forma dimeri insolubili. I derivati delle β-ciclodestrine, come l'idrossi-propil-ciclodestrina, superano questo limite con un decremento della dimerizzazione e dunque un aumento della solubilità in acqua, maggiore potere complessante, minore tossicità. [110]

I gruppi idrossi-alchilici, infatti, permettono maggiori interazioni tra cavità interna e molecole di principio attivo.

La cavità lipofila delle ciclodestrine fornisce un microambiente in cui frazioni apolari di dimensioni appropriate possono inserirsi per formare complessi di inclusione.

In letteratura sono riportati complessi di β-ciclodestrine e atorvastatina, Modulando i rapporti stechiometrici tra le due, è dunque possibile realizzare dei complessi in cui l'attivo

è sia inserita all'interno della cavità idrofobica ciclodestrinica, stabilendo con essa interazione elettrostatica e di Van Der Waals. [110]

Durante la formazione del complesso non si formano legami covalenti ma interazioni idrofobiche. Ciò che promuove principalmente la formazione del complesso è il rilascio di molecole d'acqua (altamente entalpiche) dalla cavità, riducendo così la tensione dell'anello ciclodestrinico. Come risultato si ha il raggiungimento di uno stato energetico inferiore e quindi più stabile. Essendo la formazione del complesso, un processo favorevole in termini di entalpia ed entropia, e supponendo che si formi un rapporto 1:1 con la molecola ospite, il processo si può descrivere con la seguente reazione di equilibrio:

$$[CD.\ n\ H_2O] + X \rightleftarrows [CD.\ X] + n\ H_2O$$

La capacità di una ciclodestrina di formare un complesso di inclusione con una molecola ospite è funzione di due fattori chiave:

- il primo è sterico e dipende sia dalla dimensione della ciclodestrina, sia dalla dimensione della molecola ospite che deve adattarsi correttamente alla cavità della ciclodestrina;
- il secondo fattore critico è rappresentato dalle interazioni termodinamiche tra i diversi componenti del sistema (ciclodestrina, ospite, solvente); per la formazione di un complesso ci deve necessariamente essere una forza trainante favorevole, che attiri la molecola ospite nella ciclodestrina.

Mentre la formazione del complesso è molto rapida (spesso qualche minuto), raggiungere l'equilibrio finale può richiedere molto più tempo. La dissociazione del complesso è un processo generalmente rapido, di solito guidato da un grande aumento di molecole d'acqua nell'ambiente circostante. In sistemi altamente diluiti e dinamici, come il corpo umano, la molecola ospite sarà quindi lasciata libera in soluzione.

In letteratura ci sono molti esempi di complessi di ciclodestrine per la veicolazione di farmaci, anche per successiva veicolazione in idrogeli, e anche stimuli-responsive. [110], [111], [112], [113]

È bene ricordare che le ciclodestrine non fungono solo da vettori di attivi ma anche da agenti terapeutici stessi. Sono studiati infatti come complessanti del colesterolo nelle patologie aterosclerotiche e per complessare il colesterolo del pericapside virale durante un'infezione. [114], [115]

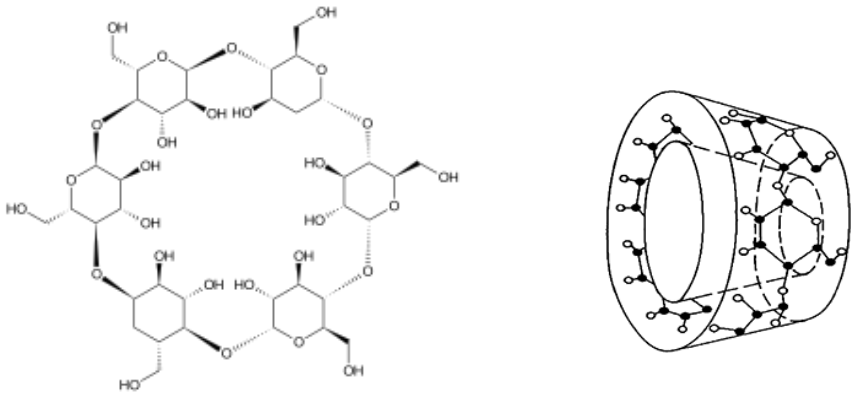


Figura 5: l'immagine riporta la struttura chimica delle ciclodestrine. (wikipedia.it, onlinelibrary.wiley.com).

8.1.1 Metodi di produzione di complessi con le ciclodestrine

Sono molti i metodi utilizzati in laboratorio per la formazione del complesso:

- *Metodo del co-solvente di evaporazione*

  Consiste nel disciogliere la ciclodestrina in acqua e successivamente aggiungervi la molecola di principio attivo precedentemente solubilizzata in un solvente in cui è solubile (es: metanolo). La miscela viene poi lasciata in agitazione ad una certa temperatura per un periodo variabile. Successivamente si fa evaporare il solvente.

- *Metodo del solvente comune di evaporazione*

  A differenza del metodo precedente, si usa un singolo solvente per solubilizzare ciclodestrine e attivo.

- *Microonde*

  Dopo aver aggiunto una piccola quantità di solvente, la miscela viene messa in un microonde alla potenza di 450 W per 120s. L'irraggiamento rompe i legami deboli e favorisce l'incapsulamento. Tra i vantaggi di questa tecnica: l'assenza di residui derivanti dall'uso di grandi volumi di solventi organici, basso costo e rapidità nell'esecuzione.

- *Ultrasonicazione ad alta intensità*

  Questo processo permette di applicare forze di taglio elevate che inducono cavitazione acustica nei liquidi, micro-turbolenze e condizioni locali di alta pressione e temperatura. Questo facilita l'incapsulamento delle molecole "ospiti" idrofobiche all'interno della cavità idrofobica delle ciclodestrine.

- *Co-precipitazione*

Una soluzione di solvente contenente il principio attivo viene aggiunta, sotto agitazione, alle ciclodestrine disciolte in acqua. La soluzione viene raffreddata e si verificano cristallizzazione e precipitazione del complesso ottenuto utilizzando un anti-solvente.

- *Metodo dell'anidride carbonica supercritica*

  Ciclodestrine e attivo vengono introdotti in un'autoclave termostatata e pressurizzata con anidride carbonica portata a condizioni di temperatura e pressione superiori al suo punto critico. La CO_2 penetra nella cavità della ciclodestrina e facilita la diffusione dell'ospite al suo interno. Depressurizzando il sistema, la CO_2 evapora, lasciando il complesso solido puro.

- *Metodo del mortaio*

  Le ciclodestrine vengono mescolate con una piccola quantità di acqua purificata in un mortaio fino all'ottenimento di una pasta in cui verrà incorporato l'ospite. Successivamente, il solido ottenuto viene lavato con una piccola quantità di solvente. Questo processo di macinazione provoca una riduzione delle dimensioni delle particelle e un aumento della superficie di contatto necessaria per l'interazione tra l'ospite e la ciclodestrina. Questo metodo non richiede l'utilizzo di solventi, pertanto può essere considerato un metodo pulito ed ecocompatibile.

- *Essiccazione a spruzzo*

  Questa tecnica è caratterizzata da una sequenza di tre fasi. Prima di ha l'atomizzazione del liquido in ingresso, poi l'essiccazione delle goccioline fini mediante un flusso d'aria riscaldata ed infine la separazione delle particelle essiccate in un flusso d'aria. [116], [117]

8.2 Nanosistemi a base lipidica

L'utilizzo della nanotecnologia a base lipidica per sistemi di incapsulamento e rilascio di composti attivi può essere applicato in diversi modelli, tra cui nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) e vettori lipidici nanostrutturati (NLCs) e nanoparticelle lipidiche (NLPs). Le nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) sono nanovettori con un nucleo solido di dimensioni comprese tra 10 e 1000 nm, contenenti principi attivi farmaceutici sia idrofili che idrofobi. Le SLN sono composte da lipidi solidi ben tollerati e biodegradabili, come mono-, di- e trigliceridi, acidi grassi, cere e steroidi, nonché da agenti emulsionanti lipofili e idrofili. Si tratta di dispersioni colloidali acquose costituite da un lipide che forma un cuore solido rivestito da un tensioattivo.

I tipi di lipidi solidi possono essere sotto forma di trigliceridi, gliceridi parziali, acidi grassi liberi, steroidi e cere. Presentano un core idrofobico in cui il principio attivo poco solubile può accumularsi per poi essere rilasciato una volta in situ a temperatura corporea. L'utilizzo di tensioattivi a basse concentrazioni, che si dispongono all'interfaccia delle fasi, permette di abbassare l'energia interfacciale ed evitare l'aggregazione tra le particelle.

Alla base della formazione di nanoparticelle vi è l'instaurarsi di interazioni idrofile-idrofobiche e forze di van der Waals tra fosfolipidi e molecole d'acqua. Inoltre, le proprietà fisico-chimiche dei lipidi, come la biocompatibilità, la bassa suscettibilità ai fenomeni di erosione e il lento assorbimento d'acqua, rendono i lipidi un sistema di nanovettori ideale per migliorare la solubilità acquosa e la biodisponibilità degli attivi.

Le nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) rappresentano un sistema di veicolazione molto ben tollerato anche per attivi idrofili. [118]

Le SLNs si differenziano rispetto ai NLCs ovvero i Nanostructure Lipid Carriers poiché per realizzare le NLCs si utilizzano lipidi solidi e liquidi (*vedi Figura 4*). [119]

Sono stati studiati idrogeli di gelatina e acido ialuronico contenenti NLCs caricate con statine idrofobiche. [120]

Sia SLNs che NLCs sono sistemi sono adatti al trasporto efficiente di farmaci terapeutici verso i tessuti bersaglio, fornendo al contempo vantaggi quali possibilità di produzione industriale su larga scala, il miglioramento della biodisponibilità e la protezione dalla degradazione. Grazie alle loro proprietà lipofile, le nanoparticelle lipidiche possono superare alcune barriere fisiologiche, come l'epidermide e la barriera emato-encefalica, senza richiedere modifiche superficiali. Nella selezione dei componenti per la formulazione, è fondamentale considerare il punto di fusione della miscela lipidica, la capacità di carico, la solubilità del farmaco e la struttura fisica per garantire che siano in linea con l'applicazione prevista. Allo stesso modo, il tipo e il rapporto dei tensioattivi sono fattori critici nello sviluppo della formulazione, in quanto creano una barriera interfacciale tra la matrice dispersa e il disperdente, impedendo l'aggregazione e la coalescenza delle nanoparticelle. [121]

Un'ulteriore categoria è rappresentata dalle Nanoparticelle Lipidiche (NLPs) costituiti da lipidi ionizzabili, colesterolo, fosfolipidi e fosfatidilcoline di tipologia variabile. Proteggono i farmaci carichi negativamente e sensibili alla degradazione enzimatica. Sono principalmente utilizzati per veicolare farmaci a base di mRNA. Le nanoparticelle lipidiche solide si sono sviluppate negli anni '90 del secolo scorso come nuova strategia di veicolazione rispetto al modello tradizionale dei liposomi. I liposomi sono vescicole

costituite da un doppio strato fosfolipidico: esternamente le teste idrofiliche si mettono in contatto con l'ambiente acquoso della soluzione in cui si trovano mentre internamente le code idrofobiche si toccano tra loro. I liposomi possono dare problemi di stabilità, perdere il principio attivo inserito al loro interno ed essere sottoposti a degradazione idrolitica. Queste problematiche vengono dunque superate dalle SLNs poiché questi sistemi proteggono il principio attivo per molto tempo grazie alla loro matrice solida, lo possono rilasciare per un periodo prolungato e non sono sensibili alla degradazione idrolitica. Le SLN rimangono stabili sia a temperatura ambiente che a temperatura corporea. Il rilascio del farmaco dalla formulazione è influenzato dal tipo di matrice e dalla posizione del farmaco stesso. Nel caso di matrice a guscio, durante la fase di raffreddamento successiva all'omogeneizzazione, la fase lipidica solidifica per prima, si ha una progressiva concentrazione dell'API non tanto nel nucleo ma piuttosto nel guscio assieme ai lipidi. Questo permette un rilascio rapido dell'API. Nel caso di una matrice omogenea, il principio attivo è uniformemente disperso a livello molecolare all'interno della matrice lipidica. Questo consente un rilascio controllato e prolungato del farmaco. Nel caso di una matrice centrale ricca di farmaco, il farmaco viene disciolto vicino alla sua solubilità di saturazione nel lipide fuso, portando alla sovrasaturazione durante il raffreddamento. Questa sovrasaturazione innesca la ricristallizzazione del farmaco, mentre il successivo raffreddamento provoca la ricristallizzazione del lipide attorno a questo nucleo ricco di farmaco. Questo modello è altamente efficace per ottenere un rilascio prolungato del farmaco. La ricerca sulle nanotecnologie, per contrastare le adesioni post-operatorie, ha portato a risultati promettenti anche se ancora in fase preclinica. Sono da considerare anche problematiche come rischi di tossicità, inquinamento ambientale, costi elevati e disparità di accesso che complicano la ricerca in questo campo. [9]

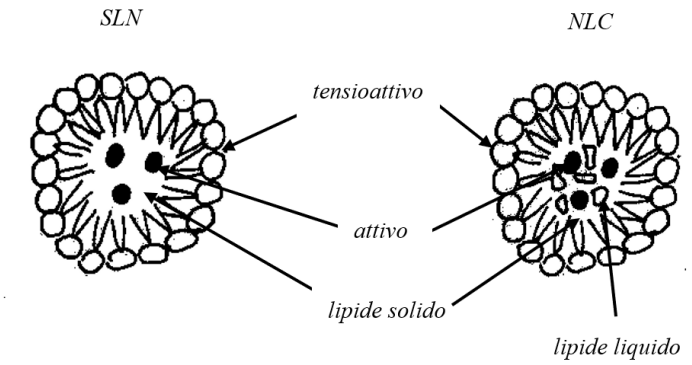


Figura 6: l'immagine a sinistra è rappresentativa delle SLNs mentre quella a destra descrive i NLCs.

8.2.1 Metodi di produzione delle SLNs

I metodi che possono essere utilizzati per la fabbricazione delle SLNs includono:

- *Omogeneizzazione a freddo*

  Nel metodo di omogeneizzazione a freddo, i componenti o i composti attivi vengono disciolti in lipidi fusi e introdotti nella fase acquosa, quindi raffreddati rapidamente con ghiaccio secco o azoto liquido. Si ha precipitazione delle particelle che sono poi sottoposte a omogeneizzazione in un reattore ad alta pressione in condizioni di freddo.

- *Omogeneizzazione a caldo*

  Questo metodo può essere utilizzato dall'industria nella produzione di SLN su larga scala. I componenti micronutrienti o i composti attivi vengono disciolti nel lipide fuso o nella fase acquosa a seconda della loro natura in base al principio secondo cui "il simile scioglie il simile".

  La fase organica viene dispersa nella fase acquosa con tensioattivo per ottenere un'emulsione O/A. Segue ultrasonicazione e omogeneizzazione con Ultra-Turrax. L'emulsione calda risultante viene raffreddata per permettere la cristallizzazione dei lipidi.

- *Evaporazione del solvente*

  Il lipide il l'attivo vengono disciolti in una miscela di acqua e un solvente organico non polare (es: cicloesano). Dopo agitazione meccanica si ottiene un'emulsione e successivamente il solvente organico viene evaporato provocando la precipitazione delle nanoparticelle in mezzo aquoso.

- *Fluidi supercritici*

  L'uso della tecnica dei fluidi supercritici come anidride carbonica supercritica ha il vantaggio di non utilizzare solventi, in modo che il processo di fabbricazione possa essere più veloce e sicuro rispetto ad altri metodi che utilizzano solventi. A partire da un'emulsione, il fluido supercritico induce la precipitazione delle nanoparticelle solide.

- *Metodo della doppia emulsione*

  Si tratta di una tecnica di preparazione usata soprattutto per incapsulare principi attivi idrofili (solubili in acqua) che altrimenti non si legherebbero bene alla matrice lipidica solida. Si prepara un'emulsione W/O (acqua in olio) miscelando una soluzione contenente il componente attivo idrofilo in acqua ad una miscela composta da lipidi fusi e tensioattivo/co-tensioattivo. A questa si aggiunge una miscela di acqua,

tensioattivo e co-tensioattivo per formare una doppia emulsione W/O/W (acqua in olio in acqua).

- *Microfluidica*

  Nell'apparecchiatura microfluidica si inietta la fase acquosa (pompa 1) e la fase organica (pompa 2). La sintesi di SLN avviene all'interno di chip dotati di microscopici canali dove i fluidi vengono fatti interagire. I precursori e il principio attivo vengono spinti nei microcanali, inducendo aggregazione e formazione di nanoparticelle. [122], [123], [124]

II. SCOPO DEL LAVORO

Le aderenze postoperatorie rappresentano una delle complicanze più frequenti della chirurgia addominale e pelvica, con un'incidenza particolarmente elevata negli interventi a cielo aperto, che può superare il 90%. Sebbene il ricorso a tecniche laparoscopiche possa ridurne il rischio, la formazione di aderenze rimane una problematica clinica rilevante, potenzialmente associata a dolore cronico, infertilità e occlusione intestinale.

Nonostante la disponibilità di diversi dispositivi antiaderenziali, la loro efficacia rimane limitata da alcune criticità di natura formulativa e applicativa. Gli idrogeli possono degradarsi troppo rapidamente, avere problemi di robustezza strutturale o fungere da terreno di coltura per infezioni. Le membrane, invece, possono essere difficili da manipolare e posizione, soprattutto in laparoscopia, e possono presentare una scarsa adesione ai tessuti, con conseguente rischio di dislocazione. Queste limitazioni assumono particolare rilevanza durante le prime fasi della guarigione peritoneale, generalmente comprese nei 5–7 giorni successivi all'intervento chirurgico, durante le quali risulta fondamentale mantenere una separazione efficace tra le superfici tissutali danneggiate.

Alla luce di queste considerazioni, la presente tesi si propone di progettare, sviluppare e caratterizzare idrogeli termoresponsivi a base di metilcellulosa (MC) e acido ialuronico (HA), destinati alla veicolazione locale di un principio attivo antiproliferativo per la potenziale prevenzione delle aderenze postoperatorie. L'obiettivo è ottenere un sistema somministrabile allo stato fluido, capace di gelificare in prossimità della temperatura corporea e di formare una barriera fisica temporanea nel sito di applicazione, associando a tale funzione il rilascio locale del principio attivo.

La metilcellulosa è stata selezionata per le sue proprietà reologiche e per il comportamento termoresponsivo. In particolare, sono state considerate metilcellulose caratterizzate da due differenti pesi molecolari, pari a 14 e 88 kDa, e concentrazioni comprese tra l'1,25% e l'8% p/v. Sulla base dei risultati dello studio preformulativo condotto mediante un approccio di Design of Experiments (DoE), è stata selezionata la metilcellulosa a basso peso molecolare (14 kDa), alla concentrazione dell'8% p/v. L'acido ialuronico, un glicosaminoglicano naturalmente presente nella matrice extracellulare, è stato introdotto nella formulazione a due concentrazioni, pari allo 0,10% e allo 0,45% p/v, al fine di studiarne l'influenza sulle proprietà reologiche e sull'interazione della formulazione con un substrato proteico.

Il principio attivo antiproliferativo selezionato presenta un peso molecolare di 500,57 g/mol, un coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (log P) pari a 0,13 e una costante di dissociazione (pKa) di 4,76. È classificato nella classe II del Biopharmaceutics Classification System (BCS), caratterizzata da bassa solubilità acquosa ed elevata permeabilità. Considerata la limitata solubilità acquosa del principio attivo, sono state individuate due strategie di veicolazione: la complessazione con 2-idrossipropil-β-ciclodestrina (HP-β-CD) e l'incapsulamento in nanoparticelle lipidiche solide (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs) a base di burro di cacao. L'impiego di questi sistemi è stato finalizzato a favorire l'incorporazione dell'attivo nella matrice idrogelica e a valutarne il comportamento di rilascio.

Il lavoro sperimentale è stato articolato in tre fasi principali.

La prima fase ha riguardato lo sviluppo e la caratterizzazione di idrogeli termoresponsivi a base di MC all'8% p/v e HA allo 0,10% o allo 0,45% p/v, mediante analisi reologiche e studi di sinergismo con un substrato di gelatina. È stata inoltre valutata l'influenza di differenti sali sulla temperatura di gelificazione, selezionando NaCl allo 0,9% p/v. Le formulazioni sono state successivamente sottoposte a prove di stabilità, siringabilità e nebulizzabilità, per valutarne le proprietà e le possibili modalità di somministrazione.

La seconda fase si è concentrata sullo sviluppo di due sistemi di veicolazione del principio attivo antiproliferativo: complessi con 2-idrossipropil-β-ciclodestrina (HP-β-CD) e nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) a base di burro di cacao. Sono state valutate l'efficienza di associazione dell'attivo e, nel caso delle SLNs, le principali caratteristiche dimensionali e superficiali mediante DLS, ELS e NTA.

Nella terza fase, i sistemi di veicolazione sono stati incorporati nell'idrogelo selezionato, costituito da MC all'8% p/v, HA allo 0,45% p/v e NaCl allo 0,9% p/v, individuato sulla base del maggiore sinergismo reologico con il substrato di gelatina. Le formulazioni ottenute sono state sottoposte a studi di rilascio in vitro mediante celle di Franz e a prove di perdita di massa.

III. PARTE SPERIMENTALE

1. Materiali

Polimeri

- Metilcellulosa, 4000 cP al 2% in soluzione acquosa 20°C, MW 88 000 Da, DS 1,5-1,9
- Metilcellulosa, 15 cP al 2% in soluzione acquosa 20°C, MW 14 000 Da, DS 1,5-1,9
- Acido ialuronico (HySilk, Contipro), MW 150-350 kDa

Solventi

- Acqua milli-Q
- Metanolo (Carlo Erba)

Sali

- Cloruro di sodio (Sigma Aldrich)
- Solfato di sodio anidro (Carlo Erba)
- Nitrato di sodio (Sigma Aldrich)
- Phosphate Buffered Saline (Corning)

Altro

- 2-idrossipropil-β-ciclodestrina, MW 1380 g/mol, DS 0,5-0,7 (Sigma Aldrich)
- Burro di cacao (Aboca)
- Tween 80 (Polichimica S.R.L.)
- Principio attivo, MW 500,57 g/mol (Sigma Aldrich)
- Gelatina, 175 g Bloom, tipo A (Sigma Aldrich)
- Blu di metilene (Sigma Aldrich)

2. Metodi

2.1 Preparazione di idrogeli a base di metilcellulosa e acido ialuronico

Gli idrogeli sono stati preparati solubilizzando l'acido ialuronico (HA), in acqua milli-Q, a temperatura ambiente, sotto agitazione magnetica. Successivamente, è stata dispersa la metilcellulosa (MC). Entrambi i polimeri sono stati aggiunti poco alla volta per evitare la formazione di grumi. La miscela polimerica risultante è stata mantenuta sotto agitazione magnetica per 2 ore per garantire la corretta idratazione dei polimeri in acqua. Gli idrogeli sono stati poi conservati in frigorifero a 4°C almeno fino al giorno successivo, per ottenere un prodotto trasparente e senza bolle.

2.2 DoE - Design of Experiment

Il disegno sperimentale è un metodo razionale che permette di studiare la relazione tra fattori che influenzano un processo. Si tratta di un'analisi statistica multivariata che sfrutta l'interazione tra più parametri per conoscere l'iperspazio sperimentale a partire da effetti di grado superiore. Il disegno sperimentale ha lo scopo di razionalizzare un esperimento rispetto al tradizionale metodo "one-at-a-time", risparmiando tempo ed energie per ricavare informazioni utili per ottimizzare un processo.

Per prima cosa è fondamentale identificare tra tutti i fattori, quelli che influenzano la risposta (screening design). Cambiare un parametro alla volta, ovvero seguire il tradizionale metodo formulativo, non contempla l'interazione tra parametri ovvero gli "effetti di grado superiore al primo". Il DoE invece, permette di conoscere l'iperspazio sperimentale con prove non infinite e sfruttando gli effetti di grado superiore nati, dunque, dall'interazione di un numero n di fattori grazie ad un numero 2^n di esperimenti. Si parla di Design Space ovvero di iperspazio sperimentale, un'area multidimensionale nello spazio dei parametri, nel quale muoversi per ottimizzare l'esperimento in modo razionale e non casuale.

Il numero di esperimenti si calcola con 2^n dove n è il numero delle variabili considerate. In questa tesi sono state analizzate tre variabili per un totale di 2^3 esperimenti ovvero 8 formulazioni in totale.

Il DoE è stato applicato come studio formulativo per valutare l'impatto di molteplici fattori sul comportamento reologico dell'idrogelo, come descritto in letteratura. [125]

È stato selezionato un full factorial design, comprendente tutte le possibili combinazioni dei componenti e dei relativi livelli. In particolare, sono stati studiati tre fattori a due livelli, alto (+) e basso (−), secondo un full factorial design 2^3 ($k = 3$):

I tre fattori presi in considerazione sono i seguenti:

- Peso molecolare di MC (metilcellulosa): alto PM (88 kDa), basso PM (14 kDa)
- Concentrazione di MC (metilcellulosa): alta (8% p/v), bassa (1,25% p/v)
- Concentrazione di HA (acido ialuronico): alta (0,45% p/v), bassa (0,10% p/v)

La combinazione di questi fattori ha portato alla preparazione di otto diverse formulazioni (riportate in *Tabella 2*). Come parametro di risposta è stato utilizzato il rapporto $\Delta\eta/\eta$, che esprime l'incremento relativo di viscosità tra 25°C e 37 °C ed è stato utilizzato il software Chemometric Agile Tool. Il parametro reologico normalizzato $\Delta\eta/\eta$ è stato calcolato nel seguente modo:

$$\Delta\eta/\eta = \frac{\left(\eta(37^{\circ}C)-\eta(25^{\circ}C)\right)}{\eta(25^{\circ}C)}$$

Campione	**Tipo MC**	**[MC]**	**[HA]**	**Tipo MC**	**[MC]**	**[HA]**
1	-	+	+	14 kDa	8%	0,45%
2	+	+	+	88 kDa	8%	0,45%
3	-	-	-	14 kDa	1,25%	0,10%
4	+	-	-	88 kDa	1,25%	0,10%
5	-	-	+	14 kDa	1,25%	0,45%
6	+	-	+	88 kDa	1,25%	0,45%
7	-	+	-	14 kDa	8%	0,10%
8	+	+	-	88 kDa	8%	0,10%

Tabella 2: Disegno fattoriale completo 2^3; tipo di MC e concentrazioni finali di MC e HA (espresse come % p/v).

La prevedibilità del modello è stata inoltre validata confrontando i risultati ottenuti da tre repliche del punto centrale con quelli predetti dal modello. A tale scopo, è stata preparata una formulazione costituita da MC allo 4,625% p/v e HA allo 0,275% p/v, sottoposta successivamente a misure di viscosità.

2.3 Caratterizzazione reologica

La reologia è la disciplina che studia lo scorrimento e la deformazione dei materiali in seguito all'applicazione di una forza F su una superficie A.

Le misure sono state eseguite con un reometro modulare compatto (MCR102 Anton Paar S.r.l Italia, *Figura 7*) dotato di combinazione cono-piatto (CP50-1, Ø = 50 mm; angolo = 1°) come sistema di misura a velocità di taglio crescenti, applicando un range di Shear stress nell'intervallo 1-600 s^{-1}. I valori di viscosità sono stati presi allo Shear rate di 2,75 s^{-1}. Sono state fatte tre repliche per ciascun campione a ciascuna temperatura, a 25°C e 37°C.



Figura 7: Modular Compact Rheometer (MCR102 Anton Paar S.r.l Italia).

2.3.1 Test di viscosità

La viscosità (η, [Pa*s]) è la resistenza di un materiale allo scorrimento ovvero, secondo la legge di Newton, il rapporto tra uno sforzo di taglio Shear stress (τ, [Pa]) ed un gradiente di scorrimento Shear rate ($\dot{\gamma}$, [1/s]). Tale viscosità si esprime in Pascal-secondo (Pa*s), nel sistema CGS in Poise (P), che è uguale a 0,1 Pa*s.

Analizzare la viscosità permette di definire la curva di flusso, ottenuta applicando uno sforzo di taglio crescente misurando contemporaneamente il gradiente di scorrimento. La viscosità sarà dunque il coefficiente angolare di una retta che presenta Shear rate sulle ascisse e Shear stress sulle ordinate.

2.3.2 Stress sweep test

Lo stress sweep test o test dello sforzo di taglio è un test in regime dinamico che serve a determinare il regime viscoelastico lineare, ovvero il range di stress o deformazione all'interno del quale tutti i parametri reologici misurati sono caratteristici del sistema indipendentemente dalle condizioni di analisi. Nel corso del test, lo stress oscillatorio viene

progressivamente incrementato, mentre la frequenza di oscillazione viene mantenuta costante. Il segnale applicato presenta un andamento sinusoidale nel tempo. Nel presente studio, la frequenza è stata fissata a 0,1 Hz, mentre lo stress è stato variato nell'intervallo compreso tra 0,001 e 100 Pa.

I risultati sono rappresentati riportando lo stress applicato (Pa) sull'asse delle ascisse e i valori di G' e G'' (Pa) sull'asse delle ordinate. La regione di viscoelasticità lineare è identificata dall'intervallo di stress nel quale i moduli mantengono un andamento pressoché costante, senza variazioni significative al variare dell'ampiezza dello stress applicato.

Le analisi sono state eseguite per ciascun campione a 25 °C e 37 °C, effettuando repliche sperimentali. Il valore di stress da utilizzare nelle successive analisi reologiche oscillatori è stato selezionato all'interno della regione di viscoelasticità lineare, in modo da garantire che la struttura del campione non fosse significativamente alterata durante la misura

2.3.3 Oscillation test

Una volta determinata la regione di viscoelasticità lineare, è stato selezionato un valore di stress pari a 0,05 Pa, corrispondente a un valore intermedio della regione di linearità e sufficientemente distante dal limite superiore della stessa, al fine di garantire che le successive misure fossero condotte senza compromettere la struttura del campione

Per ciascun campione sono state effettuate repliche sperimentali a 25°C e a 37°C.

Il valore di stress selezionato è stato quindi mantenuto costante nelle successive analisi reologiche oscillatori. In particolare, è stato eseguito un frequency sweep, applicando al campione una sollecitazione sinusoidale a stress costante e variando progressivamente la frequenza di oscillazione nell'intervallo compreso tra 0,1 e 10 Hz. Il test consente di caratterizzare la risposta viscoelastica del materiale in funzione della frequenza di sollecitazione, attraverso la determinazione del modulo elastico (G'), associato alla capacità del sistema di immagazzinare energia elastica, e del modulo viscoso (G''), correlato alla dissipazione dell'energia sotto forma di componente viscosa.

2.3.4 Rampa di temperatura

La rampa di temperatura è stata utilizzata per valutare l'evoluzione delle proprietà viscoelastiche della formulazione in funzione della temperatura e per individuare la transizione da un comportamento prevalentemente viscoso a uno prevalentemente elastico. Con l'aumento della temperatura, il sistema passa da una condizione in cui prevale il modulo viscoso o dissipativo (G''), caratteristica dello stato sol-like, a una condizione in cui prevale il modulo elastico o conservativo (G'), associata alla formazione della struttura

gelificata. Il rapporto tra il modulo viscoso e il modulo elastico, espresso come tan δ = G''/G', consente di descrivere il comportamento viscoelastico del sistema: valori di tan δ > 1 indicano una prevalenza della componente viscosa, mentre valori di tan δ < 1 indicano una prevalenza della componente elastica.

Sono state effettuate tre repliche della rampa di temperatura per ciascun campione, a cui è stato applicato uno stress oscillatorio di 0,05 Pa. La temperatura di gelificazione è stata determinata individuando la temperatura corrispondente alla transizione tra il comportamento prevalentemente viscoso e quello prevalentemente elastico, ovvero al punto di crossover tra G'' e G' (G' = G''), corrispondente a tan δ = 1.

2.3.5 Test di bioadesione – sinergismo reologico

La bioadesione è stata valutata mediante il metodo del sinergismo reologico, utilizzando come substrato la gelatina in percentuale 8% p/v solubilizzata in acqua milli-Q.

Quando un polimero bioadesivo (a) interagisce positivamente con un substrato (b), le interazioni tra le due componenti possono determinare la formazione di una rete più strutturata, con conseguente aumento della viscosità (η). Le analisi reologiche sono state condotte a 37 °C, in triplicato. Il grado di sinergismo si calcola attraverso l'equazione reologica: $\Delta\eta = \eta_{ab} - (\eta_a + \eta_b)$

dove ηab rappresenta la viscosità della miscela polimero–gelatina, mentre ηa e ηb rappresentano, rispettivamente, le viscosità del polimero e della gelatina analizzati separatamente. Un valore di $\Delta\eta > 0$ indica un'interazione sinergica positiva tra il polimero e il substrato, in quanto la viscosità della miscela (ηab) risulta superiore alla somma delle viscosità dei singoli componenti (ηa + ηb). Al contrario, valori di $\Delta\eta \leq 0$ indicano l'assenza di un'interazione sinergica positiva. Per la determinazione di ηab, ciascuna formulazione è stata inizialmente preparata a una concentrazione polimerica pari al doppio di quella finale desiderata. La formulazione è stata quindi miscelata in rapporto 1:1 con la soluzione di gelatina all'8% p/v. In questo modo, la diluizione conseguente alla miscelazione ha riportato il polimero alla concentrazione nominale prevista per la formulazione finale, consentendo di valutare il sinergismo reologico tra il polimero e il substrato. [125], [126]

2.4 Effetto dei sali (serie di Hofmeister)

2.4.1 Effetto dei sali sulla temperatura di gelazione

All'aumentare della temperatura, le molecole di cellulosa idratate e solubilizzate in acqua, sono sottoposte a modifiche reologiche. I legami a idrogeno tra catene polimeriche e acqua

si rompono e prevalgono le interazioni idrofobiche inter-catena, portando alla formazione di un reticolo tridimensionale (gel).

È noto che i sali influenzano la temperatura di gelificazione di polimeri come la cellulosa ma anche la solubilità delle proteine.

Questa loro proprietà, definita liotropica, ovvero relativa alle concentrazioni degli ioni nelle soluzioni acquose, è descritta nella serie di Hofmeister che ordina gli ioni dai più cosmotropici ai più caotropici:

ANIONI: citrato^{3-}>SO_4^{2-}=tartrato^{2-}>HPO_4^{2-}>CrO_4^{2-}>acetato->HCO_3^->Cl^->NO_3^->ClO_3^-

CATIONI: NH_4^+>K^+>Na^+>Li^+>Mg_2^+>Ca_2^+

Gli ioni cosmotropici (dal greco *kósmos,* ordine) sono ioni forti altamente carichi, responsabili del "salting out" ovvero formano legami a idrogeno con l'acqua sostituendosi al legame con il polimero in soluzione. Sono definiti "strutturatori" poiché interagiscono molto con le molecole d'acqua, che sono più libere di solvatare il polimero. Questi ioni igroscopici ordinano la struttura dell'acqua, disidratando il polimero e abbassando la temperatura di gelificazione. Essi, infatti, "rubando" i legami con l'acqua favoriscono le interazioni idrofobiche tra le catene polimeriche, anticipando la gelificazione.

Gli anioni trivalenti hanno un maggiore effetto rispetto ai bivalenti che, a loro volta, sono più forti dei monovalenti. Si trovano a sinistra della serie sopra riportata. Gli ioni caotropici (dal greco χάος, caos) sono responsabili del "salting in" ovvero dispongono le molecole d'acqua in modo disordinato rendendole maggiormente disponibili al legame con il polimero. Dunque, aumentano la solvatazione del polimero e ritardano la temperatura di gelificazione. Si trovano a destra della serie sopra riportata.

Gli anioni, grazie alla loro grandezza, polarizzabilità ed elettronegatività, sono più forti dei cationi nell'influenzare la struttura dell'acqua a causa dell'asimmetria di carica di quest'ultima. Dunque, gli ioni negativi hanno un maggior effetto sulla temperatura di gelificazione rispetto agli ioni positivi. [127], [128]

Lo studio su come la presenza dei sali influenzasse la temperatura di gelificazione degli idrogeli è stato realizzato confrontando le temperature di gelificazione di idrogeli a base di metilcellulosa e acido ialuronico a cui è stato aggiunto, primo tra tutti i reagenti, il sale ad una concentrazione tale da garantire un'osmolarità di 300 mOsm, condizione fisiologica di isotonia. Le concentrazioni dei sali sono le seguenti: NaCl 0,9 % p/v, Na_2SO_4 1,42% p/v, $NaNO_3$ 1,28% p/v. Per ciascuna tipologia di sale sono stati realizzati due idrogeli: uno con acido ialuronico 0,10% p/v e metilcellulosa 8% p/v e uno con acido ialuronico 0,45% e metilcellulosa 8% p/v.

2.4.2 Effetto dei sali sulla viscosità

È stato effettuato uno studio reologico per valutare l'influenza di NaCl 0,9% p/v sulla viscosità dell'idrogelo. Dunque, sono state messe a confronto le viscosità delle formulazioni con e senza sale, sia a 37°C che a 25°C.

2.5 Tilt test

Il Tilt test, o test di inclinazione, è una valutazione sperimentale di tipo qualitativo utilizzata per osservare il comportamento di un idrogel termoresponsivo al variare della temperatura. Il test consiste nell'inclinare e sottoporre a movimento un vial contenente il campione da analizzare, osservandone il comportamento di flusso.

Questo test serve a dimostrare la transizione da liquido a gel di un idrogelo termoresponsivo. Il Tilt test è stato eseguito sulle formulazioni contenenti NaCl 0,9% p/v a differenti temperature: 4°C, 25°C e 37°C.

2.6 Test di stabilità reologica

La stabilità delle formulazioni contenenti NaCl 0,9% p/v, è stata valutata mediante il monitoraggio della viscosità a 25 °C e 37 °C, al giorno 1 e al giorno 21 di conservazione. I campioni sono stati conservati a 4 °C in condizioni refrigerate per 21 giorni, al fine di valutare l'eventuale variazione delle proprietà reologiche della formulazione durante il periodo di conservazione. Le misure di viscosità sono state eseguite in triplicato.

2.7 Test di siringabilità

Il test di siringabilità permette di studiare la capacità di un idrogelo di essere estruso attraverso l'ago di una siringa. La siringabilità delle formulazioni selezionate è stata valutata utilizzando un Texture Analyzer (TA.XT plus. Stable Micro Systems, Regno Unito), dotato di cella di carico da 5 kg. È stato utilizzato un ago da 22 G (Gauge), ovvero 0,7 mm di diametro interno, una siringa di plastica di lunghezza 6 cm (60 mm) e di volume 4 ml. La velocità di estrusione è stata impostata a 1 mm/s. I test sono stati effettuati in triplicato a temperatura ambiente, considerata rappresentativa delle condizioni ipotetiche di manipolazione e applicazione del prodotto durante la procedura clinica. [125]

2.8 Sprayability test

Lo sprayability test permette di studiare la capacità di un idrogelo di poter essere di essere erogato attraverso un dispositivo spray. Per la valutazione della distribuzione dello spray, sono state aggiunte alcune gocce di blu di metilene al campione, al fine di facilitarne la visualizzazione sul supporto di raccolta. La formulazione è stata quindi introdotta in un

comune dispositivo spray in plastica (*Figura 8*), avente una capacità di 20 ml, e sottoposta a erogazione fino a ottenere la fuoriuscita del formulato attraverso l'orifizio dell'ugello. Lo spray è stato raccolto su un foglio bianco posto a una distanza fissa di 13 cm dall'orifizio dell'ugello. La distanza è stata mantenuta costante per tutte le determinazioni, al fine di garantire condizioni sperimentali comparabili.

I parametri, come diametro massimo (Dmax), diametro minimo (Dmin) e rapporto di ovalità (Dmax/Dmin), sono stati misurati tramite il software Image J 1.54 g (US National Institute of Health, USA). Le analisi sono state effettuate in triplicato. [115], [129], [130], [131]



Figura 8: l'immagine riporta il dispositivo spray utilizzato per il test di nebulizzabilità (Hanyousheng).

2.9 Preparazione di complessi attivo-ciclodestrine

Per la preparazione dei complessi attivo-ciclodestrine mediante metodo del co-solvente, 3,75 mg di principio attivo sono stati solubilizzati in 100 µl di metanolo. Parallelamente HP-β-CD, in rapporto molare con il principio attivo di 1:3, è stata solubilizzata in 1 ml di acqua milli-Q. La soluzione contenente il principio attivo è stata successivamente aggiunta alla soluzione acquosa di HP-β-CD e la miscela risultante è stata mantenuta sotto agitazione per 24 h a 37°C e 460 rpm, al fine di favorire l'interazione tra il principio attivo e la ciclodestrina. Al termine dell'agitazione, il solvente organico è stato rimosso mediante evaporazione sotto flusso di azoto molecolare, così da favorire la completa eliminazione del metanolo. La polvere ottenuta è stata successivamente risospesa in 1 ml di acqua Milli-Q e la dispersione è stata sottoposta a filtrazione mediante un filtro con porosità di 0,45 µm [111], [112]. La filtrazione è stata effettuata al fine di rimuovere l'eventuale frazione di principio attivo non solubilizzata o eventuali aggregati presenti nella dispersione, mentre la frazione solubilizzata, comprendente i complessi con le ciclodestrine, è stata recuperata nel filtrato.

2.9.1 Efficienza di complessazione

L'efficienza di complessazione è stata determinata mediante metodo diretto, quantificando il principio attivo presente nel filtrato mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis, secondo la seguente equazione:

$$\text{Efficienza di complessazione\%} = \frac{concentrazione\ sperimentale}{concentrazione\ teorica} * 100$$

dove concentrazione sperimentale rappresenta la quantità di principio attivo determinata nel filtrato e concentrazione teorica la quantità di principio attivo inizialmente utilizzata nella preparazione del complesso. A tal fine, un'aliquota di 20 µl del filtrato è stata opportunamente diluita in 2 ml di metanolo e trasferita in una cuvetta da 2 ml per la determinazione dell'assorbanza mediante spettrofotometro UV-Vis alla lunghezza d'onda di 240 nm. La concentrazione di principio attivo presente nel campione analizzato è stata ricavata dall'equazione della retta di calibrazione.

Per realizzare la retta sono state ottenute diluizioni progressive della soluzione madre di attivo, ovvero 4 mg/ml in metanolo per ottenere un intervallo di concentrazioni da 40 µg/ml a 4 µg/ml (con R^2=0,99). Le analisi allo spettrofotometro sono state realizzate utilizzando lo strumento FLUOstar (Omega, BMG - Lab Tech, *Figura 9*).

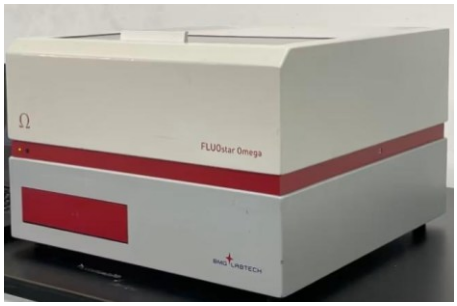


Figura 9: Spettrofotometro FLUOstar Omega (www.labx.com).

Lo spettrofotometro è uno strumento in grado di misurare la concentrazione di un analita a partire dall'intensità della luce assorbita ad una certa lunghezza d'onda. Una sorgente luminosa emette un fascio di luce policromatica che passa per un monocromatore che ne seleziona una specifica lunghezza d'onda. Il fascio attraversa il campione in esame che è contenuto in una apposita cuvetta in quarzo trasparente alla radiazione luminosa. Quello che si realizza è un assorbimento ovvero una transizione elettronica in cui gli elettroni di legame delle molecole di attivo passeranno da uno stato fondamentale ad uno eccitato. La componente della radiazione luminosa che non è stata assorbita è captata da un rilevatore costituito da un fotodiodo che ne misura l'intensità.

L’assorbanza è definita come il logaritmo decimale del rapporto tra l'intensità della luce incidente sul campione (I_0) e quella della luce trasmessa dal campione.
La concentrazione molare dell’analita (C) presente in soluzione è ottenibile a partire dall’equazione di Lambert-Beer che la correla all’assorbanza (A) e al cammino ottico della cuvetta (b): $A = b*\varepsilon*C$
dove ε (epsilon) è l'assorbività molare o coefficiente di estinzione molare e dipende dalla natura chimica della molecola, dalla lunghezza d'onda utilizzata e dal solvente.
Responsabili dell’assorbimento sono i gruppi cromofori presenti nella molecola da analizzare. Un cromoforo è generalmente un sistema insaturo in cui si verificano le transizioni elettroniche responsabili dell’assorbimento, ovvero $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$.
La coniugazione di un cromoforo si verifica quando due o più sistemi insaturi (es. doppi legami alternati, anelli aromatici) sono adiacenti. Questa espande gli orbitali permettendo agli elettroni di delocalizzarsi su più atomi. Nel caso dell’attivo principio attivo, i cromofori sono rappresentati da un anello fenilico fluoro sostituito e un anello pirimidinico, coniugato ad un doppio legame olefinico di una catena alifatica, e coniugato con un gruppo metansolfonico. La ricchezza elettronica di questi analiti consente di ampliare lo spazio orbitalico e ottimizzare la delocalizzazione elettronica.
I solventi utilizzati per le analisi spettrofotometriche sono caratterizzati da un cut-off ovvero una lunghezza d’onda minima sotto la quale non possono essere utilizzati perché assorbono troppo. Il solvente che è stato utilizzato per le analisi spettrofotometriche è stato il metanolo, che ha cut-off a 205 nm. Poiché l’acqua, presente in tracce, ha cut-off di 190 nm e dato che le analisi sono state realizzate a 240 nm, possiamo concludere che non ci sono stati problemi di interferenza nell’assorbimento da parte del solvente.

2.10 Preparazione di SLNs mediante tecnica dell’omogeneizzazione a caldo

Mediante la tecnica dell’omogeneizzazione a caldo sono state preparate sia SLN bianche, prive di principio attivo, sia SLN caricate con principio attivo. Per la preparazione della fase lipidica, sono stati fusi 112,5 mg di burro di cacao a 40°C. Nel caso delle SLN caricate, 10 mg di principio attivo sono stati aggiunti al burro di cacao fuso e miscelati fino a ottenere una fase lipidica omogenea. Parallelamente, la fase acquosa è stata preparata solubilizzando 60 mg di Tween 80 in 5 ml di acqua Milli-Q, ottenendo una concentrazione finale di 12 mg/ml. La fase acquosa è stata successivamente portata alla temperatura di 40 °C. La fase acquosa preriscaldata è stata quindi aggiunta gradualmente alla fase lipidica fusa mediante

una pipetta in plastica, mantenendo la dispersione sotto omogenizzazione mediante Ultra-Turrax a 25.000 rpm per 5 min. Successivamente, alla dispersione ottenuta sono stati aggiunti 5 ml di acqua Milli-Q precedentemente raffreddata a 4 °C. La miscela è stata quindi posta in freezer per 5 min. La dispersione è stata infine sottoposta a ultrasonicazione a 37 kHz per 10 min, mantenendo il campione immerso in un bagno di ghiaccio per limitare il riscaldamento associato al processo di sonicazione. [119], [132]

Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista dimensionale, come descritto nel paragrafo 2.10.2. Successivamente sono state sottoposte a processo di liofilizzazione e a tal fine è stato aggiunto il trealosio come crioprotettore, utilizzando un rapporto in massa SLN-trealosio pari a 1:2. Le dispersioni di SLN sono state preliminarmente congelate a −80 °C per 24 h e infine sublimate utilizzando un sublimatore da banco Heto DRYWINNER (Analitica De Mori, Milan, I).

2.10.1 Efficienza di incapsulamento

L'efficienza di incapsulamento (EE%) è stata valutata mediante metodo indiretto. A tal fine, la dispersione di SLN è stata sottoposta a filtrazione mediante un filtro con porosità di 0,025 µm. In queste condizioni, le nanoparticelle, aventi dimensioni superiori alla porosità del filtro, vengono trattenute, mentre la frazione di principio attivo libero e molecolarmente disciolto attraversa il filtro e viene raccolta nel filtrato. La quantità di principio attivo presente nel filtrato è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis. Al valore di assorbanza ottenuto è stato sottratto il contributo di assorbanza attribuibile alle SLN bianche, preparate in assenza di principio attivo. La quantità di principio attivo libero è stata quindi determinata mediante la relativa curva di calibrazione e l'efficienza di incapsulamento è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$EE\% = \frac{concentrazione\ teorica - concentrazione\ sperimentale}{concentrazione\ teorica} * 100$$

A tal fine, un'aliquota di 10 µl del filtrato è stata opportunamente diluita in 1 ml di metanolo e trasferita in una cuvetta da 1 ml per la determinazione dell'assorbanza mediante spettrofotometro UV-Vis alla lunghezza d'onda di 240 nm. La concentrazione di principio attivo presente nel campione analizzato è stata ricavata dall'equazione della retta di calibrazione, con R^2=0,98.

Per realizzare la retta sono state ottenute diluizioni progressive della soluzione madre di attivo, ovvero 4 mg/ml in metanolo per ottenere un intervallo di concentrazioni da 40 µg/ml a 4 µg/ml.

2.10.2 DLS (Dynamic Light Scattering) ed (ELS) Electrophoretic Light Scattering

Il DLS è uno spettrometro spettrofotonico a correlazione fotonica, uno strumento di analisi quantitativa di tipo non distruttivo. Permette di analizzare dimensione e distribuzione dimensionale delle particelle disperse tramite valori di PSD (particle size distribution), PDI (polydispersity index) e HD (mean hydrodinamic diameter).

L'indice di polidispersione (PDI) è un valore adimensionale che quantifica la larghezza della distribuzione dimensionale e permette di calcolare quante sottopopolazioni dimensionali ci sono all'interno di un campione

In generale, valori di PDI inferiori a 0,25 sono indicativi di una distribuzione relativamente stretta, mentre valori compresi indicativamente tra 0,25 e 0,60 indicano una distribuzione più ampia. Valori superiori a 0,60 sono generalmente associati a sistemi altamente polidispersi, nei quali la distribuzione dimensionale risulta particolarmente eterogenea.

Questo sistema misura in maniera indiretta il diametro idrodinamico medio perché lo calcola attraverso il moto browniano delle particelle: più sono piccole le particelle, più veloce sarà il loro moto perché risentono maggiormente della collisione con le molecole di solvente. La dispersione con le particelle viene inserita in una cuvetta, attraverso cui passerà un raggio di luce monocromatico. L'intensità della luce diffusa è captata da un detector e le fluttuazioni del segnale nel tempo dipendono dalla dimensione particellare: le più grandi daranno fluttuazione del segnale lento. L'equazione che permette di calcolare il diametro idrodinamico (d_H) a partire dal coefficiente di diffusione (D), la viscosità (η), la temperatura (T) è l'equazione di Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

dove k è la costante di Bolzmann e corrisponde a $1{,}380649 \times 10^{-23}$ J/K.

Infine, il DLS permette di studiare il coefficiente di correlazione, la cui velocità di decadimento è maggiore per particelle di piccole dimensioni, che diffondono veloci e danno fluttuazione rapida del segnale. L'idoneità delle formulazioni di nanovettori per una particolare via di somministrazione del farmaco dipende, tra gli altri parametri, dal diametro medio, dal PDI e dalla stabilità dimensionale. Il controllo e la validazione di questi parametri tramite DLS sono di fondamentale importanza per l'efficace applicazione clinica delle formulazioni di nanovettori. [133]

L'analisi è stata eseguita eseguita ponendo 1 ml, all'interno di un'apposita cuvetta in plastica. Quest'ultima viene tappata e posizionata nell'alloggiamento dedicato all'interno

dello strumento; per ciascun campione sono state eseguite tre repliche di analisi, in termini di Diametro Idrodinamico medio ed Indice di Polidispersione. Sono state inoltre confrontate le caratteristiche delle SLN tal quali con quelle delle SLN risospese dopo il processo di liofilizzazione, al fine di valutare l'eventuale influenza della liofilizzazione sulle dimensioni e sull'omogeneità della distribuzione dimensionale delle nanoparticelle.
Tra le tecniche di caratterizzazione utilizzate in questo studio, rientra l'analisi della carica superficiale delle particelle tramite diffusione elettroforetica della luce (ELS). La cuvetta dell'ELS contenente il campione in esame presenta due elettrodi attraverso i quali viene fatto passare un fascio laser. Quando viene applicato un campo elettrico le particelle si muovono e diffondono la luce laser, la cui variazione di frequenza è captata dallo strumento, come variazione direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica particellare. Attraverso la funzione di Henry (f(ka)) lo strumento converte automaticamente la mobilità elettroforetica (U_e) in potenziale zeta (ζ), considerando anche la viscosità (η) e la costante dielettrica (ε), per mezzo della seguente equazione:

$$Ue = \frac{2 * \varepsilon * \zeta * f(ka)}{3 * \eta}$$

Il potenziale zeta viene misurato attraverso l'elettroforesi e la migrazione particellare verso l'elettrodo opposto alla carica superficiale delle particelle stesse, tenendo conto della viscosità del mezzo, costante dielettrica del solvente e raggio idrodinamico della particella. Un elevato potenziale Zeta (in valore assoluto, solitamente superiore a ± 30 mV) indica alta carica superficiale, bassa aggregazione, forze repulsive elevate e quindi un'alta stabilità della dispersione. Valori prossimi allo zero indicano invece un'alta probabilità di flocculazione o coagulazione.
Analogamente a quanto effettuato per l'analisi dimensionale, all'interno di un'apposita cuvetta, è stato introdotto un 1 ml della sospensione di SLN e sono state eseguite tre repliche di analisi per ogni campione



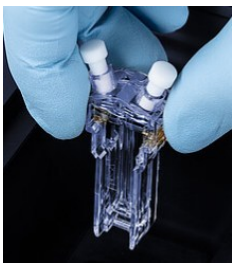


Figure 10, 11, 12: a sinistra possiamo vedere il Litesizer 500, Antoon Paar, Austria (www.labwrench.com), in centro la cuvetta per DLS mentre a sinistra la cuvetta utilizzata per l'analisi ELS (www.anton-paar.com).

2.10.3 NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)

L'NTA è una tecnica che permette di studiare dimensione, distribuzione dimensionale e concentrazione delle nanoparticelle (n° particelle/ml). Si tratta di una tecnica sensibile alla presenza di popolazioni particellari minoritarie che non si vedono in DLS. Anche l'NTA, come la DLS, funziona con l'equazione di Stokes-Enstein.

Tra i parametri relativi alla distribuzione dimensionale ci sono: D_{10}, D_{50} e D_{90}, il diametro al di sotto del quale si trova rispettivamente il 10%, il 50% e il 90% delle nanoparticelle. Lo span è invece una grandezza adimensionale che descrive l'ampiezza della distribuzione, si ricava dalla seguente equazione:

$$span = \frac{(\mathrm{D90} - \mathrm{D10})}{\mathrm{D50}}$$

Un sistema monodisperso presenta valori bassi di span (<1), mentre un sistema polidisperso ha valori elevati di span (>1).

La tecnica NTA utilizza le proprietà della luce diffusa (light scattering) dalle particelle in sospensione e del movimento browniano per ottenere la distribuzione dimensionale e la concentrazione dei campioni in sospensione liquida.

L'analisi è stata effettuata mediante uno strumento NanoSight Pro (Alfatest). I campioni sono stati opportunamente diluiti in acqua, al fine di ottenere una concentrazione di particelle idonea all'analisi NTA. Il campione diluito è stato introdotto nella cella di analisi dello strumento e sottoposto all'acquisizione video delle particelle in sospensione. I video ottenuti sono stati successivamente analizzati mediante il software associato allo strumento, che ha permesso di determinare per ciascun campione la concentrazione particellare. Il campione è stato diluito in proporzione 1:100 in acqua milli-Q, prima di effettuare l'analisi.



Figura 13: Nanoparticle Tracking Analysis Nanosight Pro Nanosight Pro (Malvern Panalytical).

2.11 Preparazione degli idrogeli caricati con l'attivo

L'idrogel è stato preparato mediante aggiunta sequenziale di NaCl (0,9% p/v), acido ialuronico (HA, 0,45% p/v) e metilcellulosa (MC, 8% p/v). Dopo aver preparato l'idrogelo miscelando nell'ordine: NaCl 0,9 % p/v, acido ialuronico 0,45% p/v e metilcellulosa 8% p/v, è stato introdotto il liofilizzato in quantità necessaria per ottenere una concentrazione di attivo pari a 3,75 mg/ml. Successivamente, sono stati incorporati i sistemi di veicolazione del principio attivo, precedentemente liofilizzati, in quantità tali da ottenere una concentrazione finale di attivo pari a 3,75 mg/ml. I liofilizzati sono stati dispersi nell'idrogel mediante agitazione magnetica fino a ottenere una distribuzione omogenea.

In entrambi i casi, le quantità di liofilizzato sono state calcolate in modo da ottenere la medesima concentrazione finale di principio attivo, consentendo il confronto tra le due strategie di veicolazione.

	MC – hHA / CD	***MC – hHA / SLNs***
MC	*8% p/v*	*8% p/v*
HA	*0,45% p/v*	*0,45% p/v*
NaCl	*0,9% p/v*	*0,9% p/v*
Principio attivo	0,375% p/p	0,375% p/p

Tabella 3: composizione quali-quantitativa degli idrogeli sviluppati.

2.12 Celle di Franz

Le celle di Franz costituiscono un metodo efficace per lo studio del passaggio di principi attivi attraverso membrane rappresentative dei tessuti umani. Gli elementi principali che costituiscono lo strumento sono: una cella donatore, una membrana artificiale come una membrana da dialisi in cellulosa, una cella accettore contenente il mezzo liquido simulante l'ambiente corporeo interno (es: PBS, tampone fosfato salino). Il sistema è stato termostatato a 37°C. Per lo studio sono state sottoposte a valutazione la formulazione di idrogel contenente il principio attivo sotto forma di SLN e la corrispondente formulazione contenente il principio attivo sotto forma di complesso con ciclodestrina. In entrambi i casi, il principio attivo è stato incorporato nell'idrogel alla concentrazione finale di 0,375% p/p. Per ciascuna formulazione, 100 mg di idrogel sono stati posti nel compartimento donatore della cella di Franz, a diretto contatto con la membrana da dialisi (cut off: 12-14000 Da). Il compartimento accettore è stato riempito con PBS, utilizzato come mezzo di rilascio, e mantenuto a 37 °C per tutta la durata dell'esperimento.

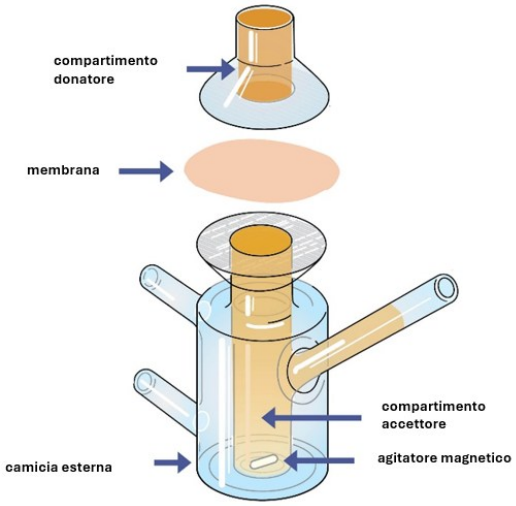


Figura 14: l'immagine descrive la struttura delle celle di Franz (www.lab4life.com) - immagine personalizzata.

2.12.1 Studio di rilascio del principio attivo

Le celle di Franz hanno permesso di studiare come l'attivo, veicolato con ciclodestrine o SLNs, può essere rilasciato passando attraverso le membrane biologiche. A intervalli di tempo prestabiliti sono stati effettuati prelievi di 500 µL di mezzo dal compartimento accettore. Dopo ciascun prelievo, il volume di mezzo rimosso è stato immediatamente reintegrato con un uguale volume di PBS fresco, mantenuto alla temperatura di 37 °C, al fine di mantenere costante il volume del compartimento accettore. I campioni prelevati

sono stati opportunamente analizzati mediante spettrofotometria UV-Vis per la determinazione quantitativa del principio attivo rilasciato, dopo diluizione 1:1 con metanolo. La quantità di principio attivo presente nei campioni è stata calcolata mediante la relativa curva di calibrazione, tenendo conto dei prelievi effettuati e dei successivi reintegri del mezzo di rilascio, al fine di determinare la quantità cumulativa di principio attivo rilasciata nel tempo.

2.12.2 Test di degradazione

Le celle di Franz sono state utilizzate anche per studiare la degradazione dell'idrogelo caricato con l'attivo, veicolato sia in SLNs che in complessi con le ciclodestrine, posto in membrane da dialisi a contatto con PBS a 37°C.

Considerando W_i il peso iniziale della formulazione e W_f il peso finale, la percentuale di massa perduta nel tempo si calcola con la seguente equazione:

$$\frac{Wi-Wf}{Wi} * 100$$

La percentuale di massa residua si calcola invece come sua complementare. Per questo test sono state effettuate le pesate a vari tempi: 24 h, 36 h e 48 h.

IV. RISULTATI

1. Sviluppo e caratterizzazione degli idrogeli termosensibili

1.1 DoE - Design of Experiment

Nell' istogramma riportato in *Figura 15*, si descrivono gli effetti che ciascun coefficiente fattoriale ha avuto sulla risposta sperimentale, con un intervallo di confidenza del 99,5%. Le tre colonne sono rappresentative delle tre variabili del disegno razionale: peso molecolare di MC, concentrazione di MC e concentrazione di HA.

La concentrazione di HA mostra un effetto negativo sulla risposta; tuttavia, tale contributo non risulta statisticamente significativo. Al contrario, il peso molecolare e la concentrazione della MC esercitano un effetto significativo su $\Delta\eta/\eta$. In particolare, la concentrazione di MC presenta un effetto positivo: all'aumentare della concentrazione aumenta il valore della risposta. Il peso molecolare di MC, invece, mostra un effetto negativo, indicando che l'impiego di MC a più elevato peso molecolare determina una riduzione di $\Delta\eta/\eta$. Il modello ha dunque un elevato potere predittivo, come evidenziato da un r^2 di 0,897.

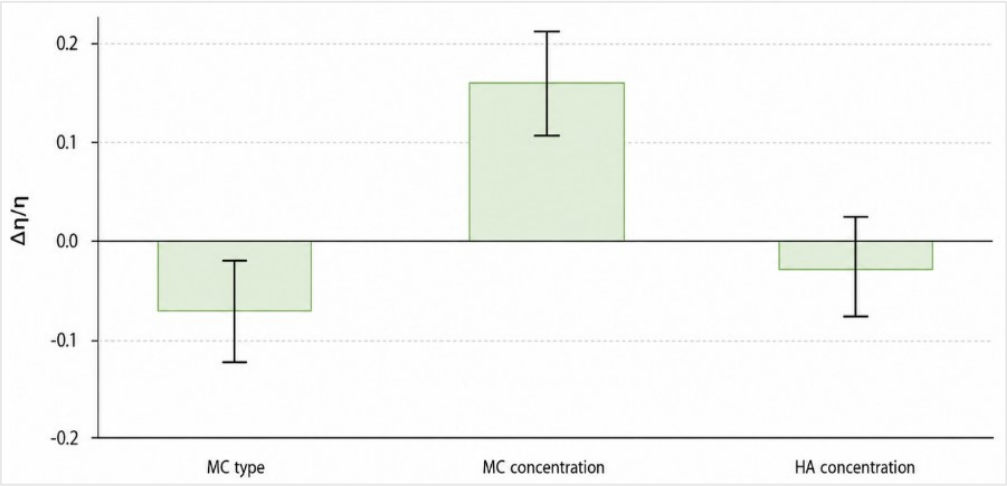


Figura 15: l'istogramma riporta il contributo dei tre fattori nel disegno sperimentale DoE.

Le superfici di risposta riportate in *Figura 16* consentono di visualizzare l'effetto combinato dei fattori considerati sulla risposta sperimentale. Come mostrato in *Figura 16a*, $\Delta\eta/\eta$ aumenta passando da MC ad alto peso molecolare a MC a basso peso molecolare e all'aumentare della concentrazione del polimero. La regione caratterizzata dai valori più elevati della risposta corrisponde pertanto all'impiego di MC a basso peso molecolare e ad

alta concentrazione. La *Figura 16b* mostra invece l'effetto combinato delle concentrazioni di MC e HA. La risposta risulta principalmente influenzata dalla concentrazione di MC, mentre le variazioni della concentrazione di HA nell'intervallo sperimentale considerato producono un effetto non statisticamente significativo. I valori più elevati di Δη/η sono quindi associati alle maggiori concentrazioni di MC, indipendentemente dalla concentrazione di HA considerata.

a) ***b)***

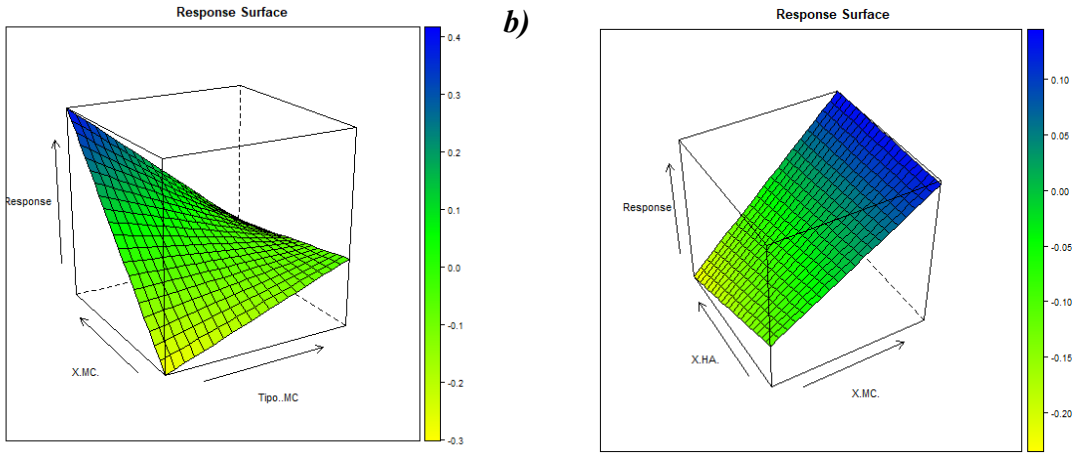


Figura 16: a) disegno tridimensionale descrittivo dei fattori: peso molecolare e concentrazione di MC; b) disegno tridimensionale descrittivo dei fattori: concentrazione di MC e HA.

La *Figura 17* riporta il contour plot relativo all'effetto delle concentrazioni di MC e HA sulla risposta Δη/η. Al fine di verificare la capacità predittiva del modello DoE, è stata preparata una formulazione corrispondente a un punto intermedio del dominio sperimentale, contenente MC a basso peso molecolare al 4,625% p/v e HA allo 0,275% p/v. Le misure reologiche sono state eseguite a 25°C e 37°C in triplicato. Il valore sperimentale Δη/η ottenuto per la formulazione di validazione è risultato pari a 0,191 ± 0,072. Tale valore rientra nell'intervallo di predizione del modello compreso tra -0,127 e 0,241, calcolato con un intervallo di confidenza del 99,95%.

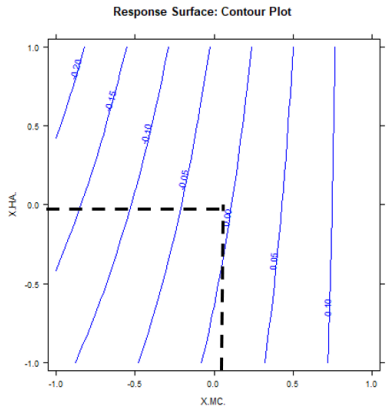


Figura 17: grafico di contorno che illustra l'effetto delle concentrazioni di MC e HA sulla variabile di risposta.

Nella *Figura 18* si riportano Δη/η per ciascuna delle otto formulazioni incluse nel disegno sperimentale.

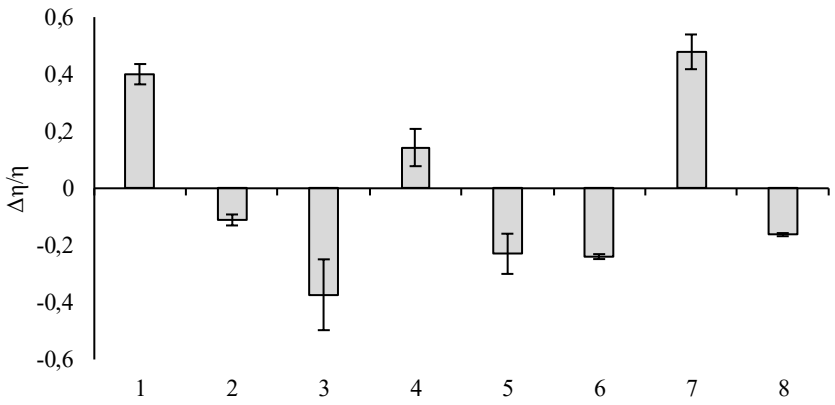


Figura 18: in questo istogramma si riportano i valori Δη/η per ciascuna delle otto formulazioni oggetto di studio. con ANOVA unidirezionale. Anova one-way; Scheffé (P < 0,05): 1 vs 2, 3, 4, 5, 6, 8; 2 vs 3, 4, 7; 3 vs 4, 7; 4 vs 5, 6, 7, 8; 5 vs 7; 6 vs 7; 7 vs 8.

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via, seguita dal test post hoc di Scheffé per i confronti multipli ($p < 0,05$). L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative tra diverse formulazioni. In particolare, le formulazioni n°1 e n°7, caratterizzate dai valori più elevati di Δη/η, non hanno differenze statisticamente significative tra loro. Sulla base delle loro proprietà reologiche, entrambe sono state quindi selezionate per le successive fasi di caratterizzazione. Le formulazioni selezionate sono le seguenti: MC 8% p/v + HA 0,10% p/v (MC-lHA) e MC 8% p/v + HA 0,45% p/v (MC-hHA).

1.2 Caratterizzazione reologica

1.2.1 Test di viscosità

La *Figura 19* riporta i valori di viscosità delle formulazioni MC-lHAe MC-hHA misurati a 25 °C e 37 °C a una velocità di taglio (shear rate) di 2,75 s^{-1}. Come si può osservare, la formulazione MC-hHA presenta valori di viscosità superiori rispetto alla formulazione MC-lHA a entrambe le temperature considerate. Poiché le due formulazioni presentano la stessa concentrazione di MC (8% p/v) e differiscono per la concentrazione di HA, pari rispettivamente allo 0,10% e allo 0,45% p/v, la maggiore viscosità della formulazione MC-hHA può essere associata alla maggiore concentrazione di HA. Inoltre, per entrambe le formulazioni si osserva un aumento della viscosità passando da 25 °C a 37 °C, evidenziando una dipendenza del comportamento reologico dalla temperatura.

a)

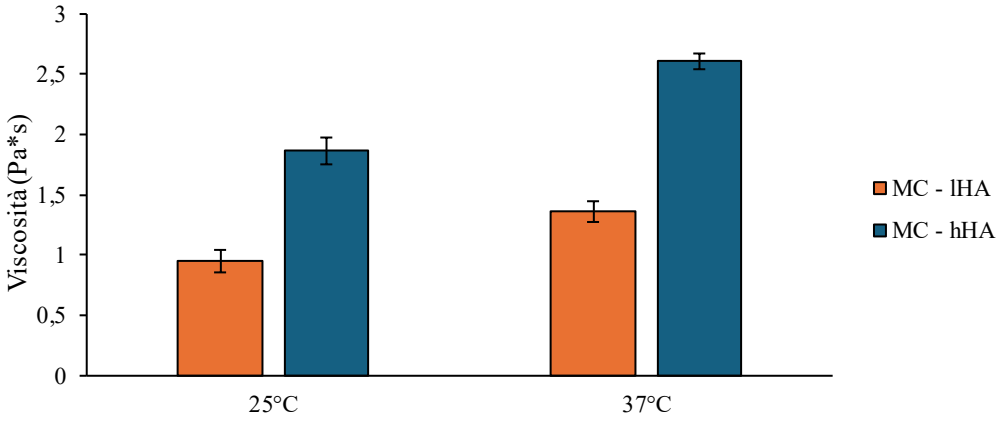


Figura 19: Istogramma delle viscosità a 25°C e 37°C (Shear rate di 2,75 s^{-1}).

Il test Anova (one-way; Tukey's MRT; Pvalue < 0,05) e il test F Anova (one way; k=2) per l'analisi dei dati conferma che, non ci sono variazioni significative di viscosità per formulazioni: MC – lHA a 25°C Vs 37°C e MC – hHA a 25°C Vs a 37°C. L'analisi statistica dimostra che ci sono significative differenze tra le formulazioni MC – lHA e MC – hHA, sia a 25°C che a 37°C.

1.2.2 Stress Sweep test

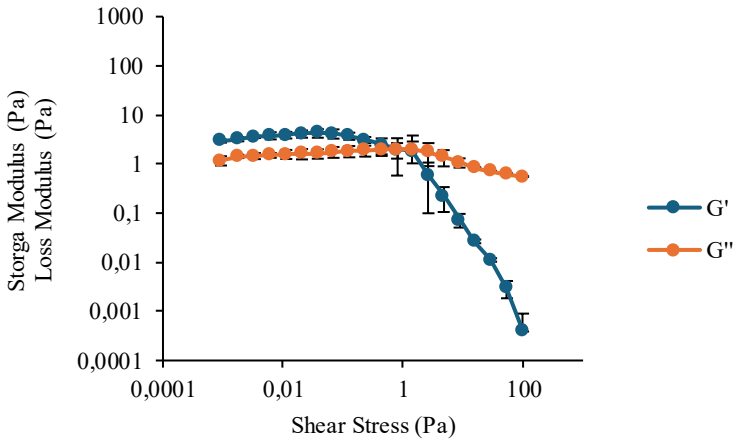
La *Figura 20* riporta i profili dello storage modulus (G′) e del loss modulus (G″) delle formulazioni MC - lHA ed MC - hHA, valutate mediante stress sweep a 25 °C e 37 °C. La frequenza è stata mantenuta costante a 0,1 Hz, mentre lo shear stress è stato variato nell'intervallo compreso tra 0,001 e 100 Pa. Tale analisi consente di valutare la risposta

viscoelastica dei sistemi all'aumentare dello stress applicato e di individuare la regione di viscoelasticità lineare (LVR).

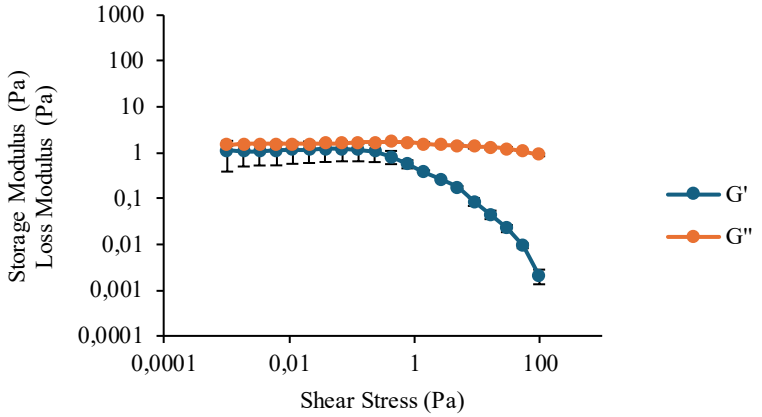
A 25 °C *(Figure 20a e 20b),* entrambe le formulazioni mostrano una regione iniziale in cui i moduli rimangono relativamente costanti. Nella formulazione MC - lHA (*Figura 20a*), G′ risulta inizialmente superiore a G″; all'aumentare dello stress, G′ diminuisce marcatamente fino a diventare inferiore a G″, indicando la progressiva perdita della struttura del sistema. Un comportamento analogo è osservabile per la formulazione MC - hHA (*Figura 20b*), nella quale G′ e G″ presentano valori più ravvicinati nella regione iniziale, mentre a stress più elevati G′ diminuisce progressivamente rispetto a G″. Nel complesso, a 25 °C entrambe le formulazioni mostrano quindi una regione viscoelastica lineare a bassi valori di stress, seguita da una progressiva destrutturazione all'aumentare della sollecitazione applicata.

A 37 °C *(Figure 20c e 20d*), entrambe le formulazioni presentano invece valori di G′ superiori a quelli di G″ nell'intero intervallo di stress analizzato, evidenziando una predominanza della componente elastica su quella viscosa. Tale comportamento è indicativo della formazione di una struttura più organizzata e con caratteristiche prevalentemente gel-like alla temperatura fisiologica.

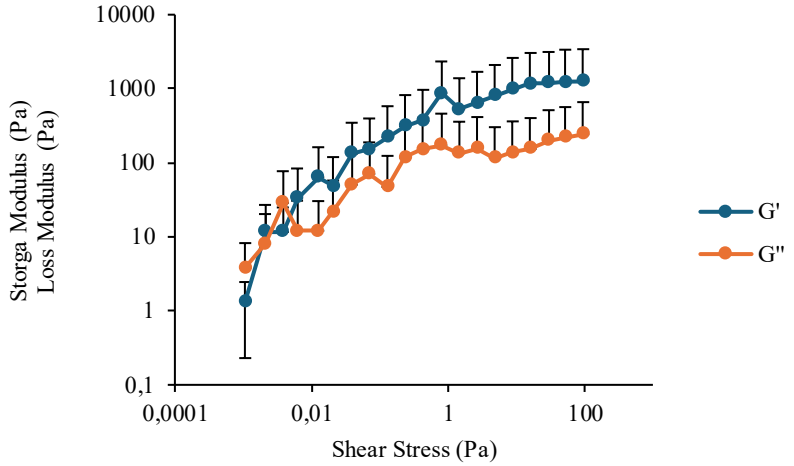
a)



b)



c)



d)

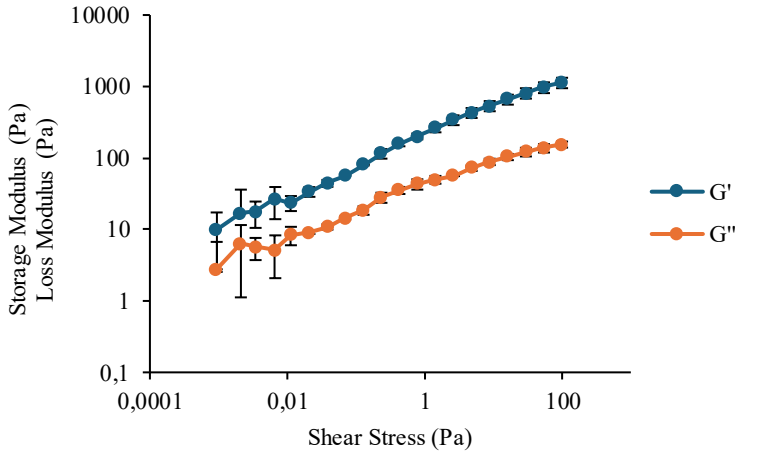
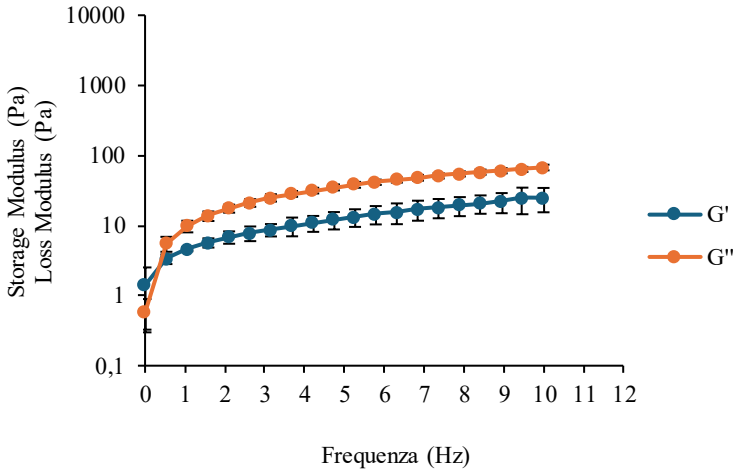


Figura 20: Stress Sweep test delle formulazioni: a) MC - lHA a 25°C; b) MC - hHA a 25°C; c) MC - lHA a 37°C; d) MC - hHA a 37°C. La frequenza è stata fissata a 0,1 Hz, mentre lo stress è stato variato nell'intervallo compreso tra 0,001 e 100 Pa. Anova one-way; Scheffé (P < 0,05): MC – lHA a 25°C Vs 37°C e MC – hHA a 25°C Vs 37°C.

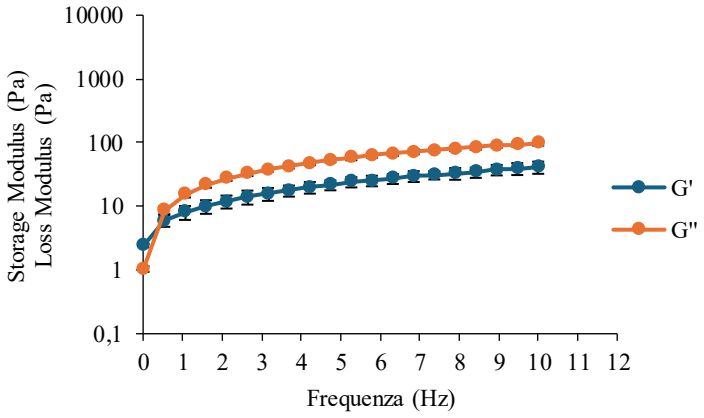
1.2.3 Oscillation Test

La *Figura 21* riporta l'andamento dello storage modulus (G′) e del loss modulus (G″) in funzione della frequenza, a 25 °C e 37 °C. Le misure sono state condotte applicando uno stress costante pari a 0,05 Pa, selezionato all'interno della regione di viscoelasticità lineare precedentemente determinata, e variando la frequenza nell'intervallo compreso tra 0,1 e 10 Hz. Come mostrato nelle *Figure 21a* e *21b*, a 25 °C entrambe le formulazioni presentano valori di G″ superiori a quelli di G′ nell'intero intervallo di frequenza analizzato. La predominanza della componente viscosa rispetto a quella elastica indica quindi un comportamento prevalentemente liquido per entrambe le formulazioni. Al contrario, a 37 °C *(Figure 21c e 21d*) si osservano valori di G′ superiori a quelli di G″ nell'intero intervallo di frequenza considerato. La predominanza della componente elastica evidenzia quindi un comportamento prevalentemente solido, indicativo della formazione di una struttura gelificata. Tali risultati confermano il comportamento termosensibile di entrambe le formulazioni, che presentano caratteristiche prevalentemente liquide a 25 °C e acquisiscono un comportamento prevalentemente elastico alla temperatura fisiologica.

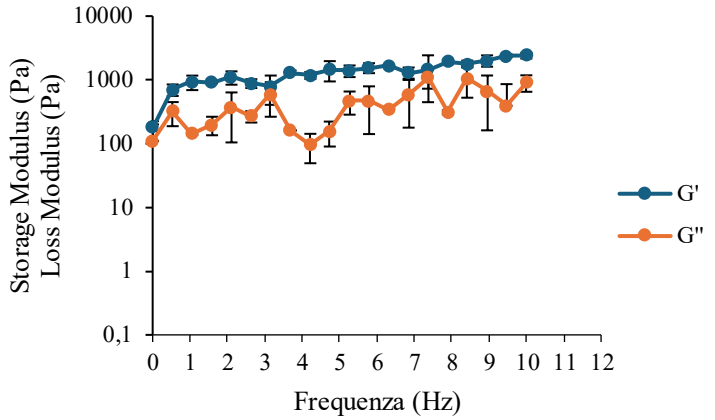
a)



b)



c)



d)

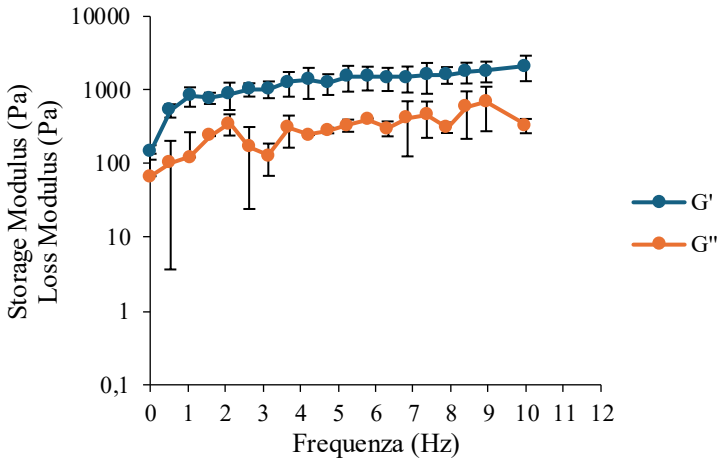


Figura 21: Oscillation test delle formulazioni a) MC - lHA a 25°C; b) MC - hHA a 25°C; c) MC - lHA a 37°C; d) MC - hHA a 37°C. Valore di stress applicato pari a 0,05 Pa e frequenza di oscillazione nell'intervallo compreso tra 0,1 e 10 Hz. Anova one-way; Scheffé (P < 0,05): MC – lHA a 25°C Vs 37°C e MC – hHA a 25°C Vs 37°C.

1.2.4 Rampa di temperatura

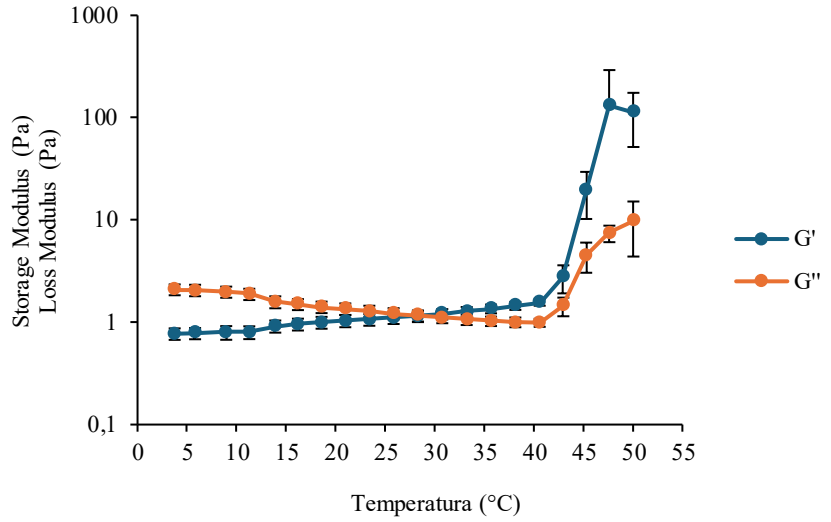
La *Figura 22* riporta l'andamento dello storage modulus (G′) e del loss modulus (G″) in funzione della temperatura. Le analisi sono state condotte applicando uno stress costante pari a 0,05 Pa e aumentando la temperatura nell'intervallo compreso tra 4 °C e 50 °C.

A basse temperature, entrambe le formulazioni presentano valori di G″ superiori a quelli di G′, indicando la predominanza della componente viscosa e, quindi, un comportamento prevalentemente liquido. All'aumentare della temperatura, G′ aumenta progressivamente fino a superare G″, evidenziando la transizione verso un comportamento prevalentemente elastico. La temperatura di gelificazione è stata identificata in corrispondenza del punto di crossover tra i due moduli, ovvero quando G′ = G″. La formulazione MC - lHA presenta

una temperatura di gelificazione pari a 28,5 ± 2,3 °C, mentre per la formulazione MC - lHA il valore risulta pari a 31,5 ± 4,5 °C.

Sebbene l'aumento della concentrazione di HA dallo 0,10% allo 0,45% p/v determini un aumento della temperatura di gelificazione, tale differenza non risulta essere statisticamente significativa.

a)



b)

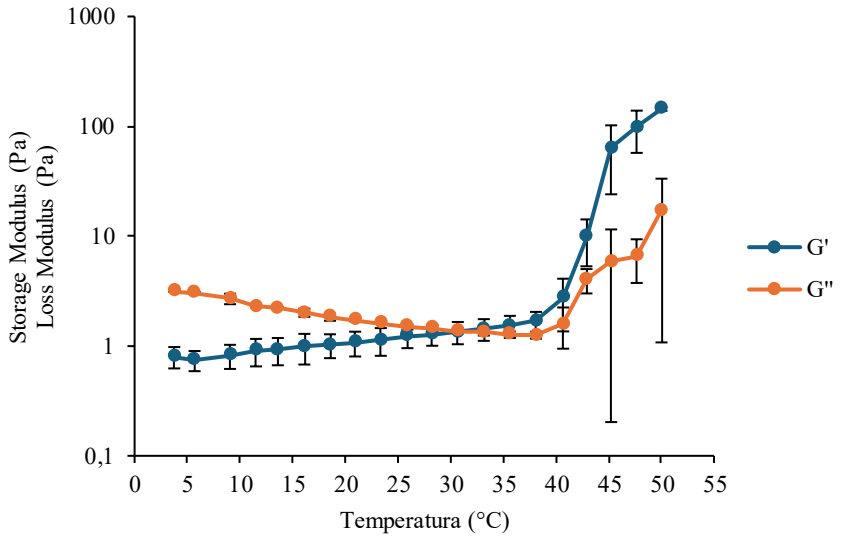


Figura 22: rampa di temperatura della formulazione MC - lHA (a) e MC - hHA (b). Valore di stress applicato pari a 0,05 Pa, intervallo di temperatura 4-50°C.

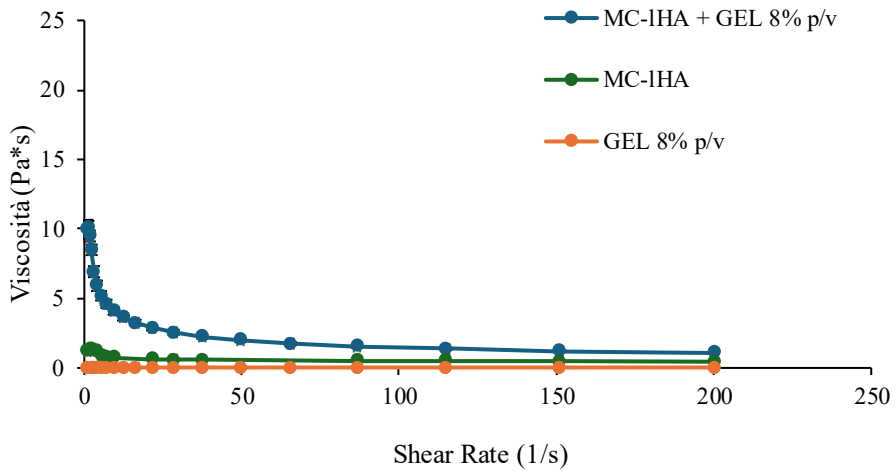
1.2.5 Sinergismo Reologico

La *Figura 23* riporta i profili di viscosità, ottenuti a 37 °C, della gelatina, delle formulazioni MC – lHA e MC – hHA e delle rispettive miscele con gelatina, in funzione dello shear rate. Per entrambe le formulazioni, la miscela con gelatina presenta valori di viscosità superiori rispetto a quelli dei singoli componenti considerati separatamente. Tale incremento risulta particolarmente evidente per la formulazione MC-hHA.

A partire dai valori di viscosità è stato quindi calcolato il parametro di sinergismo reologico ($\Delta\eta$), secondo la seguente equazione: $\Delta\eta = \eta_{gelatina+formulazione} - (\eta_{gelatina} + \eta_{formulazione})$.

Valori positivi di $\Delta\eta$ indicano la presenza di un'interazione sinergica tra la formulazione e il substrato proteico.

a)



b)

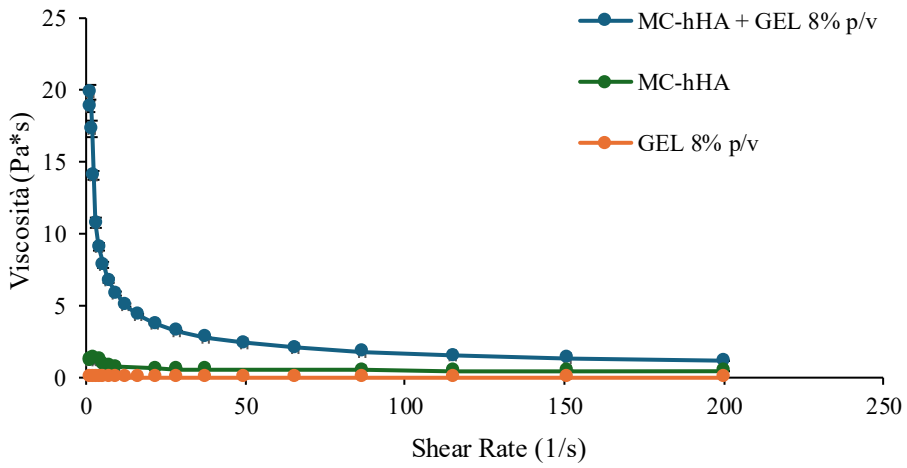


Figura 23: Curve di viscosità ottenute con lo studio sul sinergismo reologico.

La *Figura 24* riporta i valori di Δη calcolati per le due formulazioni a shear rate pari a 1, 2,45 e 10 s^{-1}. A tutti i valori di shear rate considerati, la formulazione MC - hHA presenta valori di Δη superiori, indicando una maggiore interazione reologica con il substrato di gelatina (GEL 8% p/v). Ciò potrebbe essere correlato alla maggiore concentrazione di HA, che aumenta la disponibilità di gruppi funzionali, in particolare carbossilici e ossidrilici, potenzialmente coinvolti nella formazione di interazioni non covalenti, quali legami a idrogeno ed interazioni elettrostatiche, con i gruppi funzionali presenti nel substrato proteico.

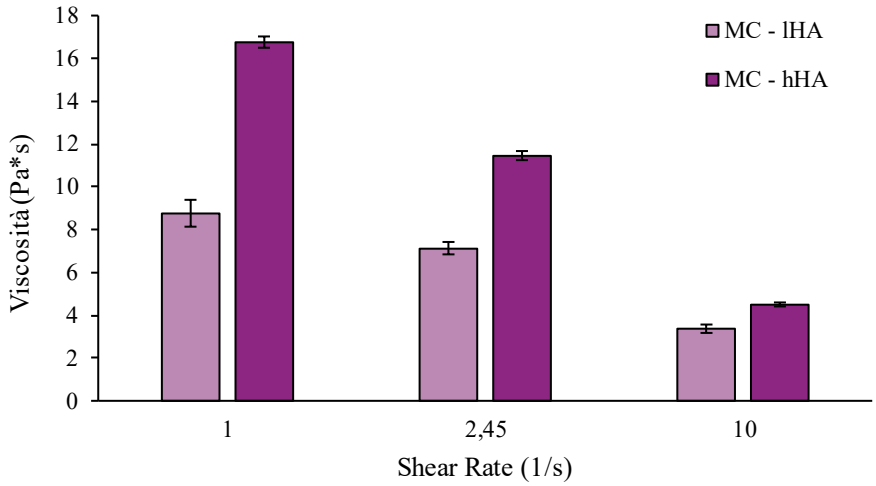


Figura 24: l'istogramma rappresenta il sinergismo reologico delle due formulazioni messe a confronto a valori di shear rate crescenti: 1 – 2,45 – 10 s^{-1}.

1.3 Effetto dei sali (serie di Hofmeister)

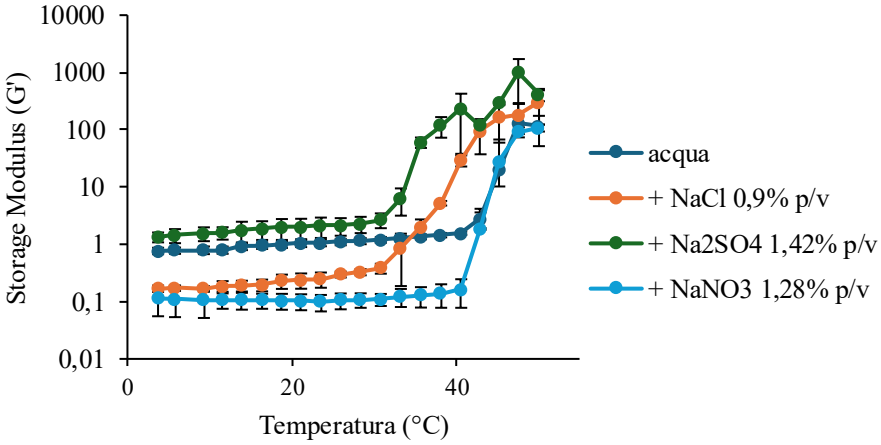
1.3.1 Effetto dei sali sulla temperatura di gelazione

Al fine di ottenere formulazioni isotoniche e quindi idonee all'applicazione come sistemi per la prevenzione delle aderenze post-operatorie, è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di differenti sali sulla temperatura di gelificazione (*Tabella 4* e *Figura 25*). La scelta del tipo di elettrolita rappresenta infatti un parametro rilevante nei sistemi termosensibili, poiché gli ioni possono modificare lo stato di idratazione e le interazioni tra le catene polimeriche, influenzando di conseguenza il processo di gelificazione. In particolare, sono stati selezionati NaCl, Na_2SO_4 e $NaNO_3$, caratterizzati da un differente comportamento secondo la serie di Hofmeister. Gli ioni cosmotropici, maggiormente idratati, tendono a sottrarre molecole d'acqua dalla sfera di idratazione dei polimeri e possono favorire le interazioni tra le catene, mentre gli ioni caotropici tendono a mantenere una maggiore idratazione del sistema, con effetti opposti sulla gelificazione.

	MC - lHA	MC - hHA
Acqua	28,5 ± 2,3	31,5 ± 4,5
+ NaCl 0,9% p/v	31,9 ± 1,7	34,6 ± 0,9
+ Na_2SO_4 1,42% p/v	11,2 ± 2,7	14,1 ± 2,8
+ $NaNO_3$ 1,28% p/v	42,8 ± 3,5	43,6 ± 7,6

Tabella 4: temperature di gelazione per ogni tipologia di formulazione oggetto di studio.

a)



b)

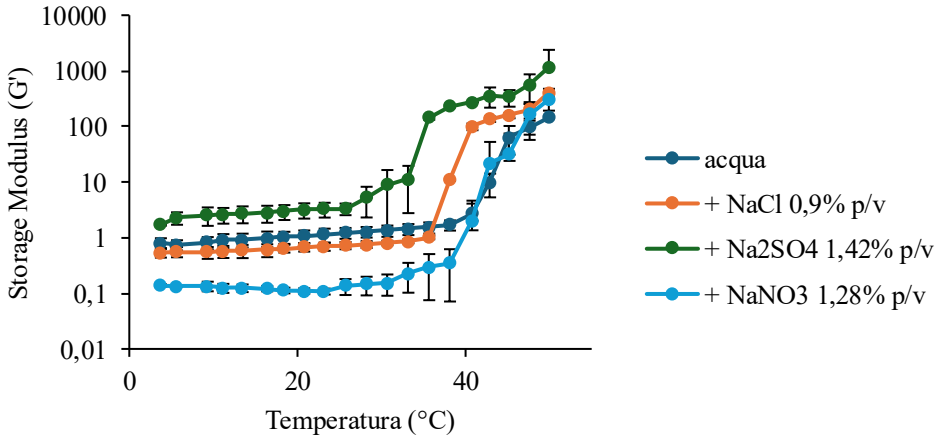


Figura 25: variazione del modulo G' in funzione della presenza di sali nelle formulazioni MC – lHA (a) ed MC- hHA (b).

L'aggiunta di Na_2SO_4 determina una marcata riduzione della temperatura di gelificazione per entrambe le formulazioni, mentre $NaNO_3$ ne determina un considerevole aumento. L'aggiunta di NaCl produce invece una variazione più contenuta, mantenendo la temperatura di gelificazione in un intervallo prossimo alla temperatura fisiologica. Sulla

base di questi risultati, NaCl allo 0,9% p/v è stato selezionato per la prosecuzione dello studio, poiché consente di ottenere una formulazione isotonica mantenendo, allo stesso tempo, proprietà di termogelificazione compatibili con l'applicazione prevista.

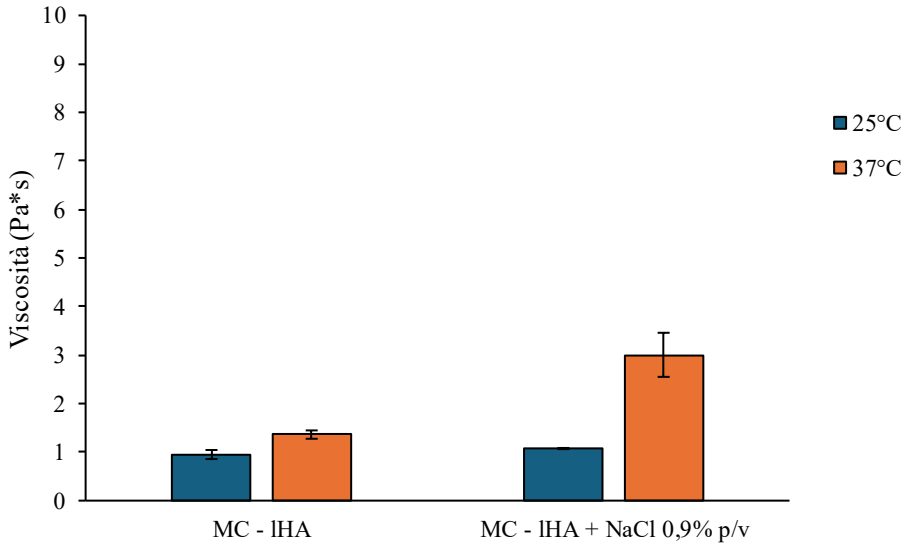
1.3.2 Effetto dei sali sulla viscosità

La *Figura 26* riporta i valori di viscosità delle formulazioni in assenza e in presenza di NaCl allo 0,9% p/v, misurati a 25 °C e 37 °C. Come osservato precedentemente dalle analisi di rampa di temperatura, l'aggiunta di sali influenza il processo di gelificazione delle formulazioni, modificando la temperatura alla quale avviene la transizione sol-gel. Alla luce di questi risultati, è stato quindi valutato anche l'effetto dell'aggiunta di NaCl sulla viscosità delle formulazioni selezionate. Come mostrato in Figura 25, a 25 °C l'aggiunta di NaCl determina variazioni contenute della viscosità di entrambe le formulazioni. Al contrario, a 37 °C si osserva un incremento più marcato, particolarmente evidente per la formulazione MC - hHA, che presenta i valori di viscosità tre volte superiori.

Tali risultati sono coerenti con quanto osservato nelle rampe di temperatura, evidenziando come la presenza del sale possa influenzare non soltanto la temperatura di gelificazione, ma anche le proprietà reologiche delle formulazioni alla temperatura fisiologica.

Nel complesso, l'aggiunta di NaCl allo 0,9% p/v consente di perseguire l'obiettivo di ottenere formulazioni isotoniche, mantenendo un comportamento termosensibile e favorendo un aumento della viscosità a 37 °C, caratteristica potenzialmente utile per la formazione e la permanenza in situ di una barriera gelificata destinata alla prevenzione delle aderenze post-operatorie.

a)



b)

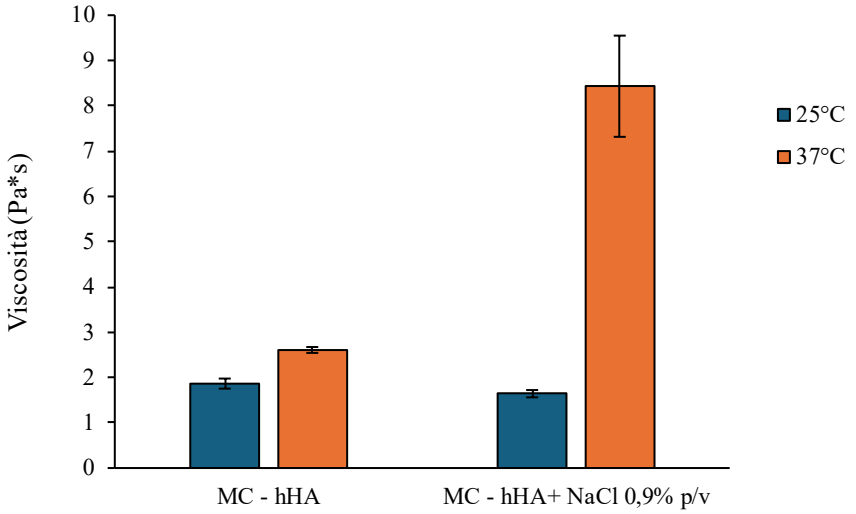


Figura 26: viscosità delle formulazioni MC-lHA e MC-lHA + NaCl 0,9% p/v (a) e viscosità delle formulazioni MC-hHA e MC-hHA + NaCl 0,9% p/v (b). Anova one-way; Scheffé (P < 0,05): MC-lHA Vs MC-lHA + NaCl 0,9% p/v a 37°C; MC-hHA Vs MC-hHA + NaCl 0,9% p/v a 37°C.

1.4 Tilt test

La *Figura 27* riporta i risultati del tilt test condotto sulle formulazioni MC – lHA ed MC – hHA, contenenti NaCl allo 0,9% p/v, a tre differenti temperature: 4 °C, 25 °C e 37 °C. Il test è stato effettuato mediante osservazione del comportamento delle formulazioni in seguito al capovolgimento e all'inclinazione dei contenitori, al fine di valutare qualitativamente la transizione sol-gel.

Come mostrato in *Figura 27*, a 4 °C e 25 °C entrambe le formulazioni presentano un comportamento prevalentemente liquido, evidenziato dalla capacità di scorrere all'interno del contenitore in seguito alla sua inclinazione. Al contrario, a 37 °C si osserva una marcata riduzione della fluidità, con il mantenimento della posizione del campione anche in seguito al capovolgimento del contenitore, indicando l'avvenuta formazione di una struttura gelificata. Tale comportamento dovrebbe favorire la distribuzione della formulazione sulle superfici tissutali durante l'applicazione e la successiva formazione in situ di una barriera gelificata.

a)



b)

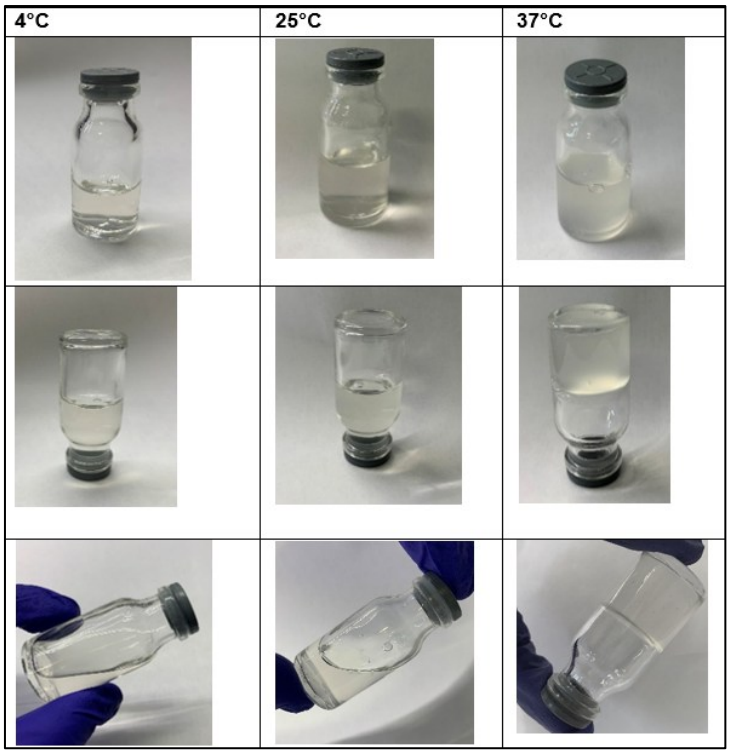
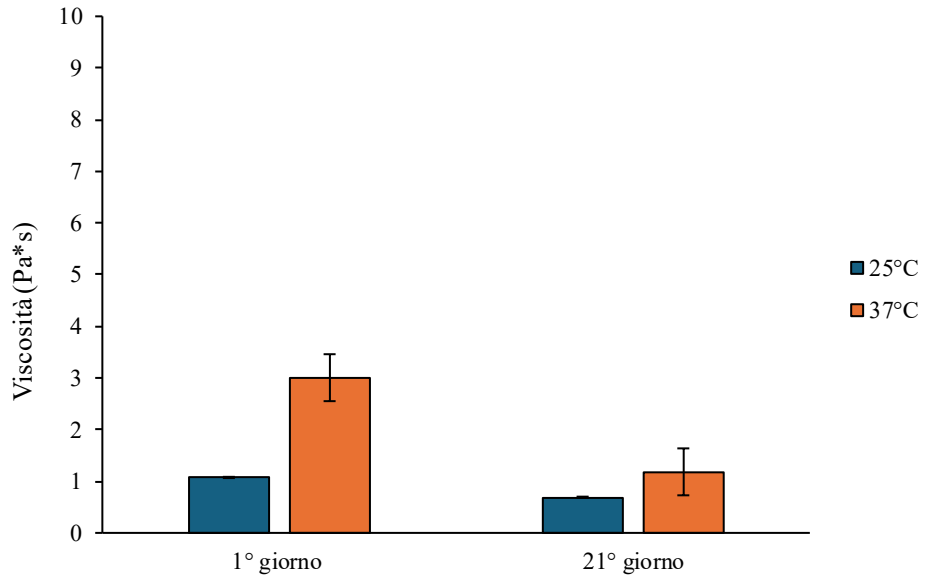


Figura 27: a) Tilt test della formulazione MC - lHA + NaCl 0,9% p/v; b) Tilt test della formulazione MC - hHA + NaCl 0,9% p/v.

1.5 Test di stabilità reologica

La *Figura 28* riporta i valori di viscosità delle formulazioni MC-lHA + NaCl 0,9% p/v ed MC-hHA + NaCl 0,9% p/v, a 25 °C e 37 °C dopo 1 e 21 giorni dalla preparazione, al fine di valutarne la stabilità reologica nel tempo. Come mostrato in *Figura 28a*, la formulazione MC-lHA presenta una riduzione della viscosità dopo 21 giorni, particolarmente evidente a 37 °C. Un andamento analogo, sebbene meno marcato, si osserva per la formulazione MC – hHA (*Figura 28b*), che mantiene valori di viscosità superiori a entrambe le temperature considerate. L'analisi statistica mediante ANOVA a una via, seguita dal test post hoc di Tukey ($p < 0,05$), ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i valori di viscosità della formulazione MC – lHA+ NaCl 0,9% p/v misurati al primo e al ventunesimo giorno a 37°C ma non a 25°C. Mentre non ci sono differenze significative dei valori di viscosità della formulazione MC – hHA+ NaCl 0,9% p/v misurati al primo e al ventunesimo giorno, sia a 25°C che a 37°C.

a)



b)

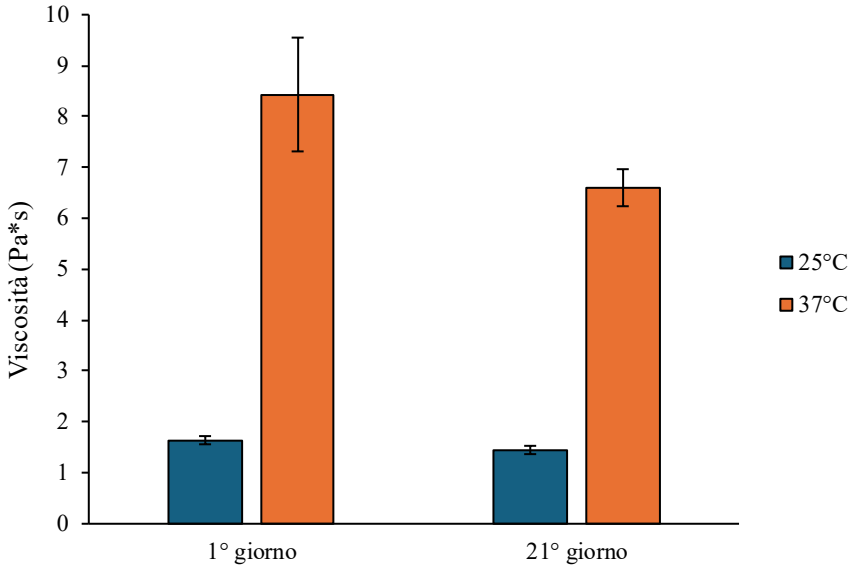


Figura 28: a) test di stabilità reologica della formulazione MC – lHA + NaCl 0,9% p/v b) test di stabilità reologica della formulazione MC – hHA+ NaCl 0,9% p/v.

1.6 Test di siringabilità

La *Figura 29* riporta i valori della forza massima di estrusione (Fmax) registrati durante il test di siringabilità delle formulazioni contenenti NaCl allo 0,9% p/v. Tale analisi è stata effettuata al fine di valutare la forza necessaria per estrudere le formulazioni attraverso una siringa. La formulazione MC – hHA + NaCl 0,9% p/v presenta una forza massima di estrusione leggermente superiore rispetto alla formulazione MC – lHA + NaCl 0,9% p/v. Tale comportamento potrebbe essere correlato alla maggiore concentrazione di HA presente nella formulazione MC – hHA + NaCl 0,9% p/v, che contribuisce all'aumento della viscosità del sistema e, di conseguenza, della resistenza opposta all'estrusione. L'analisi statistica mediante ANOVA a una via ($p < 0,05$) non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le due formulazioni. Nel complesso, entrambe le formulazioni sono risultate estrudibili mediante siringa, con valori di forza massima pari a circa 34,5 N per la formulazione MC – lHA + NaCl 0,9% p/v e 40,5 N per la formulazione MC – hHA + NaCl 0,9% p/v. Secondo quanto riportato in letteratura, la forza massima media esercitabile manualmente durante un'iniezione è pari a circa 80 N, con valori medi di 95,4 N negli uomini e 64,1 N nelle donne [134]. Le forze di estrusione registrate per entrambe le formulazioni risultano quindi inferiori a tali valori di riferimento, suggerendo una buona siringabilità dei sistemi nelle condizioni sperimentali adottate particolare, che ne potrebbe permettere una facile applicazione durante gli interventi laparoscopici.

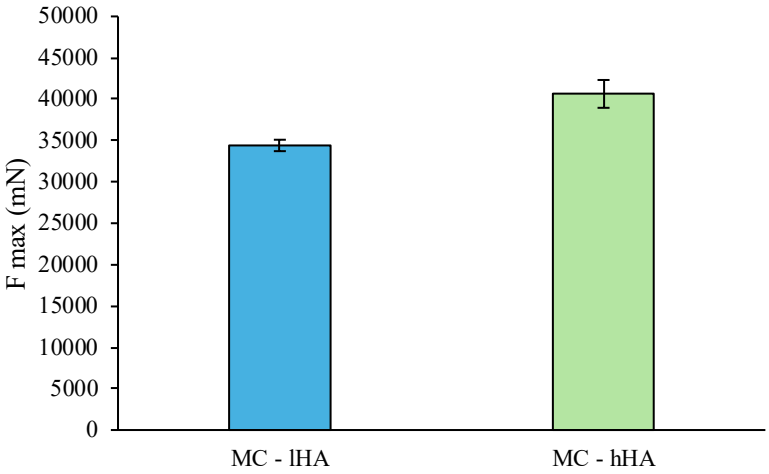


Figura 29: l'istogramma riporta il valore di forza massima (F max) della formulazione MC – lHA + NaCl 0,9% e della formulazione MC – hHA + NaCl 0,9% p/v a confronto.

1.7 Sprayability test

Oltre alla somministrazione mediante siringa, è stata valutata la possibilità di applicare le formulazioni attraverso un dispositivo spray, al fine di esplorare differenti modalità di somministrazione in funzione della procedura chirurgica. In particolare, mentre l'applicazione mediante siringa potrebbe risultare utile negli interventi laparoscopici, la nebulizzazione potrebbe rappresentare un'alternativa negli interventi a cielo aperto, consentendo di distribuire la formulazione sulle superfici tissutali esposte e potenzialmente interessate dalla formazione di aderenze post-operatorie.

La *Figura 30* mostra le immagini ottenute durante il test di nebulizzabilità delle formulazioni contenenti NaCl allo 0,9% p/v, mentre la *Tabella 5* riporta i parametri calcolati per caratterizzare le aree di deposizione (superficie, diametro minimo (Dmin), diametro massimo (Dmax) e rapporto di ovalità).

Entrambe le formulazioni sono risultate nebulizzabili, formando un deposito principale accompagnato da goccioline di dimensioni inferiori distribuite nell'area circostante. La formulazione MC – lHA + NaCl 0,9% p/v, contenente HA allo 0,10% p/v, presenta un'area media di deposizione superiore rispetto a quella della formulazione MC – hHA + NaCl 0,9% p/v, contenente HA allo 0,45% p/v. Analogamente, la formulazione MC – lHA + NaCl 0,9% p/v mostra valori maggiori sia del diametro minimo sia del diametro massimo, suggerendo una maggiore estensione del deposito principale.

Per quanto riguarda la geometria della deposizione, il rapporto di ovalità delle due formulazioni mostra valori prossimi a 1 indicando che entrambi i sistemi mostrano depositi di forma approssimativamente circolare.

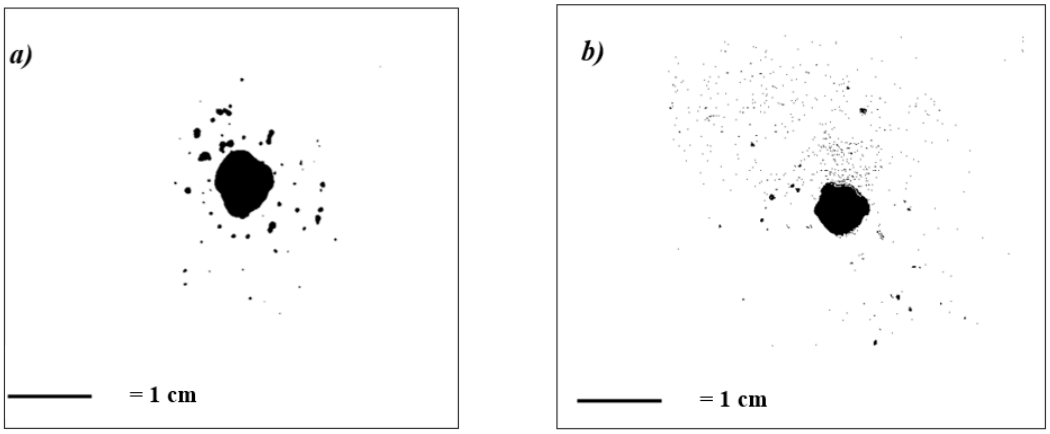


Figura 30: test di nebulizzabilità della formulazione MC – lHA + NaCl 0,9% p/v (a) della formulazione MC – hHA + NaCl 0,9% p/v (b).

	Area (mm^2)	**Dmin (mm)**	**Dmax (mm)**	**Rapporto di ovalità**
MC – lHA	45,0164 ± 7,085	7,02 ± 0,425	8,140 ± 0,843	1,158 ± 0,075
MC – hHA	26,446 ± 3,227	5,142 ± 0,607	6,552 ± 0,190	1,287 ± 0,169

Tabella 5: sono riportati i parametri del test di nebulizzabilità ovvero area (mm^2), diametro minore e maggiore (mm) e rapporto di ovalità.

Il test F ANOVA a una via (k=2) dimostra che i valori dei parametri area, diametro maggiore e minore, sono significativamente diversi tra le due formulazioni, a differenza del rapporto di ovalità che non è statisticamente differente.

Le differenze osservate potrebbero essere correlate alle diverse proprietà reologiche delle formulazioni, in particolare alla maggiore viscosità della formulazione MC – hHA + NaCl 0,9% p/v, che potrebbe influenzare la frammentazione del getto e la distribuzione del materiale durante la nebulizzazione. Nel complesso, i risultati dimostrano la possibilità di applicare entrambe le formulazioni mediante un dispositivo spray, evidenziando una potenziale versatilità di somministrazione in funzione dell'approccio chirurgico.

2. Sviluppo e caratterizzazione dei sistemi di veicolazione del principio attivo

Lo studio si è concentrato sullo sviluppo di sistemi per la veicolazione del principio attivo da incorporare nella matrice polimerica. A tale scopo, sono state investigate due differenti strategie, rappresentate dalla complessazione con ciclodestrine e dall'incapsulamento in nanoparticelle lipidiche solide (SLNs). Entrambi gli approcci sono stati valutati al fine di individuare un sistema idoneo alla veicolazione del principio attivo, caratterizzato da un elevato peso molecolare (circa 500 kDa).

2.1 Efficienza di complessazione e di incapsulamento

Per entrambi i sistemi è stata determinata, mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis, la percentuale di attivo associata al rispettivo sistema di veicolazione.

La *Tabella 6* riporta i valori percentuali ottenuti per le due strategie. In particolare, i complessi con ciclodestrine presentano un'efficienza di complessazione pari a 82,51 ± 1,85%, mentre le SLNs mostrano un'efficienza di incapsulamento pari a 86,80 ± 1,41%.

I risultati evidenziano percentuali elevate di associazione dell'attivo per entrambi i sistemi, con un valore numericamente superiore nel caso delle SLNs. Tali dati suggeriscono che entrambe le strategie consentano di ottenere un'elevata associazione del principio attivo al sistema di veicolazione, sebbene attraverso meccanismi differenti.

CD	82,51 ± 1,85
SLNs	86,80 ± 1,41

Tabella 6: efficienza di complessazione e incapsulamento dell'attivo.

Il test ANOVA a una via (k=2) effettuato sulle repliche di EE% di ciascuna formulazione, dimostra che non ci sono differenze statisticamente significative tra i due sistemi di veicolazione dell'attivo.

2.2 Caratterizzazione chimico-fisica delle SLN

Il Dynamic Light Scattering (DLS) ha permesso di studiare l'indice di polidispersione (PDI) delle SLNs e il diametro idrodinamico (HD). I risultati dimostrano l'ottenimento di una dispersione nanoparticellare di circa 450 nm con un PDI di 26% e un potenziale zeta negativo. La concentrazione delle nanoparticelle, espresso in particelle/ml, è pari a 1,93E+10.

PDI (%)	26,2 ± 4,83
HD (nm)	457,6 ± 156,8
Potenziale zeta ζ (mV)	- 19,9 ± 0,11
Concentrazione totale delle SLNs (particelle/ml)	1,93E+10

Tabella 7: la tabella riporta le caratterizzazioni delle SLNs.

3. Incorporazione del principio attivo negli idrogeli e caratterizzazione dei sistemi finali

3.1 Studio di rilascio del principio attivo mediante celle di Franz

La *Figura 31* riporta i profili di rilascio cumulativo del principio attivo dagli idrogeli contenenti i complessi con ciclodestrine (CD) o le nanoparticelle lipidiche solide (SLNs), valutati nell'arco di 48 ore. Entrambi i sistemi mostrano un profilo di rilascio bifasico, caratterizzato da una fase iniziale relativamente rapida, seguita da un rilascio più graduale nel tempo. In particolare, i complessi con ciclodestrine rilasciano circa il 50% dell'attivo nelle prime ore, raggiungendo una percentuale cumulativa di circa il 70% dopo 48 ore. Le SLNs presentano un andamento analogo, con un rilascio iniziale leggermente superiore, che raggiunge circa il 60% nelle prime ore e il 73% al termine dell'esperimento.

Nel caso dei complessi con ciclodestrine, il rilascio iniziale potrebbe essere attribuito alla presenza di una frazione di attivo debolmente associata al complesso, mentre la successiva fase più lenta potrebbe dipendere dalla progressiva dissociazione delle interazioni tra l'attivo e le ciclodestrine. Per quanto riguarda le SLNs, il comportamento osservato potrebbe essere influenzato dalla natura della matrice lipidica, costituita da burro di cacao. Considerando che il test è stato condotto a 37 °C, temperatura prossima all'intervallo di fusione del burro di cacao, è possibile ipotizzare che modificazioni dello stato fisico e dell'organizzazione della matrice lipidica abbiano favorito la liberazione dell'attivo.

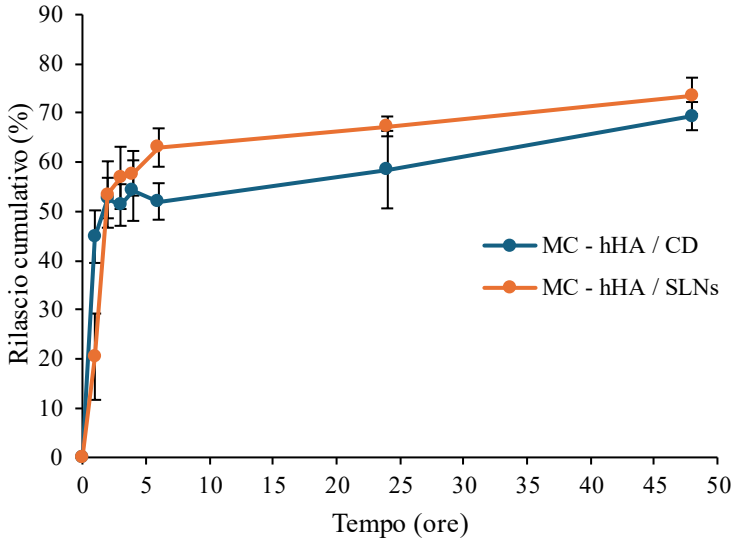


Figura 31: Profilo di rilascio cumulativo percentuale del principio in funzione del tempo per gli idrogeli contenenti i complessi con ciclodestrine o le nanoparticelle lipidiche solide (valori medi ± e.s.; n=3).

3.2 Test di degradazione mediante celle di Franz

Nel caso di formulazioni sviluppate per la prevenzione delle aderenze postoperatorie, la degradazione degli idrogeli assume particolare rilevanza, in quanto il sistema dovrebbe mantenere la propria funzione di barriera durante le prime fasi della guarigione tissutale, per poi essere progressivamente eliminato senza richiedere ulteriori interventi.

La *Figura 32* riporta l'andamento della massa residua degli idrogeli MC + hHA contenenti rispettivamente nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) e complessi con ciclodestrine (CD), durante le 48 ore di osservazione. Entrambe le formulazioni mostrano una progressiva riduzione della massa, con un andamento complessivamente simile. Al termine della prova, l'idrogelo contenente SLNs conserva circa il 65% della massa iniziale, corrispondente a una perdita di massa del 35%, mentre quello contenente CD presenta una massa residua di circa il 79%, con una perdita del 21%.

Il Test F Anova a una via (k=2) conferma che non ci sono variazioni statisticamente significative tra i due profili di degradazione.

Il comportamento di degradazione degli idrogeli dipende principalmente dalla natura dei polimeri che costituiscono la matrice.

Nel caso della MC, la gelificazione termica è causata dalle interazioni idrofobiche tra le catene polimeriche, favorite dalla presenza dei gruppi metossilici. Con l'aumento della temperatura, tali interazioni promuovono l'associazione tra le catene e la formazione di una rete tridimensionale. La degradazione in vitro degli idrogeli a base di metilcellulosa avviene principalmente per dissoluzione fisica della matrice anche perché il corpo umano non

produce gli enzimi in grado di degradarla. [135] In tale contesto, il peso molecolare rappresenta un parametro particolarmente rilevante, poiché può influenzare la permanenza e la successiva eliminazione delle catene polimeriche solubilizzate. Studi condotti su altri polimeri non biodegradabili, come il poli(N-isopropilacrilammide) (PNIPAm), hanno infatti evidenziato come l'impiego di catene a basso peso molecolare, inferiori a circa 40 kDa, possa favorirne la clearance renale. [136] L'acido ialuronico è invece molto più facilmente degradabile poiché sensibile alle specie reattive dell'ossigeno e all'enzima ialuronidasi, fisiologicamente espresso nel plasma umano e responsabile del metabolismo dell'acido ialuronico nella matrice extracellulare. [137]

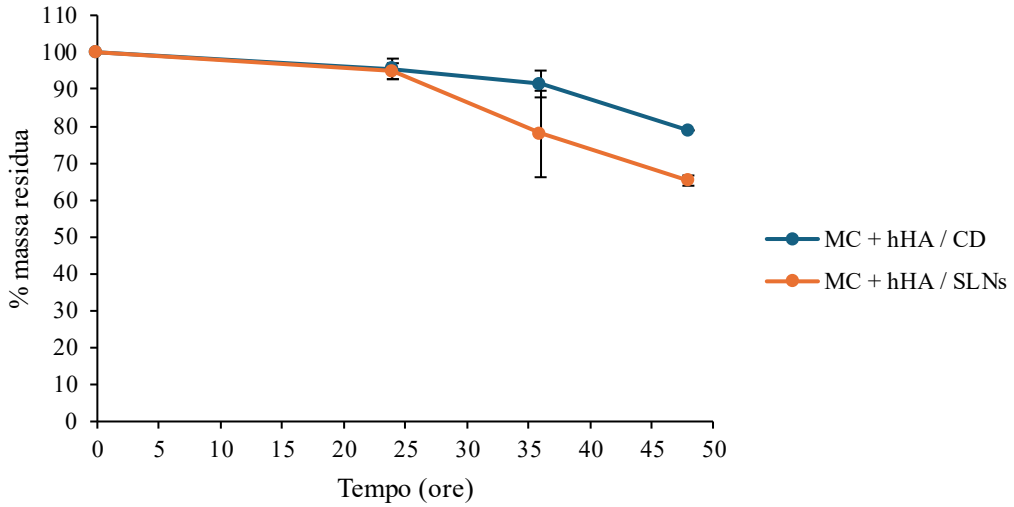


Figura 32: il grafico riporta il test di degradazione degli idrogeli MC + hHA / SLNs ed MC + hHA / CD.

V. CONCLUSIONI

La presente tesi ha come obiettivo lo sviluppo di idrogeli termoresponsivi per la veicolazione locale di principi attivi antiproliferativi, destinati alla potenziale prevenzione delle aderenze postoperatorie.

Attraverso uno studio preformulativo basato su un approccio di Design of Experiments, sono state individuate due formulazioni prototipo costituite da metilcellulosa all'8% p/v e acido ialuronico (HA) rispettivamente allo 0,10% e allo 0,45% p/v. La caratterizzazione reologica ha consentito di approfondire il comportamento viscoelastico delle formulazioni e di valutarne la transizione sol-gel in funzione della temperatura. La successiva aggiunta di NaCl allo 0,9% p/v, finalizzata a ottenere condizioni prossime all'isotonia, ha consentito di modulare la transizione sol-gel, ottenendo temperature di gelificazione pari a 31,9 ± 1,7 °C e 34,6 ± 0,9 °C, rispettivamente per le due formulazioni. Tali valori, prossimi alla temperatura corporea, confermano il potenziale dei sistemi sviluppati per una somministrazione allo stato fluido seguita dalla gelificazione nel sito di applicazione.

Inoltre, i test di siringabilità e nebulizzabilità hanno dimostrato la possibilità di somministrare le formulazioni mediante differenti dispositivi, suggerendone la potenziale adattabilità a diverse procedure chirurgiche, quali interventi laparoscopici e a cielo aperto.

Le prove di sinergismo reologico hanno evidenziato una maggiore interazione con il substrato di gelatina per la formulazione con acido ialuronico allo 0,45%, suggerendo che, insieme alla gelificazione in situ, tale proprietà possa favorire la permanenza dell'idrogelo e la formazione di una barriera fisica antiaderenziale. Sulla base di tali risultati, è stata selezionata la formulazione contenente la maggiore concentrazione di acido ialuronico.

Tale sistema è stato successivamente utilizzato come matrice per l'incorporazione di un principio attivo antiproliferativo, veicolato mediante due differenti strategie: complessi con ciclodestrine (CD) e nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) a base di burro di cacao.

Entrambi i sistemi hanno mostrato valori di efficienza di associazione dell'attivo superiori all'80%, confermando la possibilità di impiegare differenti approcci di veicolazione all'interno della matrice idrogelica.

Entrambe le strategie di veicolazione riportato un'efficienza di inclusione o complessazione dell'attivo superiore ad una percentuale di 80%. I test di degradazione in vitro hanno dimostrato un'ottima resistenza dell'idrogelo alla destrutturazione, con percentuale superiore al 65% di massa conservata dopo 48h dalla deposizione dell'idrogelo

su membrane da dialisi in PBS. Per quanto concerne gli studi sui rilasci, entrambi gli idrogeli rilasciano circa il 70% dopo 48 ore.

Gli studi di perdita di massa in vitro hanno evidenziato una progressiva erosione delle formulazioni, che dopo 48 ore conservavano circa il 65% e il 79% della massa iniziale, rispettivamente per gli idrogeli contenenti SLNs e CD, senza differenze statisticamente significative tra i due sistemi. Parallelamente, gli studi di rilascio hanno mostrato che entrambe le formulazioni sono in grado di liberare una quota significativa del principio attivo, pari a circa il 70% nell'arco di 48 ore, con una fase iniziale di rilascio più rapido seguita da un progressivo rallentamento.

Studi futuri saranno indirizzati alla valutazione della risposta immunomodulatoria e della capacità dei sistemi di favorire la rimesotelizzazione del tessuto peritoneale.

VI. BIBLIOGRAFIA

[1] L. M. Stapleton *et al.*, «Dynamic Hydrogels for Prevention of Post-Operative Peritoneal Adhesions», *Adv. Ther.*, vol. 4, fasc. 3, p. 2000242, mar. 2021, doi: 10.1002/adtp.202000242.

[2] F. Soviero, S. Gucciardi, e A. Geraci, «THE FROZEN SHOULDER: UNKNOWN AND KNOWN KNOWNS. LA "FROZEN SHOULDER": COSA E' NOTO E COSA NO».

[3] W. Arung, «Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions», *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, fasc. 41, p. 4545, 2011, doi: 10.3748/wjg.v17.i41.4545.

[4] K. Okabayashi *et al.*, «Adhesions after abdominal surgery: a systematic review of the incidence, distribution and severity», *Surg. Today*, vol. 44, fasc. 3, pp. 405–420, mar. 2014, doi: 10.1007/s00595-013-0591-8.

[5] A. J. Mathewson, A. F. Loszko, J. E. Ackerman, N. A. Wilson, e A. E. Loiselle, «Cellular and molecular regulation of fibrotic postoperative abdominal adhesions», *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 330, fasc. 5, pp. C1410–C1426, mag. 2026, doi: 10.1152/ajpcell.00037.2026.

[6] D. J. Swank, W. F. M. Van Erp, O. J. Repelaer Van Driel, W. C. J. Hop, H. J. Bonjer, e J. Jeekel, «Complications and feasibility of laparoscopic adhesiolysis in patients with chronic abdominal pain», *Surg. Endosc.*, vol. 16, fasc. 10, pp. 1468–1473, ott. 2002, doi: 10.1007/s00464-002-0008-z.

[7] X. Tan *et al.*, «An Integrated Janus Patch with Asymmetric Tissue Adhesion for Enhanced Postoperative Adhesion Prevention», *Polym. Sci. Technol.*, vol. 1, fasc. 2, pp. 120–131, apr. 2025, doi: 10.1021/polymscitech.5c00002.

[8] J. B. C. Van Der Wal, J. A. Halm, e J. Jeekel, «Chronic abdominal pain: the role of adhesions and benefit of laparoscopic adhesiolysis», *Gynecol. Surg.*, vol. 3, fasc. 3, pp. 168–174, set. 2006, doi: 10.1007/s10397-006-0232-y.

[9] Z. Y. Teo, S. D. Senthilkumar, e D. K. Srinivasan, «Nanotechnology-Based Therapies for Preventing Post-Surgical Adhesions», *Pharmaceutics*, vol. 17, fasc. 3, p. 389, mar. 2025, doi: 10.3390/pharmaceutics17030389.

[10] Z. Bayhan *et al.*, «Antiadhesive and anti-inflammatory effects of pirfenidone in postoperative intra-abdominal adhesion in an experimental rat model», *J. Surg. Res.*, vol. 201, fasc. 2, pp. 348–355, apr. 2016, doi: 10.1016/j.jss.2015.11.033.

[11] C. N. Fortin, G. M. Saed, e M. P. Diamond, «Predisposing factors to post-operative adhesion development», *Hum. Reprod. Update*, vol. 21, fasc. 4, pp. 536–551, lug. 2015, doi: 10.1093/humupd/dmv021.

[12] S. C. Blackburn e M. P. Stanton, «Anatomy and physiology of the peritoneum», *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 23, fasc. 6, pp. 326–330, dic. 2014, doi: 10.1053/j.sempedsurg.2014.06.002.

[13] J. O. A. M. Van Baal *et al.*, «The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum», *Tissue Cell*, vol. 49, fasc. 1, pp. 95–105, feb. 2017, doi: 10.1016/j.tice.2016.11.004.

[14] G. S. diZerega, «Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation», *Hum. Reprod. Update*, vol. 7, fasc. 6, pp. 547–555, nov. 2001, doi: 10.1093/humupd/7.6.547.

[15] H. Capella-Monsonís, S. Kearns, J. Kelly, e D. I. Zeugolis, «Battling adhesions: from understanding to prevention», *BMC Biomed. Eng.*, vol. 1, fasc. 1, p. 5, dic. 2019, doi: 10.1186/s42490-019-0005-0.

[16] B. Risberg e B. Stenberg, «Modulation of tissue fibrinolysis from hypoxia and hyperoxia», *Thromb. Res.*, vol. 38, fasc. 2, pp. 129–136, apr. 1985, doi: 10.1016/0049-3848(85)90055-6.

[17] A. Fatehi Hassanabad, A. N. Zarzycki, K. Jeon, J. F. Deniset, e P. W. M. Fedak, «Post-Operative Adhesions: A Comprehensive Review of Mechanisms», *Biomedicines*, vol. 9, fasc. 8, p. 867, lug. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9080867.

[18] B. W. J. Hellebrekers e T. Kooistra, «Pathogenesis of postoperative adhesion formation», *Br. J. Surg.*, vol. 98, fasc. 11, pp. 1503–1516, ott. 2011, doi: 10.1002/bjs.7657.

[19] Q. Hu *et al.*, «A review of physiological and cellular mechanisms underlying fibrotic postoperative adhesion», *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 17, fasc. 1, pp. 298–306, 2021, doi: 10.7150/ijbs.54403.

[20] G. Pados, C. A. Venetis, K. Almaloglou, e B. C. Tarlatzis, «Prevention of intra-peritoneal adhesions in gynaecological surgery: theory and evidence», *Reprod. Biomed. Online*, vol. 21, fasc. 3, pp. 290–303, set. 2010, doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.021.

[21] T. Zhang *et al.*, «A ROS-responsive and scavenging hydrogel for postoperative abdominal adhesion prevention», *Acta Biomater.*, vol. 184, pp. 98–113, ago. 2024, doi: 10.1016/j.actbio.2024.06.027.

[22] P. Sandoval *et al.*, «Mesothelial-to-mesenchymal transition in the pathogenesis of post-surgical peritoneal adhesions», *J. Pathol.*, vol. 239, fasc. 1, pp. 48–59, mag. 2016, doi: 10.1002/path.4695.

[23] M. Ruizortega, J. Rodriguezvita, E. Sanchezlopez, G. Carvajal, e J. Egido, «TGF-β signaling in vascular fibrosis», *Cardiovasc. Res.*, vol. 74, fasc. 2, pp. 196–206, mag. 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.008.

[24] L. Lucarini *et al.*, «Role of histamine H 4 receptor ligands in bleomycin-induced pulmonary fibrosis», *Pharmacol. Res.*, vol. 111, pp. 740–748, set. 2016, doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.037.

[25] H. M. Atta, «Prevention of peritoneal adhesions: A promising role for gene therapy», *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, fasc. 46, p. 5049, 2011, doi: 10.3748/wjg.v17.i46.5049.

[26] P. Italiani e D. Boraschi, «From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation», *Front. Immunol.*, vol. 5, ott. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.

[27] S. E. Mutsaers, K. Birnie, S. Lansley, S. E. Herrick, C.-B. Lim, e C. M. PrÃªle, «Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis», *Front. Pharmacol.*, vol. 6, giu. 2015, doi: 10.3389/fphar.2015.00113.

[28] F. H. Martini, R. B. Tallitsch, e J. L. Nath, *Anatomia umana*, 7. ed. / revisione a cura di Lucio Cocco ... [et al.]. Napoli: EdiSES, 2019.

[29] V. Kumar e S. L. Robbins, A c. di, *Robbins Basic pathology*, 9. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders, 2013.

[30] C. H. Gordillo, P. Sandoval, P. Muñoz-Hernández, L. Pascual-Antón, M. López-Cabrera, e J. A. Jiménez-Heffernan, «Mesothelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to the Generation of Carcinoma-Associated Fibroblasts in Locally Advanced Primary Colorectal Carcinomas», *Cancers*, vol. 12, fasc. 2, p. 499, feb. 2020, doi: 10.3390/cancers12020499.

[31] Y. Yeo e D. S. Kohane, «Polymers in the prevention of peritoneal adhesions», *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, fasc. 1, pp. 57–66, gen. 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2007.03.027.

[32] J. Li, J. Liang, S. Chen, W. Guo, T. Chen, e X. Liu, «A Janus adhesive hydrogel sheet for preventing postoperative tissue adhesion of intestinal injuries», *RSC Adv.*, vol. 14, fasc. 7, pp. 4416–4423, 2024, doi: 10.1039/D3RA08867G.

[33] Y. Yang *et al.*, «Janus hydrogels: Pioneering dual-faced biomaterials for revolutionary tissue engineering», *Mater. Today Adv.*, vol. 28, p. 100652, dic. 2025, doi: 10.1016/j.mtadv.2025.100652.

[34] K. Stratakis *et al.*, «Mechanisms and Therapeutic Approaches for Peritoneal Adhesions: A Comprehensive Review», *Chirurgia (Bucur.)*, vol. 118, fasc. 2, p. 113, 2023, doi: 10.21614/chirurgia.2840.

[35] A. K. S. Chandel, A. Shimizu, K. Hasegawa, e T. Ito, «Advancement of Biomaterial-Based Postoperative Adhesion Barriers», *Macromol. Biosci.*, vol. 21, fasc. 3, p. 2000395, mar. 2021, doi: 10.1002/mabi.202000395.

[36] X. Lu, L. Li, W. Zhang, e C. Wang, «Preparation and characterization of Ag_2 S nanoparticles embedded in polymer fibre matrices by electrospinning», *Nanotechnology*, vol. 16, fasc. 10, pp. 2233–2237, ott. 2005, doi: 10.1088/0957-4484/16/10/043.

[37] M. P. Diamond, E. L. Burns, B. Accomando, S. Mian, e L. Holmdahl, «Seprafilm(®) adhesion barrier: (2) a review of the clinical literature on intraabdominal use», *Gynecol. Surg.*, vol. 9, fasc. 3, pp. 247–257, set. 2012, doi: 10.1007/s10397-012-0742-8.

[38] «Prevention of postsurgical adhesions by INTERCEED(TC7), an absorbable adhesion barrier: a prospective randomized multicenter clinical study. INTERCEED(TC7) Adhesion Barrier Study Group», *Fertil. Steril.*, vol. 51, fasc. 6, pp. 933–938, giu. 1989.

[39] R. P. Aliredjo, J. De Vries, T. Menovsky, J. A. Grotenhuis, e J. Merx, «The Use of Gore-Tex Membrane for Adhesion Prevention in Tethered Spinal Cord Surgery: Technical Case Reports», *Neurosurgery*, vol. 44, fasc. 3, pp. 674–677, mar. 1999, doi: 10.1097/00006123-199903000-00139.

[40] A. F. Haney *et al.*, «Expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex Surgical Membrane) is superior to oxidized regenerated cellulose (Interceed TC7) in preventing adhesions», *Fertil. Steril.*, vol. 63, fasc. 5, pp. 1021–1026, mag. 1995, doi: 10.1016/S0015-0282(16)57541-4.

[41] S. Chiorescu, O. A. Andercou, N. O. Grad, e I. A. Mironiuc, «Intraperitoneal Administration of Rosuvastatin Prevents Postoperative Peritoneal Adhesions by Decreasing the Release of Tumor Necrosis Factor», *Med. Pharm. Rep.*, vol. 91, fasc. 1, pp. 79–84, gen. 2018, doi: 10.15386/cjmed-859.

[42] Y. S. Zhang e A. Khademhosseini, «Advances in engineering hydrogels», *Science*, vol. 356, fasc. 6337, p. eaaf3627, mag. 2017, doi: 10.1126/science.aaf3627.

[43] K. Deligkaris, T. S. Tadele, W. Olthuis, e A. Van Den Berg, «Hydrogel-based devices for biomedical applications», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 147, fasc. 2, pp. 765–774, giu. 2010, doi: 10.1016/j.snb.2010.03.083.

[44] H. Mashaqbeh, B. Al-Ghzawi, e F. BaniAmer, «Exploring the Formulation and Approaches of Injectable Hydrogels Utilizing Hyaluronic Acid in Biomedical Uses», *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.*, vol. 2024, pp. 1–19, mag. 2024, doi: 10.1155/2024/3869387.

[45] P. Lundorff *et al.*, «Reduction of post-surgical adhesions with ferric hyaluronate gel: a European study», *Hum. Reprod.*, vol. 16, fasc. 9, pp. 1982–1988, set. 2001, doi: 10.1093/humrep/16.9.1982.

[46] H. D. Luu, A. Chen, e I. S. Isayeva, «Comparative stability of the bioresorbable ferric crosslinked hyaluronic acid adhesion prevention solutions», *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 101B, fasc. 6, pp. 1006–1013, ago. 2013, doi: 10.1002/jbm.b.32909.

[47] É. Moutel, S. Le Poole, S. Mouly, D. E. Ha, e E. Viriot, «Indications et évaluation des pratiques liées à l'utilisation des dispositifs de prévention des adhérences post-chirurgicales hyalobarrier gel endo® et séprafilm®», *Pharm. Hosp. Clin.*, vol. 51, fasc. 1, p. 75, mar. 2016, doi: 10.1016/j.phclin.2016.01.032.

[48] C. B. Brown *et al.*, «Adept (icodextrin 4% solution) reduces adhesions after laparoscopic surgery for adhesiolysis: a double-blind, randomized, controlled study», *Fertil. Steril.*, vol. 88, fasc. 5, pp. 1413–1426, nov. 2007, doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.084.

[49] G. S. DiZerega, A c. di, *Pelvic surgery: adhesion formation and prevention; [proceedings of the 3rd International Congress on Pelvic Surgery & Adhesion Prevention, held in San Diego, Calif., from Feb. 29 to March 2, 1996]*. New York Berlin Heidelberg Barcelona Budapest Hong Kong London Milan Paris Santa Clara Singapore Tokyo: Springer, 1997.

[50] F. Dasiran, R. Eryilmaz, A. Isik, I. Okan, A. Somay, e M. Sahin, «The effect of polyethylene glycol adhesion barrier (Spray Gel) on preventing peritoneal adhesions», *Bratisl. Med. J.*, vol. 116, fasc. 06, pp. 379–382, 2015, doi: 10.4149/BLL_2015_072.

[51] H. Park, S. Baek, H. Kang, e D. Lee, «Biomaterials to Prevent Post-Operative Adhesion», *Materials*, vol. 13, fasc. 14, p. 3056, lug. 2020, doi: 10.3390/ma13143056.

[52] A. H. Petter-Puchner *et al.*, «Fibrin sealant (Tissucol) enhances tissue integration of condensed polytetrafluoroethylene meshes and reduces early adhesion formation in experimental intraabdominal peritoneal onlay mesh repair», *J. Surg. Res.*, vol. 150, fasc. 2, pp. 190–195, dic. 2008, doi: 10.1016/j.jss.2007.12.796.

[53] J. H. Chung *et al.*, «Anti-adhesion agent to prevent of post-operative adhesion and fibrosis after vasectomy: a study using a rat model», *Transl. Androl. Urol.*, vol. 11, fasc. 9, pp. 1234–1244, set. 2022, doi: 10.21037/tau-21-1170.

[54] J. Ahn, S. G. Yoon, J. W. Yi, S. Kim, e K. E. Lee, «Anti-adhesive effect and safety of a thermosensitive adhesion barrier (Mediclore) for thyroid surgery: a double-blinded randomized controlled trial», *Ann. Surg. Treat. Res.*, vol. 102, fasc. 6, p. 313, 2022, doi: 10.4174/astr.2022.102.6.313.

[55] E. Ersoy, V. Ozturk, A. Yazgan, M. Ozdogan, e H. Gundogdu, «Effect of Polylactic Acid Film Barrier on Intra-Abdominal Adhesion Formation», *J. Surg. Res.*, vol. 147, fasc. 1, pp. 148–152, giu. 2008, doi: 10.1016/j.jss.2007.09.005.

[56] B. Liu *et al.*, «Multifunctional Microgel-Based Cream Hydrogels for Postoperative Abdominal Adhesion Prevention», *ACS Nano*, vol. 17, fasc. 4, pp. 3847–3864, feb. 2023, doi: 10.1021/acsnano.2c12104.

[57] C. Weis, E. K. Odermatt, J. Kressler, Z. Funke, T. Wehner, e D. Freytag, «Poly(vinyl alcohol) membranes for adhesion prevention», *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 70B, fasc. 2, pp. 191–202, ago. 2004, doi: 10.1002/jbm.b.30007.

[58] H. Lo, H. Kuo, e Y. Huang, «Application of Polycaprolactone as an Anti-Adhesion Biomaterial Film», *Artif. Organs*, vol. 34, fasc. 8, pp. 648–653, ago. 2010, doi: 10.1111/j.1525-1594.2009.00949.x.

[59] B. Feng *et al.*, «Bioresorbable electrospun gelatin/polycaprolactone nanofibrous membrane as a barrier to prevent cardiac postoperative adhesion», *Acta Biomater.*, vol. 83, pp. 211–220, gen. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.022.

[60] R. E. Leach e R. L. Henry, «Reduction of postoperative adhesions in the rat uterine hornmodel with poloxamer 407», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 162, fasc. 5, pp. 1317–1319, mag. 1990, doi: 10.1016/0002-9378(90)90044-8.

[61] «An expanded polytetrafluoroethylene barrier (Gore-Tex Surgical Membrane) reduces post-myomectomy adhesion formation», *Fertil. Steril.*, vol. 63, fasc. 3, pp. 491–493, mar. 1995, doi: 10.1016/S0015-0282(16)57414-7.

[62] A. Subramaniam e S. Sethuraman, «Biomedical Applications of Nondegradable Polymers», in *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier, 2014, pp. 301–308. doi: 10.1016/B978-0-12-396983-5.00019-3.

[63] A. Fazel Anvari-Yazdi, I. Badea, e X. Chen, «Biomaterials in Postoperative Adhesion Barriers and Uterine Tissue Engineering», *Gels*, vol. 11, fasc. 6, p. 441, giu. 2025, doi: 10.3390/gels11060441.

[64] Y. D. Wang, *Applied Sciences and Engineering: Modern Topics in Manufacturing and Designing*, vol. 197. Trans Tech Publications Ltd, 2012. doi: 10.4028/b-c9lMoF.

[65] W. D. Spotnitz, «Fibrin Sealant: The Only Approved Hemostat, Sealant, and Adhesive—a Laboratory and Clinical Perspective», *ISRN Surg.*, vol. 2014, pp. 1–28, mar. 2014, doi: 10.1155/2014/203943.

[66] I. Aranaz *et al.*, «Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications», *Polymers*, vol. 13, fasc. 19, p. 3256, set. 2021, doi: 10.3390/polym13193256.

[67] E. Shahram *et al.*, «Evaluation of chitosan–gelatin films for use as postoperative adhesion barrier in rat cecum model», *Int. J. Surg.*, vol. 11, fasc. 10, pp. 1097–1102, dic. 2013, doi: 10.1016/j.ijsu.2013.09.012.

[68] N. Volpi, «Chondroitin Sulfate Safety and Quality», *Molecules*, vol. 24, fasc. 8, p. 1447, apr. 2019, doi: 10.3390/molecules24081447.

[69] S. Wang *et al.*, «In situ crosslinked injectable chondroitin sulfate hydrogel for preventing postoperative adhesion», *Biomed. Pharmacother.*, vol. 180, p. 117495, nov. 2024, doi: 10.1016/j.biopha.2024.117495.

[70] T. Horii *et al.*, «Physical and biological properties of a novel anti-adhesion material made of thermally cross-linked gelatin film: Investigation of the usefulness as anti-adhesion material», *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 106, fasc. 2, pp. 689–696, feb. 2018, doi: 10.1002/jbm.b.33880.

[71] D. Kim *et al.*, «Characterization of Anti-Adhesion Properties of Alginate/Polyethylene Oxide Film to Reduce Postsurgical Peritoneal Adhesions», *Sci. Adv. Mater.*, vol. 9, fasc. 9, pp. 1669–1677, set. 2017, doi: 10.1166/sam.2017.3166.

[72] S. Baek, H. Park, K. Chen, H. Park, e D. Lee, «Development of an implantable PCL/alginate bilayer scaffold to prevent secondary infections», *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 37, fasc. 4, pp. 677–687, apr. 2020, doi: 10.1007/s11814-019-0459-8.

[73] A. L. Lehninger, M. M. Cox, E. Melloni, D. L. Nelson, e F. Salamino, *I principi di biochimica di Lehninger / David L. Nelson, Michael M. Cox ; edizione italiana [e*

revisione] a cura di Edon Melloni e Franca Salamino, 6. ed. Bologna: Zanichelli, 2014.

[74] J. Y. Jeong, P. K. Chung, e J. C. Yoo, «Effect of sodium hyaluronate/carboxymethyl cellulose (Guardix-sol) on retear rate and postoperative stiffness in arthroscopic rotator cuff repair patients: A prospective cohort study», *J. Orthop. Surg.*, vol. 25, fasc. 2, p. 2309499017718908, mag. 2017, doi: 10.1177/2309499017718908.

[75] F. Della Sala, M. Di Gennaro, P. Makvandi, e A. Borzacchiello, «A Covalently Cross-Linked Hyaluronic Acid/Carboxymethyl Cellulose Composite Hydrogel as a Potential Filler for Soft Tissue Augmentation», *Gels*, vol. 10, fasc. 1, p. 67, gen. 2024, doi: 10.3390/gels10010067.

[76] M. Antoszewska, E. M. Sokolewicz, e W. Barańska-Rybak, «Wide Use of Hyaluronic Acid in the Process of Wound Healing—A Rapid Review», *Sci. Pharm.*, vol. 92, fasc. 2, p. 23, apr. 2024, doi: 10.3390/scipharm92020023.

[77] T. Ito, Y. Yeo, C. B. Highley, E. Bellas, C. A. Benitez, e D. S. Kohane, «The prevention of peritoneal adhesions by in situ cross-linking hydrogels of hyaluronic acid and cellulose derivatives», *Biomaterials*, vol. 28, fasc. 6, pp. 975–983, feb. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.021.

[78] C. Carotenuto, «Reologia della termogelificazione inversa di solu- zioni acquose di idrossipropilcellulosa», 2006.

[79] M. L. Coughlin, L. Liberman, S. P. Ertem, J. Edmund, F. S. Bates, e T. P. Lodge, «Methyl cellulose solutions and gels: fibril formation and gelation properties», *Prog. Polym. Sci.*, vol. 112, p. 101324, gen. 2021, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2020.101324.

[80] T. Sultana, J.-G. Gwon, e B.-T. Lee, «Thermal stimuli-responsive hyaluronic acid loaded cellulose based physical hydrogel for post-surgical de novo peritoneal adhesion prevention», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, p. 110661, mag. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.110661.

[81] M. H. Kim, H. Park, H. C. Nam, S. R. Park, J.-Y. Jung, e W. H. Park, «Injectable methylcellulose hydrogel containing silver oxide nanoparticles for burn wound healing», *Carbohydr. Polym.*, vol. 181, pp. 579–586, feb. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.109.

[82] Y. Huang *et al.*, «Thermosensitive hydrogels based on methylcellulose derivatives for prevention of postoperative adhesion», *Cellulose*, vol. 27, fasc. 3, pp. 1555–1571, feb. 2020, doi: 10.1007/s10570-019-02857-4.

[83] E. Díaz-Montes, «Dextran: Sources, Structures, and Properties», *Polysaccharides*, vol. 2, fasc. 3, pp. 554–565, lug. 2021, doi: 10.3390/polysaccharides2030033.

[84] T. Ito, Y. Yeo, C. B. Highley, E. Bellas, e D. S. Kohane, «Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions», *Biomaterials*, vol. 28, fasc. 23, pp. 3418–3426, ago. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.017.

[85] Y. Yeo *et al.*, «In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels prevent post-operative abdominal adhesions in a rabbit model», *Biomaterials*, vol. 27, fasc. 27, pp. 4698–4705, set. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.043.

[86] R. C. Gupta, R. Lall, A. Srivastava, e A. Sinha, «Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory», *Front. Vet. Sci.*, vol. 6, p. 192, giu. 2019, doi: 10.3389/fvets.2019.00192.

[87] L. Liu, Y. Liu, J. Li, G. Du, e J. Chen, «Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives», *Microb. Cell Factories*, vol. 10, fasc. 1, p. 99, dic. 2011, doi: 10.1186/1475-2859-10-99.

[88] A. Marinho, C. Nunes, e S. Reis, «Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation», *Biomolecules*, vol. 11, fasc. 10, p. 1518, ott. 2021, doi: 10.3390/biom11101518.

[89] A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini, e S. Vertuani, «Hyaluronic Acid in the Third Millennium», *Polymers*, vol. 10, fasc. 7, p. 701, giu. 2018, doi: 10.3390/polym10070701.

[90] P. Snetkov, K. Zakharova, S. Morozkina, R. Olekhnovich, e M. Uspenskaya, «Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer», *Polymers*, vol. 12, fasc. 8, p. 1800, ago. 2020, doi: 10.3390/polym12081800.

[91] G. G. Nenci, «Dermatan Sulphate as an Antithrombotic Drug», *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, vol. 32, fasc. 5–6, pp. 303–307, 2002, doi: 10.1159/000073586.

[92] K. Lewandowska, H. U. Choi, e L. C. Rosenberg, «Fibronectin-mediated Adhesion of Fibroblasts: Inhibition by Dermatan Sulfate Proteoglycan and Evidence for a Cryptic Glycosa noglycan-binding Domain».

[93] A. Vitiello e F. Ferrara, «Low Molecular Weight Heparin, Anti-inflammatory/Immunoregulatory and Antiviral Effects, a Short Update», *Cardiovasc. Drugs Ther.*, vol. 37, fasc. 2, pp. 277–281, apr. 2023, doi: 10.1007/s10557-021-07251-6.

[94] S. Mousavi, M. Moradi, T. Khorshidahmad, e M. Motamedi, «Anti-Inflammatory Effects of Heparin and Its Derivatives: A Systematic Review», *Adv. Pharmacol. Sci.*, vol. 2015, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1155/2015/507151.

[95] H. P. Wiczyk, D. R. Grow, L. A. Adams, D. L. O'Shea, e M. T. Reece, «Pelvic Adhesions Contain Sex Steroid Receptors and Produce Angiogenesis Growth Factors», *Fertil. Steril.*, vol. 69, fasc. 3, pp. 511–516, mar. 1998, doi: 10.1016/S0015-0282(97)00529-3.

[96] A. Imai, H. Takagi, K. Matsunami, e N. Suzuki, «Non-barrier agents for postoperative adhesion prevention: clinical and preclinical aspects», *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 282, fasc. 3, pp. 269–275, set. 2010, doi: 10.1007/s00404-010-1423-3.

[97] O. Kayiran, S. Tunc, G. G. E. Ozcan, N. Kaya, e D. Karabulut, «Tamoxifen Prevents Peritendinous Adhesions: A Preliminary Report», *BioMed Res. Int.*, vol. 2022, fasc. 1, p. 4250771, gen. 2022, doi: 10.1155/2022/4250771.

[98] Y. Zhang *et al.*, «In situ multifunctional gel for hormone-immune therapy of ovarian cancer and prevention of postoperative adhesion», *Chem. Eng. J.*, vol. 514, p. 163135, giu. 2025, doi: 10.1016/j.cej.2025.163135.

[99] T. Karaca, A. U. Gözalan, Ö. Yoldaş, B. Ç. Bilgin, e A. Tezer, «Effects of tamoxifen citrate on postoperative intra-abdominal adhesion in a rat model», *Int. J. Surg.*, vol. 11, fasc. 1, pp. 68–72, gen. 2013, doi: 10.1016/j.ijsu.2012.11.015.

[100] P. A. Lucas e B. Y. Lee, «Formation of Abdominal Adhesions Is Inhibited by Antibodies to Transforming Growth Factor-b».

[101] G. Li *et al.*, «Quercetin inhibits mesothelial-mesenchymal transition and alleviates postoperative peritoneal adhesions by blocking the TGF-β1/PI3K/AKT pathway», *J. Ethnopharmacol.*, vol. 319, p. 117242, gen. 2024, doi: 10.1016/j.jep.2023.117242.

[102] F. Wu, W. Liu, H. Feng, L. Long, L. Hou, e C. Hou, «Application of Traditional Chinese Medicines in Postoperative Abdominal Adhesion», *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, vol. 2020, fasc. 1, p. 8073467, gen. 2020, doi: 10.1155/2020/8073467.

[103] G. Wei, X. Chen, G. Wang, L. Fan, K. Wang, e X. Li, «Effect of Resveratrol on the Prevention of Intra-Abdominal Adhesion Formation in a Rat Model», *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 39, fasc. 1, pp. 33–46, 2016, doi: 10.1159/000445603.

[104] Y. Gong *et al.*, «Hyaluronic acid-based reactive oxygen species responsive nanocomposite hydrogel for sequential drug delivery and effective prevention of

postoperative abdominal adhesions», *Carbohydr. Polym.*, vol. 381, p. 125148, giu. 2026, doi: 10.1016/j.carbpol.2026.125148.

[105] A. Fatehi Hassanabad *et al.*, «Prevention of Post-Operative Adhesions: A Comprehensive Review of Present and Emerging Strategies», *Biomolecules*, vol. 11, fasc. 7, p. 1027, lug. 2021, doi: 10.3390/biom11071027.

[106] E. Ergul e B. Korukluoglu, «Peritoneal adhesions: Facing the enemy», *Int. J. Surg.*, vol. 6, fasc. 3, pp. 253–260, 2008, doi: 10.1016/j.ijsu.2007.05.010.

[107] N. J. Carter, «In Idiopathic Pulmonary Fibrosis», 2011.

[108] M. F. El-Azab, B. A. Mysona, e A. B. El-Remessy, «Statins for prevention of diabetic-related blindness: a new treatment option?», *Expert Rev. Ophthalmol.*, vol. 6, fasc. 3, pp. 269–272, giu. 2011, doi: 10.1586/eop.11.36.

[109] Y. Mi *et al.*, «Biologically Targeted Photo-Crosslinkable Nanopatch to Prevent Postsurgical Peritoneal Adhesion», *Adv. Sci.*, vol. 6, fasc. 19, p. 1900809, ott. 2019, doi: 10.1002/advs.201900809.

[110] Z.-H. Z. Zhen-Hai Zhang, J.-P. Z. Jian-Ping Zhou, H.-X. L. Hui-Xia Lv, *et al.*, «Preparation, physicochemical characteristics and bioavailability studies of an atorvastatin hydroxypropyl-ß-cyclodextrin complex», *Pharmazie*, fasc. 1, pp. 46–53, gen. 2012, doi: 10.1691/ph.2012.1082.

[111] B. M. Hadi e E. B. H. Al-Khedairy, . «Preparation and Characterization of Atorvastatin Calcium Trihydrate-cyclodextrin Inclusion Complex», *Int. J. DRUG Deliv. Technol.*, vol. 12, fasc. 03, pp. 1171–1179, giu. 2022, doi: 10.25258/ijddt.12.3.41.

[112] Germeen N.S. Girgis, «The Potential Use of Atorvastatin Calcium/Hydroxypropyl-B-Cyclodextrincomplex loaded Hydrogel as an Ocular Delivery System.», *Nat. Sci.*, vol. 16, fasc. 3, p. 56, 2018, doi: 10.7537/marsnsj160318.05.

[113] B. Tian, Y. Liu, e J. Liu, «Smart stimuli-responsive drug delivery systems based on cyclodextrin: A review», *Carbohydr. Polym.*, vol. 251, p. 116871, gen. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116871.

[114] H. Cui *et al.*, «Cyclodextrin: Dual Functions as a Therapeutic Agent and Nanocarrier for Regulating Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis», *Pharmaceutics*, vol. 17, fasc. 11, p. 1496, nov. 2025, doi: 10.3390/pharmaceutics17111496.

[115] G. Zucca *et al.*, «Development of a nasal spray based on cyclodextrin/hydrophobically-modified hydroxypropyl-methyl cellulose for the

prevention of viral respiratory infections», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 299, p. 140024, apr. 2025, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.140024.

[116] A. Cid-Samamed, J. Rakmai, J. C. Mejuto, J. Simal-Gandara, e G. Astray, «Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications», *Food Chem.*, vol. 384, p. 132467, ago. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132467.

[117] R. K *et al.*, «Characterization and Pharmacokinetic Analysis of Rosuvastatin calcium-2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin Inclusion Complexes for Enhanced Oral Bioavailability», *Res.*, vol. 2, fasc. 3, p. 100528, set. 2025, doi: 10.1016/j.nexres.2025.100528.

[118] M. Ghadiri *et al.*, «Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size», *Int. J. Pharm.*, vol. 424, fasc. 1–2, pp. 128–137, mar. 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.037.

[119] F. Saporito *et al.*, «Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing», *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 13, pp. 175–186, dic. 2017, doi: 10.2147/IJN.S152529.

[120] M. Ahmadi, M. Mehdikhani, J. Varshosaz, S. Farsaei, e H. Torabi, «Pharmaceutical evaluation of atorvastatin-loaded nanostructured lipid carriers incorporated into the gelatin/hyaluronic acid/polycaprolactone scaffold for the skin tissue engineering», *J. Biomater. Appl.*, vol. 35, fasc. 8, pp. 958–977, mar. 2021, doi: 10.1177/0885328220970760.

[121] M. D. C. V. Queiroz e L. A. Muehlmann, «Characteristics and Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers», *J. Nanotheranostics*, vol. 5, fasc. 4, pp. 188–211, nov. 2024, doi: 10.3390/jnt5040012.

[122] E. Subroto, R. Andoyo, e R. Indiarto, «Solid Lipid Nanoparticles: Review of the Current Research on Encapsulation and Delivery Systems for Active and Antioxidant Compounds», *Antioxidants*, vol. 12, fasc. 3, p. 633, mar. 2023, doi: 10.3390/antiox12030633.

[123] N. K. M, S. S, S. R. P, e D. Narayanasamy, «The Science of Solid Lipid Nanoparticles: From Fundamentals to Applications», *Cureus*, set. 2024, doi: 10.7759/cureus.68807.

[124] R.-A. Hernández-Esquivel, G. Navarro-Tovar, E. Zárate-Hernández, e P. Aguirre-Bañuelos, «Solid Lipid Nanoparticles (SLN)», in *Nanocomposite Materials for Biomedical and Energy Storage Applications*, A. Sharma, A c. di, IntechOpen, 2022. doi: 10.5772/intechopen.102536.

[125] G. Zucca, B. Vigani, C. Valentino, M. Ruggeri, G. Sandri, e S. Rossi, «Exploring Sangelose-cyclodextrin in situ-forming hydrogels for vitreous substitution: design, development, and characterization», *Mater. Des.*, vol. 257, p. 114480, set. 2025, doi: 10.1016/j.matdes.2025.114480.

[126] M. Ruggeri *et al.*, «Synergy of Hydeal-D® and Hyaluronic Acid for Protecting and Restoring Urothelium: In Vitro Characterization», *Pharmaceutics*, vol. 13, fasc. 9, p. 1450, set. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13091450.

[127] M. K. Bain *et al.*, «Synergistic effect of salt mixture on the gelation temperature and morphology of methylcellulose hydrogel», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, fasc. 5, pp. 831–836, dic. 2012, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.07.028.

[128] S. C. Joshi, «Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release», *Materials*, vol. 4, fasc. 10, pp. 1861–1905, ott. 2011, doi: 10.3390/ma4101861.

[129] N.-S. Hsu *et al.*, «Development of a sprayable thermosensitive lysine-modified pluronic hyaluronic acid hydrogel for enhanced wound healing and adhesion prevention in laparoscopic applications», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 321, p. 146297, set. 2025, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.146297.

[130] W. Song, C. Lee, H. Jeong, S. Kim, e N. S. Hwang, «Sprayable anti-adhesive hydrogel for peritoneal macrophage scavenging in post-surgical applications», *Nat. Commun.*, vol. 15, fasc. 1, p. 8364, set. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-52753-0.

[131] P. Qi, Y. G. Zheng, S. Ohta, N. Kokudo, K. Hasegawa, e T. Ito, «In Situ Fabrication of Double-Layered Hydrogels via Spray Processes to Prevent Postoperative Peritoneal Adhesion», *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, fasc. 9, pp. 4790–4798, set. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00791.

[132] M. Ruggeri *et al.*, «The role of chitosan in modulating physicochemical and biological behavior of solid lipid nanoparticles», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 335, p. 149153, gen. 2026, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.149153.

[133] M. Danaei *et al.*, «Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems», *Pharmaceutics*, vol. 10, fasc. 2, p. 57, mag. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.

[134] F. Saporito *et al.*, «In Situ Gelling Scaffolds Loaded with Platelet Growth Factors to Improve Cardiomyocyte Survival after Ischemia», *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, fasc. 1, pp. 329–338, gen. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b01064.

[135] S. Thirumala, J. Gimble, e R. Devireddy, «Methylcellulose Based Thermally Reversible Hydrogel System for Tissue Engineering Applications», *Cells*, vol. 2, fasc. 3, pp. 460–475, giu. 2013, doi: 10.3390/cells2030460.

[136] C.-H. Chen *et al.*, «Injectable thermosensitive hydrogel containing hyaluronic acid and chitosan as a barrier for prevention of postoperative peritoneal adhesion», *Carbohydr. Polym.*, vol. 173, pp. 721–731, ott. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.019.

[137] J. Lu *et al.*, «Hyaluronidase: structure, mechanism of action, diseases and therapeutic targets», *Mol. Biomed.*, vol. 6, fasc. 1, p. 50, lug. 2025, doi: 10.1186/s43556-025-00299-y.