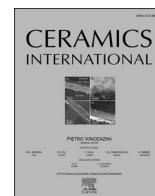




Contents lists available at ScienceDirect

Ceramics International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceramint

Emulsion-based multi-responsive microspheres for the delivery of lipophilic Ozoile

Gianluca Ciarleglio^{a,b,*}, Serena Vella^b, Elisa Toto^a, M. Gabriella Santonicola^{a,**}

^a Department of Chemical Engineering Materials Environment, Sapienza University of Rome, Italy

^b Erbagil s.r.l., Via Luigi Settembrini 13, 82037, Telesse Terme, BN, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Hydrogel microspheres
Biomedical applications
Extrusion
Chemical properties
Thermal properties

ABSTRACT

I polimeri naturali e biodegradabili pH-responsive, come l'alginato e il chitosano, sono ampiamente utilizzati per applicazioni di somministrazione di farmaci, soprattutto sotto forma di microsfele biocompatibili. Inoltre, il poli(N-isopropil-acrilammide) thermo-responsive (PNIPAM) viene spesso aggiunto ai sistemi di somministrazione biomedica grazie alla sua lower critical solution temperature vicina alle condizioni fisiologiche. In questo lavoro, microsfele multiresponsive (MRM) costituite da una matrice hydrogel di alginato, chitosano e PNIPAM sono state preparate mediante extrusion dripping e proposte come sistema di rilascio di Ozoile (Ozonidi stabili) derivato da olio di oliva biologico. L'Ozoile agisce come induttore biologico, regolando le principali vie metaboliche e stimolando il sistema di difesa endogeno. Le MRM contenenti Ozoile sono state preparate a partire da emulsioni di alginato/NIPAM che integrano il principio bioattivo lipofilo. Le MRM sono state ulteriormente ottimizzate con un rivestimento di chitosano per migliorarne la stabilità e controllare il comportamento di degradazione della matrice hydrogel, con conseguente rilascio di Ozoile. I risultati in termini di composizione chimica ottenuti con la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), le proprietà termo-responsive ottenute con l'analisi calorimetrica a scansione differenziale (DSC), il rigonfiamento e il comportamento di degradazione sono stati utilizzati per stabilire il potenziale uso delle MRM per il rilascio terapeutico di Ozoile in specifici siti infiammatori.

1. Introduction

Gli hydrogel sono definiti come reti tridimensionali (3D) di polimeri idrofili reticolati in grado di assorbire e trattenere grandi quantità di acqua [1–3]. Gli hydrogel sono ampiamente utilizzati come sistemi di rilascio di farmaci in molte branche della medicina [4,5] per le loro notevoli proprietà, come la struttura tridimensionale, l'elevata biocompatibilità, la somiglianza con i tessuti viventi e le caratteristiche fisiche regolabili [6]. Le microsfele di alginato sono utilizzate come sistema di somministrazione controllata di farmaci, rilasciando il farmaco a velocità controllata e superando i problemi dei sistemi di somministrazione convenzionali, migliorando così l'efficacia terapeutica di un determinato farmaco [7,8]. I sistemi di somministrazione di farmaci basati su stimoli offrono enormi e promettenti vantaggi nella prevenzione, nella diagnosi e nel trattamento di molte malattie [9]. Questi sistemi di rilascio sono in grado di rispondere a stimoli interni (pH, temperatura e condizioni redox) ed esterni (campo magnetico, campo a ultrasuoni e luce) [10–12]. Tra i polimeri thermo-responsive, il poli(N-isopropil-acrilammide) (PNIPAM) è largamente utilizzato nella ricerca biomedica grazie alle sue caratteristiche di biocompatibilità e lower critical solution temperature (LCST) vicina alle

condizioni fisiologiche [13]. Il NIPAM è composto da gruppi amidici idrofili (–CONH–) e da catene laterali isopropiliche idrofobiche (–CH(CH₃)₂) [14,15], e in soluzione esibisce il valore di LCST a 32 °C [16,17]. Le soluzioni di PNIPAM assumono uno stato di sol a temperatura ambiente e possono trasformarsi in uno stato di gel quando si avvicinano a 37°C [18]. Il PNIPAM è stato utilizzato per un'ampia gamma di applicazioni in ambito biomedico, come la terapia cellulare [19,20], veicolazione di farmaci [21], e scaffold per l'ingegneria tissutale. In particolare, la sensibilità alla temperatura del PNIPAM e la sensibilità al pH dell'alginato [22] è estremamente utile per il rilascio di ozonidi stabili (Ozoile) in siti specifici.

Ozoile è una formulazione bioattiva ottenuta per ozonizzazione dell'olio di oliva biologico, noto per indurre la generazione di un moderato stress ossidativo in ambienti caratterizzati da un aumento di protoni, come i tessuti ischemici, ipossici o danneggiati [23]. In particolare, gli ozonidi stabili rilasciano ossigeno molecolare con produzione di specie radicaliche, causando un moderato stress ossidativo che stimola l'espressione di diversi enzimi antiossidanti mediante l'attivazione del fattore 2 correlato al fattore nucleare eritroide 2 (Nrf2).

* Corresponding author. Department of Chemical Engineering Materials Environment, Sapienza University of Rome, Italy.

** Corresponding author.

E-mail addresses: gianluca.ciarleglio@uniroma1.it (G. Ciarleglio), mariagabriella.santonicola@uniroma1.it (M.G. Santonicola).

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.12.095>

Received 30 August 2022; Received in revised form 7 December 2022; Accepted 12 December 2022

Available online 13 December 2022

0272-8842/© 2022 Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. All rights reserved.

Il moderato ambiente pro-ossidante porta alla stimolazione di meccanismi molecolari che possono sopprimere la risposta infiammatoria [24]. Ad esempio, lo stress ossidativo può indurre l'espressione del fattore 1α inducibile dall'ipossia (HIF- 1α), che è un fattore di trascrizione principalmente associato alle risposte adattative delle cellule all'ipossia. HIF- 1α induce l'espressione di diversi geni, tra questi ci sono fattori di crescita come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita trasformante- α (TGF- α) e TGF- β , che sono coinvolti nel complesso processo a più fasi della rigenerazione tissutale [24].

In questo lavoro, microsfere di hydrogel sensibili alla temperatura e al pH sono state fabbricate a partire dai polimeri PNIPAM e alginato. Usando un approccio basato sull'emulsione, Ozoile è stato incorporato nelle microsfere multi-reattive (MRM) con l'obiettivo di raggiungere siti infiammatori mirati per scopi terapeutici. La fabbricazione delle microsfere contenenti Ozoile è stata sviluppata e ottimizzata e il metodo ad ultrasuoni ad alta intensità (HIU) utilizzato per ottenere emulsioni stabili. Sono stati inoltre preparate MRM/Ozoile rivestite con chitosano, allo scopo di migliorare la risposta al pH. Infatti, la presenza di ammine primarie sui residui di glucosamina rende il chitosano un policatione pH-responsivo [25]. Le proprietà delle microsfere vengono studiate utilizzando diverse tecniche. In particolare, la composizione chimica delle MRM viene esaminata mediante spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), mentre la calorimetria a scansione differenziale (DSC) viene utilizzata per analizzare le proprietà termo-reattive, determinando la temperatura critica di transizione e la frazione di acqua legata. Al fine di valutare il comportamento multi-reattivo delle microsfere contenenti Ozoile, vengono presentati test di degradazione a diversi valori di pH (3, 4, 5, 7,4) e a diverse temperature (20 °C, 37 °C). È stato analizzato anche il ruolo del rivestimento in chitosano per valutare la sua influenza sul rilascio controllato di Ozoile. I risultati in termini di comportamento termo-pH-responsive, rigonfiamento e degradazione sono utili per stabilire il potenziale uso delle MRM a base di emulsione per il rilascio terapeutico di Ozoile in specifici siti infiammatori.

2. Experimental methodology

2.1. Materials

Acido alginico sale sodico, cloruro di calcio (CaCl_2) diidrato, polietilenglicole sorbitan monooleato (Tween 80), gomma di xantano, N-isopropilacrilammide (NIPAM), N,N'-metilenebisacrilammide (MBA) e chitosano (peso molecolare medio, >75 % deacetilato) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Perossodisolfato di ammonio (APS), N, N, N', N'-Tetrametil etilendiammina (TEMED) sono stati acquistati da PanReach AppliChem (Milano, Italia). Ozoile (Ozonidi Stabili) è un formulato ottenuto da un processo di miscelazione brevettato in cui una miscela ossigeno-ozono viene legata a legami olefinici di acidi grassi di olio di oliva biologico formando ozonidi stabili. L'acqua deionizzata (resistività 18,2 M Ω cm) è stata prodotta da un sistema di purificazione dell'acqua Direct-Q3 UV (Millipore, Molsheim, Francia) e utilizzata in tutte le preparazioni.

2.2. Synthesis of hydrogel MRMs

Alginato di sodio e NIPAM sono stati miscelati in acqua deionizzata in un rapporto di 1:8 (w/w). La soluzione è stata miscelata per 30 minuti in un bagno di acqua fredda utilizzando un agitatore magnetico (C-MAG HS7, IKA, Staufen, Germania). Ozoile (20 wt%), il tensioattivo non ionico Tween 80 (5 w/v%), l'emulsionante gomma di xantano (0,25 w/v%) e il catalizzatore per la polimerizzazione di acrilammide e bis-acrilammide TEMED (0,15 v/v%) sono stati aggiunti alla soluzione ed è stata ottenuta un'emulsione stabile utilizzando il metodo degli ultrasuoni ad alta intensità (HIU) [26]. Il processo è stato eseguito utilizzando l'omogeneizzatore ad ultrasuoni portatile (UP200Ht, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germania) per 5 minuti al 50% di potenza. Per la preparazione delle microsfere, l'emulsione è stata fatta gocciolare, utilizzando una siringa da 0,26 mm collegata ad una pompa a siringa, in un bagno gelificante contenente una soluzione fredda con CaCl_2 (20% w/v) e APS (2% w/v) precedentemente spurgati con azoto per 15 minuti per rimuovere completamente qualsiasi residuo di ossigeno.

La distanza di raccolta è stata ottimizzata e fissata a 10 cm per ottenere microsfere sferiche. Una delicata miscelazione è stata applicata alla soluzione di CaCl_2 /APS per impedire l'adesione delle microsfere. Il tempo di reticolazione delle MRM è stato fissato a 18 ore. Le microsfere sono state purificate tre volte con acqua deionizzata per rimuovere il monomero non reagito, il reticolante, l'iniziatore e gli ioni calcio liberi. Le microsfere rivestite di chitosano sono state preparate mediante miscelazione su vortex in una soluzione di chitosano allo 0,5% in peso utilizzando una velocità di agitazione di 700 rpm per 30 min.

2.3. Characterization methods

Per valutare la morfologia, la forma e le dimensioni delle MRM è stata utilizzata una fotocamera digitale con una risoluzione di 12 megapixel. La dimensione media delle MRM è stata misurata utilizzando il software ImageJ (versione 1.53).

Per determinare il rapporto di rigonfiamento e il contenuto di acqua, le microsfere di hydrogel sono state prima state completamente idratate in acqua deionizzata e poi essiccate a 50 °C per 18 ore. Il rapporto di rigonfiamento e il contenuto di acqua sono stati calcolati utilizzando le seguenti equazioni[27]:

$$\text{Swelling Ratio} = \frac{W_s}{W_d} \quad (1)$$

$$\% \text{ water content} = \frac{(W_s - W_d)}{W_s} \times 100 \quad (2)$$

dove W_s è il peso dell'hydrogel nello stato di rigonfiamento all'equilibrio e W_d il peso dell'hydrogel completamente essiccato. Il test è stato ripetuto su 5 campioni per ogni tipologia di microsfere e i risultati sono stati mediati.

Gli spettri di spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FTIR) degli MRM sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Nicolet Summit (Thermo Fisher Scientific, USA) con un accessorio ATR al seleniuro di zinco. Gli spettri IR sono stati acquisiti nella regione di 4000-800 cm^{-1} , con una risoluzione di 4 cm^{-1} , e ogni spettro è stato acquisito calcolando una media di 32 scansioni.

La temperatura di transizione volumetrica di fase (VPT) e la frazione di acqua legata (X_{BW}) delle MRM sono state valutate utilizzando la calorimetria a scansione differenziale. È stato utilizzato lo strumento Pyris DSC 8500 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) calibrato con indio e stagno ad alta purezza. I campioni sono stati sigillati in pan di alluminio con coperchi e le misure sono state eseguite sotto un flusso costante di azoto (20 mL/min). Un pan vuoto identico è stato preso come riferimento.

Per la determinazione del VPT, sono stati misurati campioni di hydrogel idratati (3 campioni, ~ 25 mg) nell'intervallo di temperatura da 25 °C - 50 °C a una velocità di riscaldamento di 10 °C/min. Per la determinazione di X_{BW} , le microsfere idratate (3 campioni, ~ 25 mg) sono state analizzate nell'intervallo di temperatura da -30 °C/30 °C a una velocità di riscaldamento di 10 °C/min. X_{BW} è stato calcolato secondo la seguente equazione (Eq. (3)) [28]:

$$X_{BW} = X_{TW} - \frac{Q_{\text{endo}}}{Q_f} \quad (3)$$

dove Q_{endo} è il calore di fusione dell'acqua congelabile che si ottiene dal termogramma DSC (J/g) calcolando l'area del picco con il software PerkinElmer Thermal Analysis, Q_f indica il calore di fusione dell'acqua pura (333 J/g) [29] e X_{TW} è la frazione di acqua totale ed è stata calcolata secondo la seguente equazione (Eq. (4)):

$$X_{TW} = 1 - \frac{M_{\text{DRY}}}{M_{\text{TOTAL}}} \quad (4)$$

con M_{DRY} si indica il peso da secco e M_{TOTAL} il peso totale delle microsfere.

I test di degradazione sono stati eseguiti in acqua deionizzata e in PBS, monitorando il comportamento delle microsfere ogni ora per le prime 4 ore e dopo 24 ore. Per le MRM/Ozoile rivestite di chitosano, i test sono stati condotti in soluzione PBS a diversi pH (3, 4, 5, 7,4) e diverse temperature (20 °C, 37 °C). Inoltre, il ruolo del chitosano è stato determinato monitorando gli MRM/Ozoile con e senza rivestimento a 37 °C in PBS (pH = 7,4) e in acqua deionizzata.

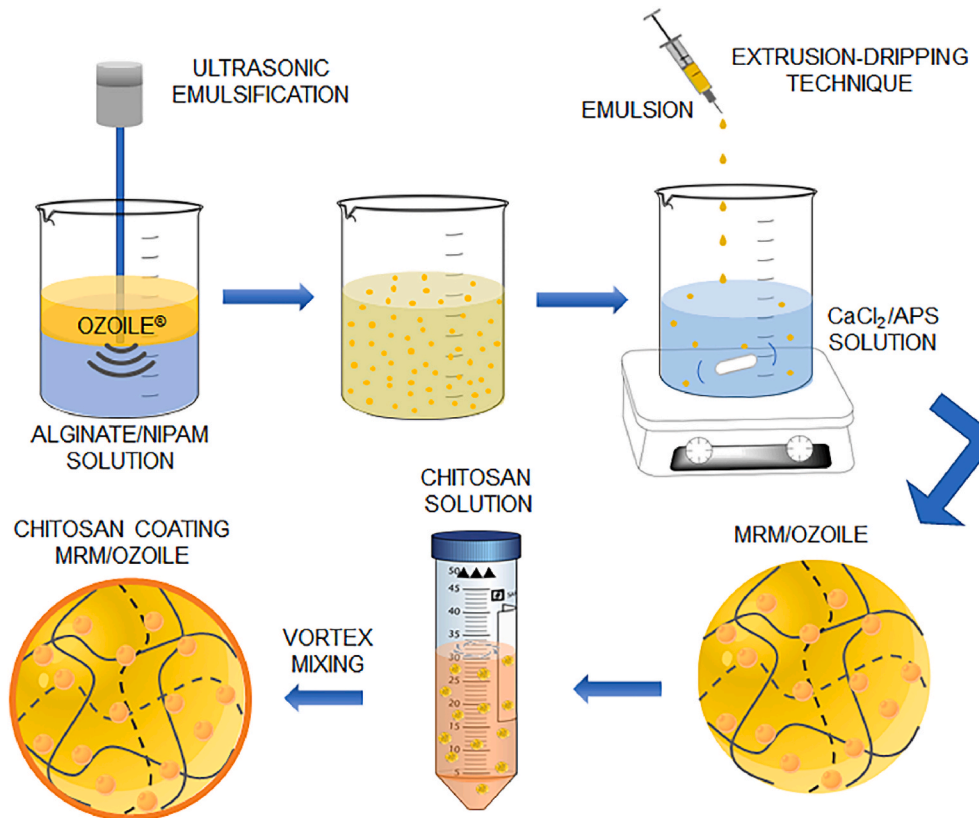


Fig. 1. Rappresentazione schematica del processo di fabbricazione di microsfele multi-reattive (MRM) contenenti Ozoile e con rivestimento di chitosano applicato mediante miscelazione a vortice.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of MRMs containing Ozoile

Il processo di fabbricazione delle microsfele contenenti Ozoile è stato sviluppato e ottimizzato. In particolare, l'omogeneità dell'emulsione preparata con alginato, NIPAM e Ozoile è stata assicurata utilizzando il metodo degli ultrasuoni ad alta intensità (HIU).

La cavitazione acustica indotta dagli ultrasuoni aumenta la frammentazione delle goccioline d'olio, facilitando la formazione di emulsioni stabili olio/acqua (O/W) con goccioline di piccole dimensioni [26]. Le emulsioni sono state preparate attraverso due passaggi: nel primo passaggio, si formano grandi goccioline della fase dispersa nella fase continua, e nel secondo passaggio, il taglio fisico continuo e la cavitazione acustica generati nel mezzo disgregano le grandi goccioline [30].

La tecnica di estrusione è stata utilizzata per fabbricare le MRM e le dimensioni e la forma sono state ottimizzate utilizzando una distanza di raccolta di 10 cm e una siringa di calibro 0,26 mm.

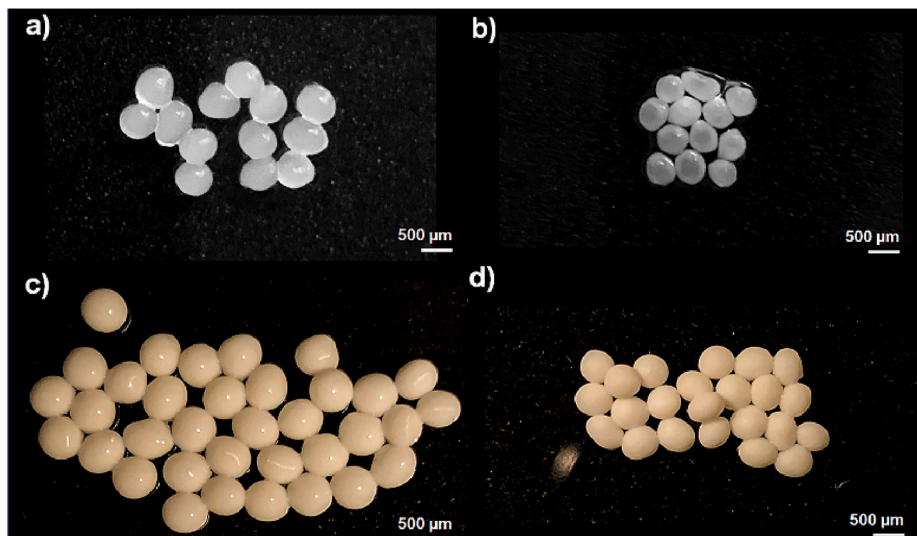


Fig.2. Immagini al microscopio ottico di a) MRM idratati, b) MRM rivestiti con chitosano, c) MRM/Ozoile e d) MRM/Ozoile rivestiti con chitosano.

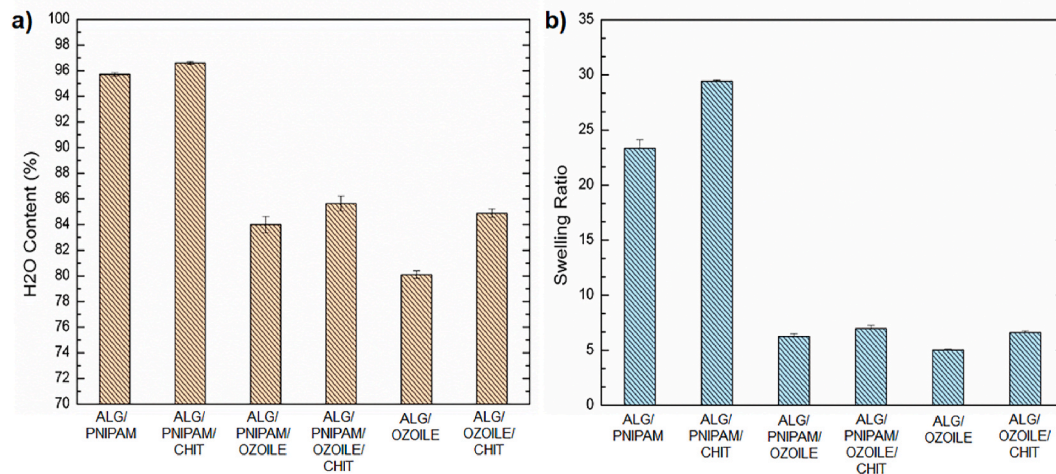


Fig. 3. Rapporto di rigonfiamento e contenuto di acqua di diversi tipi di MRM.

La determinazione di una distanza di raccolta appropriata dipende fortemente dalla viscosità dell'emulsione [31]. In questo studio, la distanza di raccolta è stata determinata per tentativi ed errori regolando la distanza tra estrusore e bagno reticolante. In generale, distanze di raccolta troppo piccole portano alla formazione di microsfele caratterizzate da code, mentre a grandi distanze sono state osservate microsfele di forma irregolare [32].

Il bagno reticolante (CaCl_2/APS) deve essere agitato per prevenire l'aggregazione delle microsfele e per migliorare l'omogeneità della reazione di reticolazione [33,34]. Tuttavia, la scelta di velocità di agitazione troppo elevate può indurre la deformazione delle microsfele, portando ad una forma irregolare dovuta alla formazione di forti forze centrifughe nel bagno reticolante [33]. Inoltre, la velocità di agitazione dovrebbe essere selezionata tenendo conto dell'impatto delle goccioline che potrebbero causare lo sviluppo di microsfele non sferiche o coalescenti [35]. In questo lavoro, una velocità di agitazione di 300 rpm è risultata ottimale per la fabbricazione delle MRM con forma sferica.

Le microsfele sono state agitate continuamente a 20 °C per 18 h al fine di realizzare una completa reticolazione dell'alginato con Ca^{2+} e polimerizzare il PNIPAM. Nel processo di indurimento, gli ioni Na^+ nella struttura dell'alginato vengono sostituiti dagli ioni Ca^{2+} [36–38], e l'APS avvia la polimerizzazione radicalica del PNIPAM formando le microsfele. Durante il processo, i gruppi NH_3^+ del chitosano si legano al $-\text{COO}^-$ dell'alginato mediante legame ionico [39]. Il processo di fabbricazione delle MRM è stato schematizzato in Fig. 1. Il coating di chitosano è stato applicato alle microsfele trasferendole in una soluzione di chitosano e miscelando la sospensione su vortex a 700 rpm. Il valore della velocità di agitazione è stato selezionato dopo aver valutato il suo effetto sulla dimensione e sulla morfologia degli MRM come descritto nella Sezione 3.2.

3.2. Morphological and swelling properties

La Fig. 2 mostra le immagini delle MRM idratate. Queste microsfele sono di forma sferica e con struttura compatta. Le MRM senza rivestimento in chitosano (Fig. 2a) hanno un diametro di $625,7 \pm 8,7 \mu\text{m}$, mentre quelle rivestite con chitosano (Fig. 2b) hanno una dimensione di $408,9 \pm 7,4 \mu\text{m}$. Le MRM contenenti Ozoile senza chitosano (Fig. 2c) e quelle con coating di chitosano (Fig. 2d) sono rispettivamente $631,6 \pm 6,9 \mu\text{m}$ e $443,4 \pm 8,5 \mu\text{m}$. Questi risultati mostrano che il diametro delle MRM è inferiore in presenza di chitosano (velocità di agitazione del vortice di 700 rpm). L'effetto della velocità di agitazione è stato ulteriormente studiato. Sono state sperimentate velocità di agitazione da 500 a 700 rpm e la dimensione risultante di MRM/Ozoile è stata misurata dalle immagini digitali. I risultati sono riassunti nella Tabella 3 e mostrano che il diametro della microsfera diminuisce all'aumentare della velocità di agitazione. Il valore di 700 rpm è stato selezionato per la preparazione di MRM di piccole dimensioni.

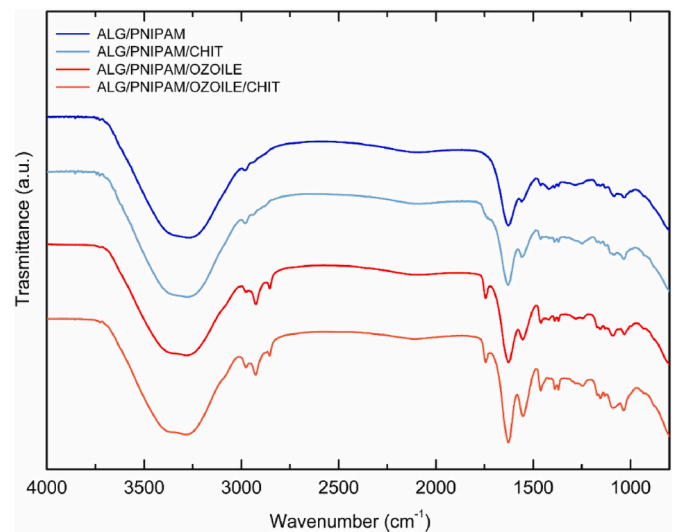


Fig. 4. Spettri FTIR di diversi tipi di MRM. I dati sono compensati per chiarezza.

Infatti, pochi lavori in letteratura riportano che il rivestimento applicato mediante agitazione può indurre il restringimento delle microsfele [40]. Nel nostro caso, ciò potrebbe essere dovuto alla diffusione di molecole di chitosano all'interno della matrice alginato/PNIPAM, che provoca un parziale collasso del reticolo polimerico come conseguenza della neutralizzazione elettrostatica. La diffusione del chitosano è migliorata a velocità di miscelazione più elevate, con conseguente diminuzione delle dimensioni delle microsfele con chitosano.

La Fig. 3 mostra il rapporto di rigonfiamento (Fig. 3a) e il contenuto di acqua (%) (Fig. 3b) delle microsfele di hydrogel a temperatura ambiente. Tutte le microsfele mostrano un contenuto di acqua superiore all'80%, in particolare le MRM di alginato/PNIPAM non caricati mostrano un contenuto di acqua maggiore (>90%) rispetto a quelle con Ozoile (contenuto di acqua 80–85%). La natura idrofobica di Ozoile, infatti, rende la matrice idrogel più idrofoba, abbassando il grado di rigonfiamento delle microsfele. Pertanto, le MRM rivestite con chitosano presentano un contenuto di acqua più elevato rispetto a quelli senza. Questo effetto era già stato osservato in sistemi simili a base di alginato [41] e può essere attribuito ad un aumento della densità di reticolazione delle catene polimeriche dovuto al rivestimento di chitosano [42, 43].

3.3. FTIR analysis

La Fig. 4 mostra gli spettri FTIR di diverse tipologie di MRM. Tutti gli spettri mostrano un'ampia banda di assorbimento a circa 3400 cm^{-1} e a 320 cm^{-1} corrispondente allo stiramento di O-H, e una banda a 2980 cm^{-1} .

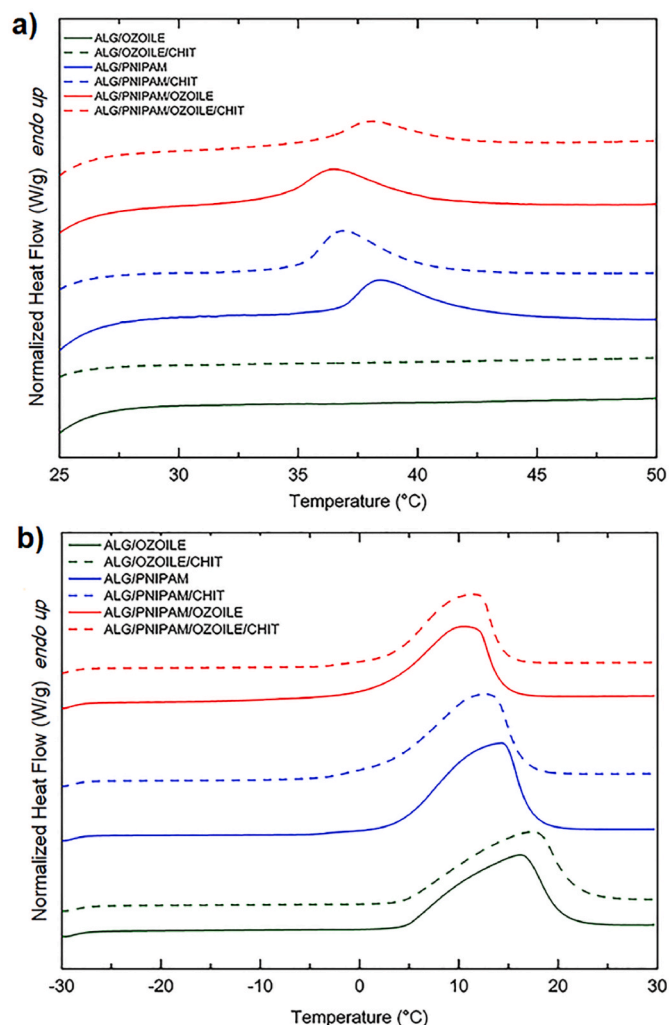


Fig.5. Termogrammi DSC per a) valutazione VPT e b) valutazione X_{BW} di diverse tipologie di MRM con velocità di riscaldamento di 10 °C/min.

che può essere attribuita ai legami alchili -CH dell'alginato [44]. Vibrazioni di stretching asimmetriche e simmetriche dei gruppi metilene (-CH₂) e metile (-CH₃) sono state osservate in MRM/Ozoile con e senza rivestimento chitosano nelle bande caratteristiche tra 2920 e 2850 cm⁻¹, rispettivamente [45]. La vibrazione di stiramento del carbonile (C=O) dal legame estere del triacilglicerolo è stata osservata in MRM/Ozoile con e senza rivestimento di chitosano a circa 1744 cm⁻¹ [46]. La presenza di PNIPAM negli MRM è stata confermata dalle bande caratteristiche tra 1650 e 1500 cm⁻¹ che possono essere attribuite rispettivamente alla banda ammidica I (allungamento C=O) e alla banda ammidica II (vibrazione di flessione nel piano N-H) [47]. I picchi a 1386 cm⁻¹ e 1368 cm⁻¹ derivano dalla scissione dell'accoppiamento delle vibrazioni di flessione simmetriche originate dai due gruppi metilici -CH(CH₃)₂ di PNIPAM [48]. Inoltre, per tutti i tipi di MRM è stata osservata la vibrazione CO-C alle bande intorno a 1033 cm⁻¹, a causa della presenza di unità guloniche nell'alginato di sodio [49].

3.4. Thermal response of MRMs by calorimetry

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è stata utilizzata per analizzare la temperatura di transizione volumetrica di fase (VPT) e la frazione di acqua legata (X_{BW}) delle microsfe. La Fig. 5a mostra i fenomeni endotermici nell'intervallo fisiologico 35 – 40 °C solo per le MRM. Il VPT è guidato dal collasso idrofobico, in particolare quando la temperatura aumenta, si verifica uno squilibrio tra interazioni polimero-acqua idrofile e idrofobiche, che porta al collasso della

Table 1

Valori di transizione volumetrica di fase (VPT) ed entalpia (ΔH_{VPT}) delle microsfe ottenuti dall'analisi DSC.

Sample	VPT (°C)	ΔH_{VPT} (J/g)
ALG/PNIPAM/OZOILE	36.1 ± 0.3	0.78 ± 0.03
ALG/PNIPAM/OZOILE/CHIT	37.9 ± 0.2	0.42 ± 0.03
ALG/PNIPAM	38.5 ± 0.2	0.38 ± 0.02
ALG/PNIPAM/CHIT	36.3 ± 0.2	0.19 ± 0.09

Table 2

Valori della frazione di acqua legata (X_{BW}) ed entalpie di fusione (ΔH_f) delle microsfe ottenuti dall'analisi DSC.

Sample	X_{BW} (%)	ΔH_f (J/g)
ALG/PNIPAM	13.9 ± 0.6	272.2 ± 1.3
ALG/PNIPAM/CHIT	15.7 ± 0.3	269.4 ± 1.1
ALG/PNIPAM/OZOILE	23.4 ± 0.5	201.7 ± 0.4
ALG/PNIPAM/OZOILE/CHIT	27.8 ± 0.9	192.4 ± 1.4
ALG/OZOILE	7.8 ± 0.6	241.4 ± 1.9
ALG/OZOILE/CHIT	9.1 ± 0.5	252.2 ± 1.7

Table 3

Diametro medio di MRM/Ozoile rivestite con chitosano mediante vortex utilizzando diverse velocità di agitazione.

Stirring rate (rpm)	Mean diameter (μm)
500	785.3 ± 10.6
550	651.1 ± 12.4
600	580.3 ± 9.8
650	510.4 ± 14.1
700	443.4 ± 8.5

rete polimerica e alla rapida espulsione di Ozoile [50]. Pertanto, il raggiungimento della temperatura VPT può innescare il rilascio di molecole di interesse, come l'Ozoile incorporato nella rete polimerica. La maggior parte degli autori ha riportato per gli idrogel a base di PNIPAM un VPT a una temperatura di ~32 °C [51-52], mentre qui abbiamo osservato un VPT a una temperatura compresa tra 35 e 40 °C. Questo fenomeno può essere attribuito alla presenza di alginato nella matrice polimerica. Infatti, sebbene non vi siano legami chimici o altre forti interazioni tra l'alginato e il PNIPAM, l'alginato è reticolato e strettamente accoppiato alla rete PNIPAM per formare le microsfe dopo l'aggiunta di Ca²⁺. In questo caso, la principale forza motrice della transizione di fase rimane l'interazione tra i gruppi isopropilico e ammidico nella spina dorsale PNIPAM, ma a causa della presenza di alginato, il movimento delle catene PNIPAM richiede più energia per guidare la transizione idrofila-idrofobica, con conseguente aumento della temperatura VPT [53].

I valori di VPT e i corrispondenti valori di entalpia (ΔH_{VPT}) sono stati calcolati ed elencati nella Tabella 1. In presenza di Ozoile, VPT è anticipato da 38,5 °C a 36,1 °C, e questo può essere correlato all'interazione idrofobica tra Ozoile e le unità monomeriche delle microsfe [54]. Le MRM a base di alginato e PNIPAM mostrano un'entalpia, associata a VPT, inferiore (0,38 J/g) rispetto alle MRM/Ozoile (0,78 J/g). Questo risultato è dovuto all'effetto predominante dell'alginato, che in assenza di Ozoile induce una migliore e più forte idratazione delle catene polimeriche implicando meno legami idrogeno rotti durante la transizione di fase [55]. Inoltre, per le MRM/Ozoile, il picco VPT viene ritardato quando viene applicato il rivestimento di chitosano, suggerendo un effetto stabilizzante del coating. La Fig. 5b mostra il termogramma DSC di MRM completamente rigonfi. Il picco endotermico appare nell'intervallo tra 5 e 20 °C ed è attribuibile alla presenza di acqua libera negli idrogel. I valori dell'entalpia di fusione (ΔH_f) e della frazione di acqua legata (X_{BW}) sono stati calcolati ed elencati nella Tabella 2.

Le microsfe a base di alginato e PNIPAM presentano

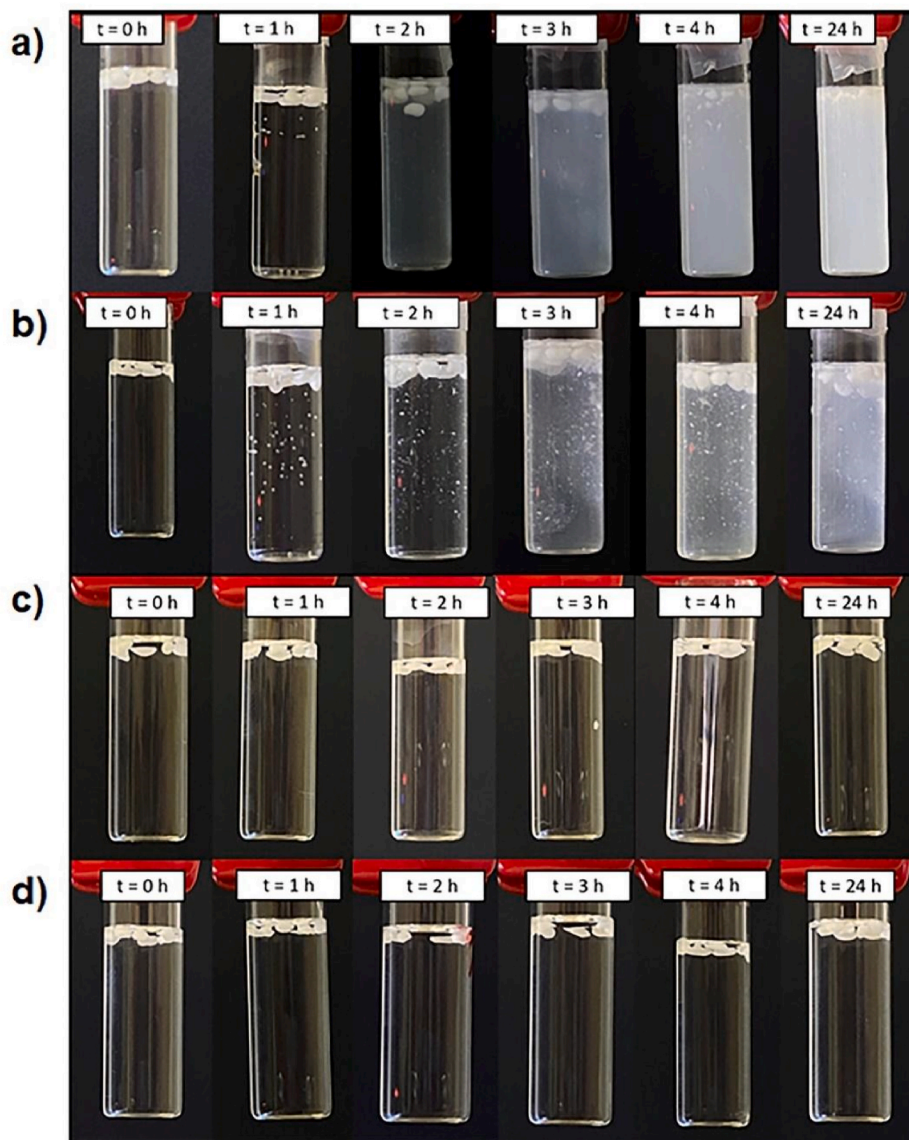


Fig. 6. Test di degradazione eseguiti a 37 °C in PBS (pH = 7,4) (a, b) e in acqua deionizzata (c, d) su MRM/Ozole senza rivestimento (a, c) e su MRM/Ozole con rivestimento in chitosano (b, D). Degradazione valutata ogni ora per le prime 4 h e dopo 24 h.

un XBW (13.9%) associato a una VPT più elevata rispetto a quelle osservate per MRM/Ozole (23.4%). In generale, le transizioni VPT si spostano verso temperature più elevate man mano che la quantità di acqua legata e il contenuto di acqua libera e interfacciale diminuisce [56,57].

3.5. Degradation tests

Il comportamento di degradazione delle MRM/Ozole è stato analizzato a diverse temperature (20 °C e 37 °C) e a diversi valori di pH (3, 4, 5, 7,4), in acqua deionizzata e in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). È stato anche valutato l'effetto dell'aggiunta di chitosano sulle microsfeere contenenti Ozole, confrontando la stabilità delle MRM in PBS (pH = 7,4) e in acqua deionizzata (Fig. 6). In soluzione PBS, gli ioni Na^+ avviano un processo di scambio ionico con i cationi Ca^{2+} che sono principalmente legati ai gruppi $-\text{COO}^-$ dei blocchi di alginato maluronico. Nella fase iniziale di questo processo, il rilascio di cationi di calcio è guidato dalla diffusione. Di conseguenza, i gruppi carbossilici caricati negativamente ($-\text{COO}^-$) nella matrice polimerica diventano predominanti e la repulsione elettrostatica associata tra di loro induce il rilassamento delle catene polimeriche e il rigonfiamento. Questo risultato è mostrato in Fig. 6 ed è in accordo con il lavoro riportato in precedenza [58].

La Fig. 6a mostra il processo di degradazione delle MRM valutato ogni ora per 4 ore e dopo 24 ore. Nel caso di MRM rivestite con chitosano (Fig. 6b), il processo di degradazione appare ritardato nel tempo e questo effetto può essere attribuito all'interazione tra $-\text{COO}^-$ dell'alginato e NH_3^+ del chitosano. In acqua deionizzata, lo scambio ionico non avviene e non si verifica la degradazione delle MRM, come mostrato in Fig. 6c e d. La Fig. 7 mostra i test di degradazione su MRM contenenti Ozole con rivestimento in chitosano eseguiti a diverse temperature (20 °C, 37 °C) e a diversi valori di pH (3, 4, 5, 7,4). In questo caso, la degradazione delle microsfeere è fortemente dipendente dal pH e dalla temperatura. Infatti la degradazione non si verifica per valori di pH 3, 4, 5 alle due diverse temperature (20 °C, 37 °C), mentre è presente a pH = 7,4. Inoltre, osserviamo che a pH 7,4 la degradazione è più veloce alla temperatura più alta (37 °C) che a 20 °C. Questi risultati combinati mostrano che le MRM sono sensibili sia alla temperatura che al pH e che il rilascio di Ozole avviene dopo la degradazione della matrice di idrogel.

4. Conclusions

Le microsfeere multi-reattive (MRM) a base di alginato/chitosano/PNIPAM sono state sviluppate ed utilizzate come vettori di Ozole,

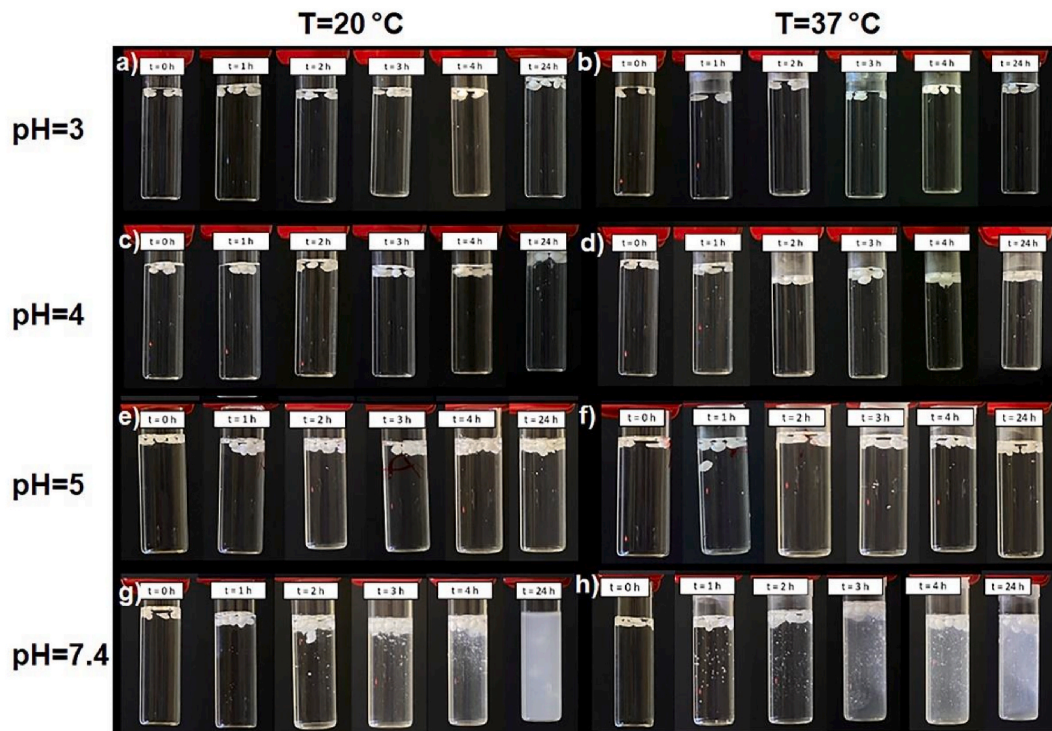


Fig. 7. Test di degradazione di microsferi multi-reativi contenenti Ozoile con rivestimento in chitosano a 20 °C (a, c, e, g) e 37 °C (b, d, f, h) ea diversi valori di pH. Degradazione valutata ogni ora per le prime 4 h e dopo 24 h.

ozonidi stabili derivati dall'olio d'oliva biologico prodotto in un processo brevettato. Il processo di fabbricazione è stato sviluppato e ottimizzato, sfruttando il metodo degli ultrasuoni ad alta intensità (HIU) per ottenere emulsioni stabili e la tecnica dell'extrusion dripping è stata utilizzata per reticolare la maglia polimerica.

Le proprietà delle microsferi sono state studiate utilizzando diverse tecniche. In particolare, la composizione chimica delle MRM è stata esaminata mediante spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), che ha confermato la presenza di Ozoile nelle MRM. L'analisi ottica ha rivelato la forma sferica con struttura compatta delle MRM, mentre l'analisi eseguita utilizzando il software ImageJ ha evidenziato che il diametro delle MRM è inferiore a 650 μm e inferiore in presenza di rivestimento in chitosano (450 μm). L'analisi del rapporto di rigonfiamento ha rivelato l'alto contenuto di acqua (>80%) delle MRM, indicando la loro idoneità a mimare aspetti specifici dei microambienti tissutali.

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è stata utilizzata per analizzare le proprietà termo-reative delle MRM, determinando la temperatura di transizione critica. Il fenomeno endotermico appare nell'intervallo fisiologico 35 – 40 °C, portando al collasso della rete polimerica e alla rapida espulsione di Ozoile. Inoltre, è stata valutata la degradazione in acqua deionizzata e soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) a diversi pH e temperature. MRM/Ozoile mostrano una degradazione solo in PBS e i test hanno rivelato l'influenza del rivestimento di chitosano sul processo, che agisce ritardando il rilascio di Ozoile. Pertanto, i risultati in termini di comportamento termo-pH-responsivo, rigonfiamento e degradazione hanno rivelato il potenziale utilizzo degli MRM per il rilascio terapeutico di Ozoile in specifici siti infiammatori.

Author contributions

Conceptualization, M.G.S.; methodology, G.C., S.V., E.T., M.G.S.; validation, S.V., E.T., M.G.S.; formal analysis, G.C., E.T.; investigation, G.C.; writing—original draft preparation, G.C.; writing—review and editing, S.V., E.T., M.G.S.; supervision, M.G.S. All authors have read and agreed to the published version of the

Declaration of competing interest manuscript.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This work was financially supported by Sapienza University of Rome (Advanced Responsive Polymer Interfaces for Biological Applications, grant n. PH118164368214F8).

References

- [1] X. Liu, Q. Lin, Y. Yan, F. Peng, R. Sun, J. Ren, Hemicellulose from plant biomass in medical and pharmaceutical application: a critical review, *Curr. Med. Chem.* 26 (2019) 2430–2455.
- [2] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016), 16071.
- [3] K.K. Kim, D.W. Pack, Microspheres for drug delivery, in: M. Ferrari, A.P. Lee, L. J. Lee (Eds.), *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology: Volume I Biological and Biomedical Nanotechnology*, Springer US, Boston, MA, 2006, pp. 19–50.
- [4] B.R. Freedman, A. Kuttler, N. Beckmann, S. Nam, D. Kent, M. Schulte, F. Ramazani, N. Accart, A. Rock, J. Li, M. Kurz, A. Fisch, T. Ullrich, M.W. Hast, Y. Tinguely, E. Weber, D.J. Mooney, Enhanced tendon healing by a tough hydrogel with an adhesive side and high drug-loading capacity, *Nat. Biomed. Eng.* 6 (2022) 1167–1179.
- [5] N. Joshi, J. Yan, S. Levy, S. Bhagchandani, K.V. Slaughter, N.E. Sherman, J. Amirault, Y. Wang, L. Riegel, X. He, T.S. Rui, M. Valic, P.K. Vemula, O. R. Miranda, O. Levy, E.M. Gravallesse, A.O. Aliprantis, J. Ermann, J.M. Karp, Towards an arthritis flare-responsive drug delivery system, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1275.
- [6] G. Sharifzadeh, H. Hosseinkhani, Biomolecule-responsive hydrogels in medicine, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017), 1700801.
- [7] N.T. Thanh Uyen, Z.A. Abdul Hamid, L.A. Thi, N.B. Ahmad, Synthesis and characterization of curcumin loaded alginate microspheres for drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 58 (2020), 101796.
- [8] T. Athamneh, A. Amin, E. Benke, R. Ambrus, C.S. Leopold, P. Gurikov, I. Smirnova, Alginate and hybrid alginate-hyaluronic acid aerogel microspheres as potential carrier for pulmonary drug delivery, *J. Supercrit. Fluids* 150 (2019) 49–55.

- [9] M.A. Rahim, N. Jan, S. Khan, H. Shah, A. Madni, A. Khan, A. Jabar, S. Khan, A. Elhissi, Z. Hussain, Recent advancements in stimuli responsive drug delivery platforms for active and passive cancer targeting, *Cancers* 13 (2021) 670.
- [10] S. Tan, K. Saito, M.T.W. Hearn, Stimuli-responsive polymeric materials for separation of biomolecules, *Curr. Opin. Biotechnol.* 53 (2018) 209–223.
- [11] A.S. Hoffman, Stimuli-responsive polymers: biomedical applications and challenges for clinical translation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 10–16.
- [12] P.K. Bolla, V.A. Rodriguez, R.S. Kalhapure, C.S. Kolli, S. Andrews, J. Renukuntla, A review on pH and temperature responsive gels and other less explored drug delivery systems, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 46 (2018) 416–435.
- [13] H. Kim, A. Jo, S. Baek, D. Lim, S.-Y. Park, S.K. Cho, J.W. Chung, J. Yoon, Synergistically enhanced selective intracellular uptake of anticancer drug carrier comprising folic acid-conjugated hydrogels containing magnetite nanoparticles, *Sci. Rep.* 7 (2017), 41090.
- [14] M. Karimi, P. Sahandi Zangabad, A. Ghasemi, M. Amiri, M. Bahrami, H. Malekzad, H. Ghahramanzadeh Asl, Z. Mahdich, M. Bozorgomid, A. Ghasemi, Temperature-responsive smart nanocarriers for delivery of therapeutic agents: applications and recent advances, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (2016) 21107–21133.
- [15] X. Xu, Y. Liu, W. Fu, M. Yao, Z. Ding, J. Xuan, D. Li, S. Wang, Y. Xia, M. Cao, Poly (N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive composite hydrogels for biomedical applications, *Polymers* 12 (2020) 580.
- [16] A.R. Kim, S.L. Lee, S.N. Park, Properties and in vitro drug release of pH-and temperature-sensitive double cross-linked interpenetrating polymer network hydrogels based on hyaluronic acid/poly (N-isopropylacrylamide) for transdermal delivery of luteolin, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 731–740.
- [17] D. Zhao, W. Ma, R. Wang, X. Yang, J. Li, T. Qiu, X. Xiao, The preparation of Green Fluorescence-Emissioned Carbon dots/poly (N-isopropylacrylamide) temperature-sensitive hydrogels and research on their properties, *Polymers* 11 (2019) 1171.
- [18] M. Oak, R. Mandke, J. Singh, Smart polymers for peptide and protein parenteral sustained delivery, *Drug Discov. Today Technol.* 9 (2012) e131–e140.
- [19] T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezū, T. Okano, Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces, *Circ. Res.* 90 (2002) e40–e48.
- [20] N. Takeda, E. Nakamura, M. Yokoyama, T. Okano, Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses, *J. Contr. Release* 95 (2004) 343–355.
- [21] A. Chilkoti, M.R. Dreher, D.E. Meyer, D. Raucher, Targeted drug delivery by thermally responsive polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 613–630.
- [22] J.H. Kim, S.B. Lee, S.J. Kim, Y.M. Lee, Rapid temperature/pH response of porous alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Polym. J.* 43 (2002) 7549–7558.
- [23] T. Russo, M. Currò, N. Ferlazzo, D. Caccamo, P. Perrone, S. Arena, E. Antonelli, P. Antonuccio, R. Lentile, C. Romeo, Stable ozonides with vitamin E acetate versus corticosteroid in the treatment of lichen sclerosis in foreskin: evaluation of effects on inflammation, *Urol. Int.* 103 (2019) 459–465.
- [24] M. Currò, T. Russo, N. Ferlazzo, D. Caccamo, P. Antonuccio, S. Arena, S. Parisi, P. Perrone, R. Lentile, C. Romeo, Anti-inflammatory and tissue regenerative effects of topical treatment with ozonated olive oil/vitamin E acetate in balanitis xerotica obliterans, *Molecules* 23 (2018) 645.
- [25] H.-H. Chang, N.-C. Cheng, Y.-C. Ethan Li, J.-H. Wang, T.-H. Young, pH-responsive characteristics of chitosan-based blends for controlling the adhesivity of cells, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 111 (2020) 34–43.
- [26] A. Taha, E. Ahmed, A. Ismaiel, M. Ashokkumar, X. Xu, S. Pan, H. Hu, Ultrasonic emulsification: an overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions, *Trends Food Sci. Technol.* 105 (2020) 363–377.
- [27] A.S. Kipcak, O. Ismail, I. Doymaz, S. Piskin, Modeling and investigation of the swelling kinetics of acrylamide-sodium acrylate hydrogel, *J. Chem.* (2014) 2014.
- [28] T. Wang, S. Gunasekaran, State of water in chitosan–PVA hydrogel, *J. Appl. Polym. Sci.* 101 (2006) 3227–3232.
- [29] D.E. Gray, American Institute of Physics (Aip). Handbook, American Institute of Physics handbook, 1963.
- [30] T.S.H. Leong, S. Manickam, G.J. Martin, W. Li, M. Ashokkumar, *Ultrasonic Production of Nano-Emulsions for Bioactive Delivery in Drug and Food Applications*, Springer 2018.
- [31] E.-S. Chan, B.-B. Lee, P. Ravindra, D. Poncet, Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009) 63–72.
- [32] G. Fundueanu, C. Nastrozzi, A. Carpov, J. Desbrieres, M. Rinaudo, Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods, *Biomaterials* 20 (1999) 1427–1435.
- [33] J.-W. Woo, H.-J. Rob, H.-D. Park, C.-I. Ji, Y.-B. Lee, S.-B. Kim, Sphericity optimization of calcium alginate gel beads and the effects of processing conditions on their physical properties, *Food Sci. Biotechnol.* 16 (2007) 715–721.
- [34] M.I. Brachkova, M.A. Duarte, J.F. Pinto, Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. in calcium alginate beads, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 41 (2010) 589–596.
- [35] D. Serp, E. Cantana, C. Heinzen, U. Von Stockar, I. Marison, Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (2000) 41–53.
- [36] A. Raha, S. Bhattacharjee, P. Mukherjee, M. Paul, A. Bagchi, Design and characterization of ibuprofen loaded alginate microspheres prepared by ionic gelation method, *Int. J. Pharma. Res. Health Sci* 6 (2018) 2713–2729.
- [37] P. Heng, L. Chan, T. Wong, Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique, *J. Microencapsul.* 20 (2003) 401–413.
- [38] N.T.T. Uyen, Z.A.A. Hamid, N.X.T. Tram, N. Ahmad, Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review, *Int. J. Biol. Macromol.* 153 (2020) 1035–1046.
- [39] S.E. Cahyaningrum, N. Herdyastuti, N. Qomariah, Synthesis and characterization of chitosan-alginate for controlled release of isoniazid drug, *Indones. J. Chem.* 15 (2015) 16–21.
- [40] L. Frank, G. Onzi, A. Morawski, A. Pohlmann, S. Guterres, R. Contri, Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications, *React. Funct. Polym.* 147 (2020), 104459.
- [41] C. Dima, L. Pătrașcu, A. Cantaragiu, P. Alexe, Ș. Dima, The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules, *Food Chem.* 195 (2016) 39–48.
- [42] H. Chopra, S. Bibi, S. Kumar, M.S. Khan, P. Kumar, I. Singh, Preparation and evaluation of chitosan/PVA based hydrogel films loaded with honey for wound healing application, *Gels* 8 (2022) 111.
- [43] L.S. Casey, Investigation of chitosan-PVA composite films and their adsorption properties, *GEP* 3 (2015) 78.
- [44] L. Blemur, T.C. Le, L. Marocci, P. Pietrangeli, M.A. Mateescu, Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63 (2016) 344–353.
- [45] A. Rohman, Y.B. Che Man, Quantification and Classification of Corn and Sunflower Oils as Adulterants in Olive Oil Using Chemometrics and FTIR Spectra, *Sci. World J.*, (2012) 250795.
- [46] M.-A. Poiana, E. Alexa, M.-F. Munteanu, R. Gligor, D. Moigradean, C. Mateescu, Use of ATR-FTIR spectroscopy to detect the changes in extra virgin olive oil by adulteration with soybean oil and high temperature heat treatment, *Open Chem. J.* 13 (2015).
- [47] M.H. Futscher, M. Philipp, P. Müller-Buschbaum, A. Schulte, The role of backbone hydration of poly(N-isopropyl acrylamide) across the volume phase transition compared to its monomer, *Sci. Rep.* 7 (2017), 17012.
- [48] Q. Huang, C. Du, Y. Hua, J. Zhang, R. Peng, X. Yao, Synthesis and characterization of loaded Nano/zinc oxide composite hydrogels intended for anti-mold coatings on bamboo, *Bioresources* 14 (2019) 7134–7147.
- [49] A. Drosos, K. Boura, A. Dima, I.K. Karabagias, P.S. Nigam, M. Kanellaki, A. A. Koutinas, Consolidated bioprocessing of starch based on a bilayer cell factory without genetic modification of yeast, *Environ. Technol. Innovat.* 24 (2021), 101844.
- [50] M.N. Olejniczak, K. Piechocki, M. Kozanecki, K. Koynov, A. Adamus, R.A. Wach, The influence of selected NSAIDs on volume phase transition in poly (2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate) hydrogels, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 1528–1534.
- [51] H. Senff, W. Richtering, Temperature sensitive microgel suspensions: colloidal phase behavior and rheology of soft spheres, *Chem. Phys.* 111 (1999) 1705–1711.
- [52] T.-Y. Wu, A.B. Zrimsek, S.V. Bykov, R.S. Jakubek, S.A. Asher, Hydrophobic collapse initiates the poly (N-isopropylacrylamide) volume phase transition reaction coordinate, *J. Phys. Chem. B* 122 (2018) 3008–3014.
- [53] J. Wu, Z. Wu, X. Sun, S. Yuan, R. Zhang, Q. Lu, Y. Yu, Effect of sodium alginate on the properties of thermosensitive hydrogels, *J. Chin. Chem. Soc.* 64 (2017) 231–238.
- [54] J. Jelken, S.-H. Jung, N. Lomadze, Y.D. Gordievskaya, E.Y. Kramarenko, A. Pich, S. Santer, Tuning the volume phase transition temperature of microgels by light, *Adv. Funct. Mater.* 32 (2022), 2107946.
- [55] S. Petrusic, P. Jovancic, M. Lewandowski, S. Giraud, S. Grujic, S. Ostojic, B. Bugarski, V. Koncar, Properties and drug release profile of poly(N-isopropylacrylamide) microgels functionalized with maleic anhydride and alginate, *J. Mater. Sci.* 48 (2013) 7935–7948.
- [56] S. Shekhar, M. Mukherjee, A.K. Sen, Studies on thermal and swelling properties of Poly (NIPAM-co-2-HEA) based hydrogels, *Adv. Mater. Res.* 1 (2012) 269.
- [57] A. Dixit, D.S. Bag, Highly stretchable and tough thermo-responsive double network (DN) hydrogels: composed of PVA-borax and poly (AM-co-NIPAM) polymer networks, *Eur. Polym. J.* 175 (2022), 111347.
- [58] A. Kikuchi, M. Kawabuchi, A. Watanabe, M. Sugihara, Y. Sakurai, T. Okano, Effect of Ca²⁺-alginate gel dissolution on release of dextran with different molecular weights, *J. Contr. Release* 58 (1999) 21–28.