

# Relazione scientifica finale del programma Short Term Mobility

**Titolo del programma:** Recupero e valorizzazione di scarti di pesce per la realizzazione di sistemi di drug delivery a base di idrossiapatite

**Fruitore straniero:** Dr. Clara Piccirillo

**Proponente:** Dr. Anna Tampieri

L'attività di ricerca è stata svolta da Clara Piccirillo presso l'Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici (ISTEC) dal 10 al 21 Novembre 2014.

In questo periodo sono stati sviluppati due temi di ricerca, e cioè:

- a) studio dell'assorbimento e di farmaci bifosfonati su materiali a base di idrossiapatite naturale.
- b) preparazione e caratterizzazione di materiale a base di idrossiapatite naturale dopata con europio.

## Assorbimento di farmaci bifosfonati

Il farmaco considerato per lo studio di assorbimento è l'alendronato, che è comunemente usato per malattie ossee, quali la osteoporosi. Tale farmaco è stato scelto per la sua affinità con l'idrossiapatite, dovuta alla presenza di gruppi fosfonici in grado di interagire con gli ioni calcio dell'idrossiapatite.

Sono stati studiati 4 diversi campioni di idrossiapatite di originale naturale e cioè:

- A:** materiale carbonato bifasico idrossiapatite – trifosfato di calcio.
- B:** materiale non carbonato bifasico idrossiapatite – trifosfato di calcio.
- C:** idrossiapatite carbonata.
- D:** idrossiapatite non carbonata.

Questi campioni sono stati preparati da spine di baccalà, seguendo il protocollo riportato in letteratura (Piccirillo, 2013). I campioni sono stati sottoposti ad un trattamento di ball milling, e successivamente passati attraverso un setaccio (50  $\mu\text{m}$ ).

Sono stati fatti due diversi tipi di studio dell'assorbimento dell'alendronato; in un primo esperimento è stata considerata una concentrazione costante di alendronato (1.5 mg), con tempi di contatto fra l'alendronato e i campioni di idrossiapatite diversi – 0.5, 1, 2, 4, 7 e 17 ore. In un secondo esperimento, è stato considerato un tempo di contatto costante (17 ore) ma con concentrazioni di alendronato diverse – 0.15, 0.325, 0.75 e 1.5 mg.

La concentrazione dell'alendronato assorbita è stata misurata con la spettroscopia UV-vis; più specificamente, l'alendronato è stato fatto reagire con la ninidrina ed è stato misurato l'assorbimento del complesso formatosi, ad una lunghezza d'onda di 568 nm (Taha, 2003). I risultati dei due esperimenti sono riportati in Figura 1 e 2 rispettivamente.

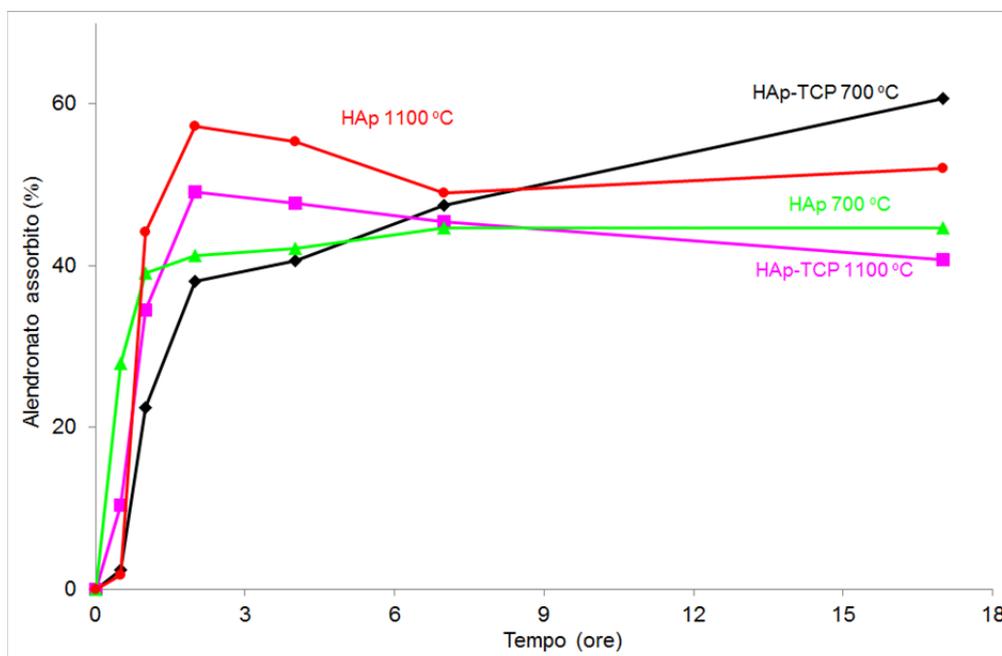


Figura 1. Alendronato assorbito (%) in funzione del tempo.

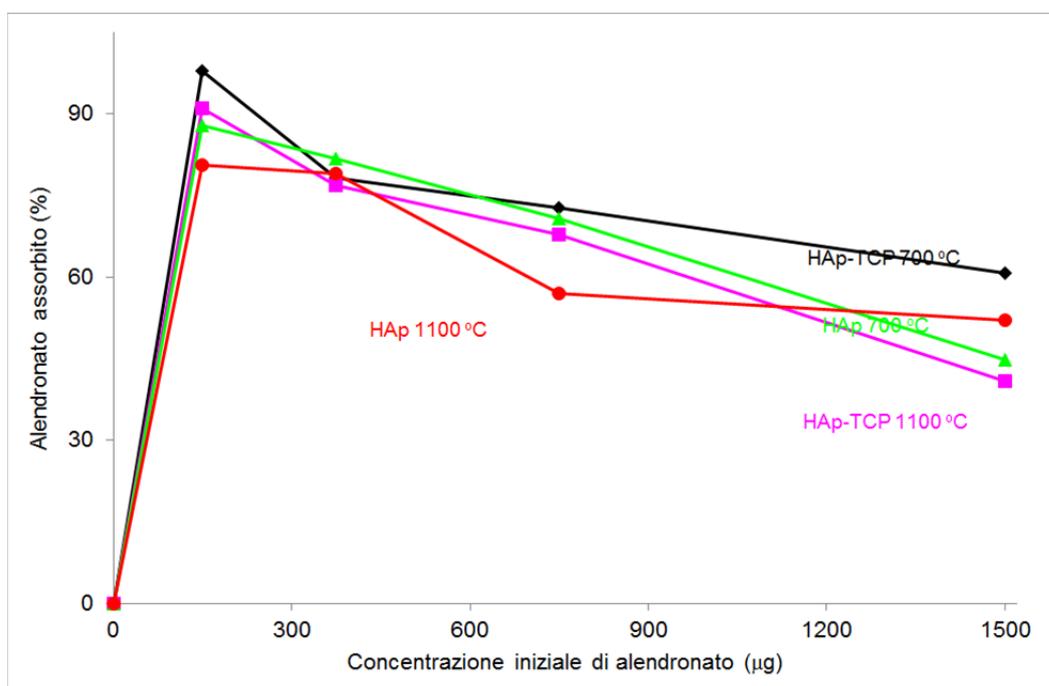


Figura 2. Alendronato assorbito (%) da soluzioni a differente concentrazione.

Nel primo caso (assorbimento in funzione del tempo), si può vedere come la maggior parte dell'alendronato sia assorbito durante le prime 4 ore; per tempi più prolungati infatti la quantità di farmaco assorbita resta costante (entro l'errore sperimentale). Ciò indica come il materiale abbia raggiunto la saturazione e non sia in grado di assorbire quantità ulteriori di alendronato. L'unica eccezione è costituita dal campione **A**, la cui curva non raggiunge un plateau ma continua ad avere un andamento crescente in funzione del tempo; l'aumento dell'alendronato assorbito è comunque meno accentuato per tempi superiori a 7 ore.

Considerando invece l'assorbimento usando soluzioni di alendronato di diversa concentrazione, la Figura 2 mostra come a basse concentrazioni l'alendronato sia quasi completamente assorbito. Le percentuali di assorbimento sono infatti superiori al 90 % per tutti i campioni, ad eccezione del campione **D** (80.5 %). Per concentrazioni maggiori la percentuale di assorbimento diminuisce; in corrispondenza di una quantità di alendronato di 1.5 mg infatti l'assorbimento presenta valori percentuali compresi tra 40 e 60 %.

I risultati di entrambi gli esperimenti confermano l'affinità tra l'alendronato e i campioni di idrossiapatite naturale; potenzialmente quindi tali sistemi possono essere usati per la produzione di sistemi di drug-delivery, i.e. protesi ossee impregnate con farmaci anti-osteoporotici.

### Idrossiapatite naturale dopata con europio

I campioni di idrossiapatite dopata con europio sono stati preparati collocando le spine di bacalà in una soluzione di Eu (III) –  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; le spine sono state lasciate in soluzione a circa 65-70 °C per 24 ore, in agitazione. Le spine sono poi state seccate a circa 40-45 °C e successivamente calcinate ad alte temperature.

La tabella 1 riporta le condizioni usate per la preparazione dei campioni.

Tabella 1. Condizione di preparazione dei campioni dopati con europio

<b>Campione</b>	Concentrazione della soluzione di Eu (III) (mol/L)	Temperatura di calcinazione (° C)
<b>Eu 1</b>	$3.5 \cdot 10^{-3}$	700
<b>Eu 2</b>	$3.5 \cdot 10^{-3}$	1100
<b>Eu 3</b>	$5.25 \cdot 10^{-3}$	700
<b>Eu 4</b>	$5.25 \cdot 10^{-3}$	1100

I campioni così preparati sono stati caratterizzati con varie tecniche. Con misure di spettroscopia ICP è stata determinata la concentrazione di europio (Tabella 2).

Campione	Concentrazione di Eu (III) (% peso)
<b>Eu 1</b>	$1.67 \pm 0.14$
<b>Eu 2</b>	$1.65 \pm 0.10$
<b>Eu 3</b>	$1.60 \pm 0.01$
<b>Eu 4</b>	$1.25 \pm 0.05$

Questi dati confermano quindi la presenza dell'europio in tutti i campioni.

Tali campioni sono stati anche analizzati con diffrattometria a raggi X e spettroscopia IR, riportati in Figura 3 e 4 rispettivamente.

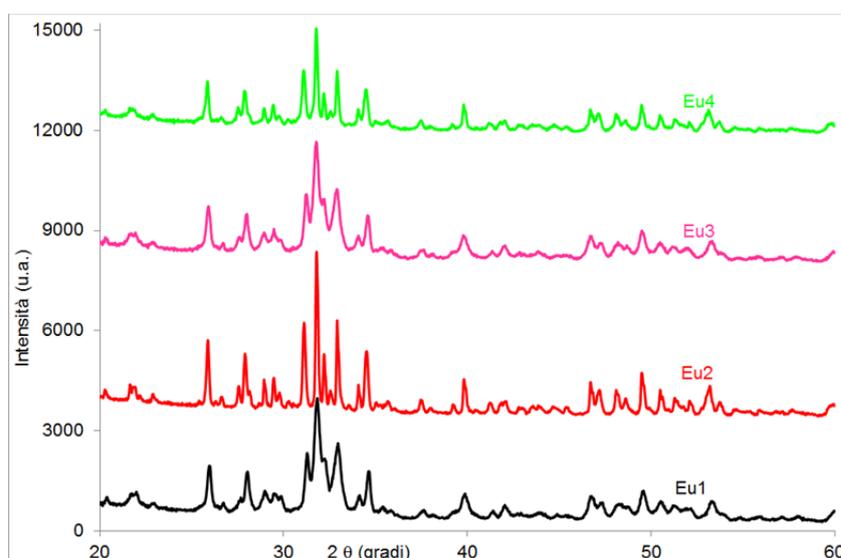


Figura 3. Diffrattometria a raggi X dei campioni dopati con europio.

I dati di diffrattometria indicano per tutti i campioni la presenza di due fasi, e cioè idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e  $\beta$ -trifosfato di calcio ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ); quest'ultimo è presente in quantità più elevata nei campioni **Eu2** e **Eu4**, calcinati a temperature più elevate.

Gli spettri IR confermano la presenza di entrambe le fasi.

I campioni così preparati sono stati analizzati con il microscopio ChemiDoc XRS+, per verificarne l'eventuale luminescenza indotta dalla presenza dell'europio.

In Figura 5 sono riportate le fotografie dei campioni (a) in assenza e (b) in presenza di illuminazione UV (310 nm). Con illuminazione UV il campione C di controllo (cioè idrossiapatite non contenente europio) non è visibile; gli altri campioni, al contrario, lo sono.

Queste immagini indicano dunque la luminescenza dei tali campioni e confermano di come questa sia dovuta all'incorporazione dell'eurobio nella struttura delle spine e, conseguentemente, nel materiale da esse derivato.

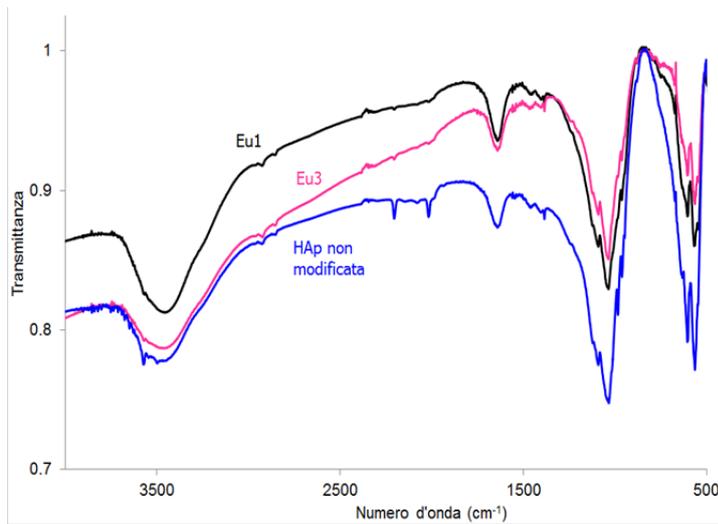


Figura 4. Spettri UV dei campioni **Eu1** e **Eu3** e dell'idrossiapatite non modificata.

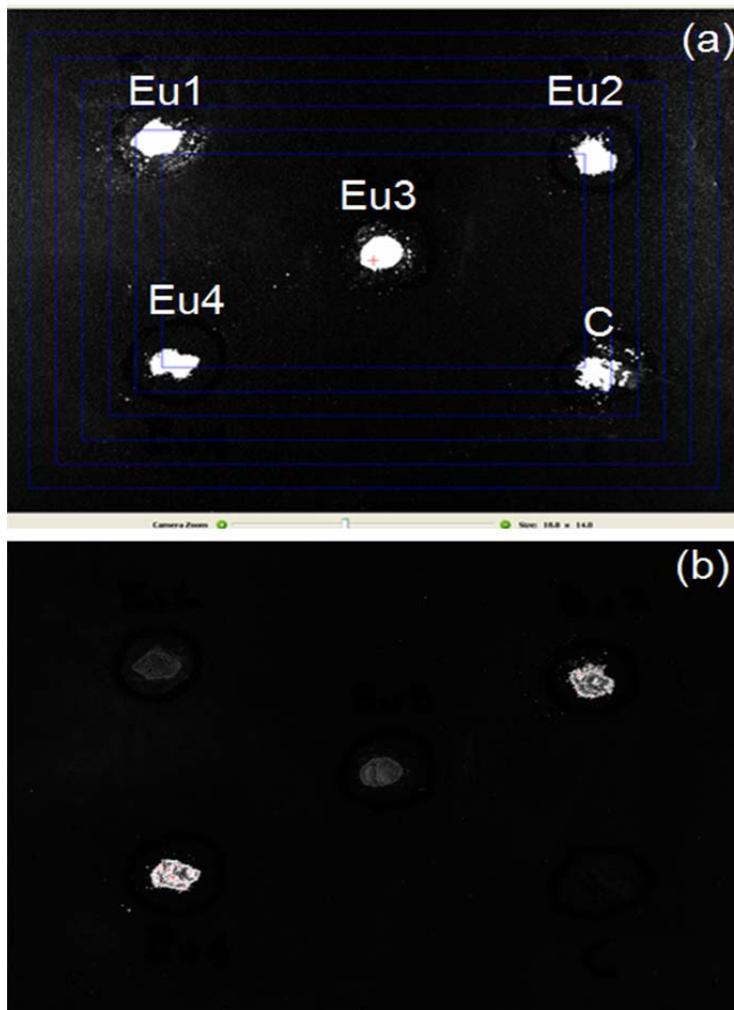


Figura 5. Fotografie dei campioni (a) in assenza diluce UV; (b) in presenza di luce UV.

Questi dati mostrano le potenzialità di tali materiali per la realizzazione di sistemi per biomarking, visibili all'interno di cellule.

## Conclusioni

I risultati del lavoro svolto da Clara Piccirillo possono essere così riassunti:

- I campioni a base di idrossiapatite di origine marina hanno affinità per i farmaci bifosfonati usati per l'osteoporosi.
- Considerando in particolare l'alendronato, questo farmaco può essere assorbito dall'idrossiapatite marina; in questa maniera è possibile realizzare sistemi di drug-delivery.
- È possibile dopare l'idrossiapatite di origine marina con europio.
- I materiali così dopati sono luminescenti e quindi, potenzialmente, possono essere usati come biomarker.

## Bibliografia

Piccirillo C., Silva M.F., Pullar R.C., Braga da Cruz I., Jorge R., Pintado M.E., Castro P.M.L.: "Extraction and characterization of apatites-and calcium phosphate-based materials from cod fish bones." *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 103 (2013).

Taha, E.A., Youssef, N.F.: "Spectrophotometric determination of some drugs for osteoporosis." *Chem. Pharm Bull.*, **51(12)**, 1444 (2003).