



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DEL FARMACO, DELLE BIOMOLECOLE E
DEI PRODOTTI PER LA SALUTE**

***Studio, sviluppo e caratterizzazione di nanosistemi
funzionalizzati con glicirrizina per il trattamento del cancro***

Tesi di dottorato presentata nell'ambito di un accordo di co-tutela tra il programma di Post-laurea in Innovazione Farmaceutica presso l'Università Federale del Pará (UFPA) in Brasile e il Dottorato di Ricerca in Scienze del Farmaco, delle Biomolecole e dei Prodotti per la Salute presso l'Università di Parma (UNIPR) in Italia, come requisito per il doppio titolo di dottorato di ricerca.

Coordinatori: Prof.ssa Roseane Maria Ribeiro Costa
Prof. Marco Mor

Studente: Antônio Paulo Ribeiro Bitencourt
Relatori: Prof. José Otávio Carrera Silva Jr.
Prof.ssa Alessandra Rossi

Belém, 2021

**“All’uomo spettano i disegni del cuore,
ma la risposta della lingua viene dal Signore.”**
La Sacra Bibbia. Proverbi 16,1.

*Dedico questo lavoro alla
mia amata famiglia*

RINGRAZIAMENTI

Prima di tutto ringrazio Dio per avermi dato salute e saggezza per raggiungere questa importante tappa della mia vita.

Molte grazie papà e mamma. Il mio incentivo quotidiano è ripagarvi per tutti gli sforzi che avete realizzato per permettermi di arrivare fino a qui. Il merito di questo traguardo è anche vostro.

Ringrazio la mia fidanzata Stefania per il sostegno e l'incentivo che mi ha dato negli ultimi due anni. Sei essenziale nella mia vita.

Un ringraziamento sincero al Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Jr. per aver creduto in me e nella realizzazione di questo progetto. Tante grazie sia per le tirate d'orecchia sia per i consigli!

Ringrazio immensamente la Prof.ssa Alessandra Rossi per avermi accolto a Parma, principalmente per aver condiviso con me le sue conoscenze e la sua esperienza. Ringrazio anche i professori Paolo Colombo e Fabio Sonvico per la disponibilità e per i preziosi consigli che avete saputo darmi.

Alla Prof.ssa Dr.ssa Roseane Maria Ribeiro Costa un grande ringraziamento per l'aiuto e principalmente per la fiducia nel rendere disponibile il laboratorio NanoFarm per la realizzazione di varie analisi.

Ringrazio il Nucleo di Ricerca Oncologica e l'istituto di Scienze Naturali per la collaborazione. In particolare un ringraziamento speciale ai colleghi Ingrid Ramos e Jefferson Lopes che non hanno mai contato gli sforzi per contribuire alla realizzazione delle analisi per la conclusione di questa tesi.

Ringrazio i miei compagni del laboratorio di Ricerca e Sviluppo Farmaceutico & Cosmetico (P&D) per la compagnia e i consigli ricevuti in questi 4 anni di ricerca. Sono grato specialmente agli amici Rayanne Rocha e Luciano Stecanella che mi hanno supportato nei momenti più difficili durante questi anni di dottorato.

Ringrazio i colleghi dell'Università di Parma per l'accoglienza ricevuta durante il periodo trascorso in Italia durante il quale mi avete fatto sentire come a casa.

Tante grazie Gustavo Franciele e Adryana! La vostra compagnia a Parma ha reso il lavoro più piacevole. I vostri consigli e principalmente la vostra compagnia sono stati marcati in questo percorso.

Un ringraziamento speciale va all'Università Federale del Parà e all'Università di Parma per l'opportunità che mi è stata data. Sono riuscito a realizzare un sogno potendo sviluppare il mio percorso di dottorato in cotutela permettendomi di ricevere il doppio titolo.

Ringrazio fortemente la CAPES per avermi concesso la borsa di dottorato (PDSE) durante il periodo di studi all'estero. Senza dimenticare di ringraziare la Pro-reitoria de Pós graduação da UFPA per il finanziamento del progetto sviluppato grazie alla FINEP.

Perciò, lascio i miei più sinceri ringraziamenti a tutti quelli che contribuirono in modo diretto o indiretto alla conclusione di questo ciclo.

1. INTRODUZIONE	11
1.1 Nanotecnologia e nanomedicina	14
1.2 Nanoparticelle ibride Lecitina:Chitosano	17
1.3 Applicazione dei nanosistemi d'impiego terapeutico	18
1.4 Vettorizzazione di nanoparticelle per il cancro	19
1.5 Glicirrizina come vettorizzatore di nanoparticelle	21
1.6 Bersagli biologici della Glicirrizina	22
1.6.1 EPATOCITI.....	22
1.6.2 HMGB1.....	23
2. SCOPO TESI	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 Materiali	29
3.2 Preparazione delle nanoparticelle ibride	29
3.2.1 AGGIUNTA DI DIVERSE QUANTITÀ DI CHITOSANO.....	29
3.2.2 INCORPORAZIONE DI FASE OLEOSA.....	30
3.2.3 AGGIUNTA DI DIVERSE CONCENTRAZIONE DI GLICIRRIZINA.....	31
3.3 Caratterizzazione delle nanoparticelle	32
3.3.1 DISPERSIONE DINAMICA DELLA LUCE.....	32
3.3.2 MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE.....	33
3.3.3 DINAMICA MOLECOLARE.....	33
3.3.4 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA CON TRASFORMATA DI FOURIER.....	34
3.3.5 SPETTROSCOPIA ELETTRONICA DI ASSORBIMENTO UV-VIS E ANALISI IN DERIVATA SECONDA.....	34
3.3.6 CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE.....	35
3.3.7 QUANTIFICAZIONE SIMULTANEA DI TAM E GLZ.....	35
3.3.7.1 Valori di efficienza di incapsulamento, <i>drug loading</i> e quantità di GLZ coniugata nelle nanoparticelle.....	36
3.4 Test <i>In vitro</i> con le nanoparticelle	37
3.4.1 SAGGIO DI RILASCIO.....	37
3.4.2 SAGGIO DI TOSSICITÀ.....	38
3.5 Analisi statistica	38

4. RISULTATI E DISCUSSIONI	39
4.1 Nanoparticelle sviluppate con chitosano a basso peso molecolare.....	39
4.1.1 CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE DLS E HPLC.....	39
4.2 Nanoparticelle con nucleo oleoso.....	42
4.2.1 PROFILO CHIMICO-FISICO.....	42
4.2.2 ANALISI FTIR.....	46
4.2.3 PROFILO TERMOANALITICO.....	47
4.3 Nanoparticelle decorate con glicirrizina.....	49
4.3.1 SIMULAZIONI MODELLISTICA MOLECOLARE.....	49
4.3.2 CARATTERIZZAZIONE DEI PARAMETRI FISICI.....	51
4.3.3 DETERMINAZIONE DEI CAMBIAMENTI STRUTTURALI.....	54
4.3.3.1 Spettroscopia FTIR.....	54
4.3.3.2 Spettroscopia UV.....	56
4.3.4 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEL FARMACO INCAPSULATO E DEL LIGANDO.....	58
4.3.5 PROFILO DI RILASCIO.....	60
4.3.6 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO <i>in vitro</i>	62
5. CONCLUSIONI.....	65
6. RIFERIMENTI.....	67
ALLEGATI.....	81
Allegato 1. Review pubblicato sulla rivista scientifica <i>Pharmaceutics</i> "Glycyrrhizic acid and its hydrolyzed metabolite 18b-glycyrrhetic acid as specific ligands for targeting nanosystems in the treatment of liver cancer".....	81

LISTA DI FIGURE E TABELLE

Figura 1. Struttura delle nanoparticelle di lecitina:chitosano decorate con glicirrizina e i potenziali bersagli della glicirrizina all'interno dell'organismo. In figura è indicata la specificità delle nanoparticelle funzionalizzate per i recettori sulla membrana degli epatociti (fegato) e per la proteina HMGB1 nel tumore solido della mammella.....	13
Figura 2. Illustrazione delle caratteristiche strutturali dei nanosistemi. Fonte: adattato da SELECI et al. (2016).....	15
Figura 3. Schema delle diverse categorie e tipi di sistemi di somministrazione dei farmaci. Le strutture mostrate sono semplificate e non sono su scala comparativa. (a) nanocristallo, (b) nanosospensione, (c) coniugato polimerico, (d) coniugato proteico polimerico, (e) micella polimerica, (f) liposoma, (g) nanoparticelle lipidiche solide, (h) nanoparticelle polimeriche solide, (i) nanogel, (j) nanoparticelle metalliche, (k) dendrimeri. Fonte: MCDONALD et al. (2015).....	16
Figura 4. Illustrazione della struttura fisica delle nanoparticelle di lecitina:chitosano. Fonte: adattato da GERELLI et al. (2010).....	18
Figura 5. Illustrazione dei tipi di vettorializzazione attiva e passiva. Il diagramma mostra anche i diversi tipi di ligandi che possono decorare le nanoparticelle. I termini contenuti nel testo significano: EPR - <i>Enhanced permeability and retention</i> ; NP - Nanoparticelle.; PEG - Glicole polietilenico. Fonte: adattato da JAHAN et al. (2017).....	22
Figura 6. Struttura molecolare della glicirrizina (acido glicirrizico).....	24
Figura 7. Proteina umana ad alta mobilità (HMGB1 - High Mobility Group Box 1). Specificità della glicirrizina dai siti omologhi (Box A e B) di HMGB1. Fonte: adattato da GIRARD (2007).....	26
Tabella 1. Proporzioni dei componenti delle TAM_LCN e la loro rispettiva denominazione.....	30
Tabella 2. Quantità di Maisine e Labrafac aggiunta alle nanoparticelle e denominazione delle LCN formate.....	31
Tabella 3. Denominazione delle β LCN contenente diverse concentrazioni di glicirrizina.....	32
Tabella 4. Proporzioni dei solventi utilizzate nel metodo del gradiente.....	36
Tabella 5. Valori della caratterizzazione fisica di TAM_LCN prima della regolazione del pH. I valori si riferiscono a formulazioni valutate nel primo giorno di conservazione (d1).....	40
Figura 8. Grafici con valori di diametro medio delle nanoparticelle (a) e potenziale zeta (b). I parametri fisico-chimiche delle TAM_LCN sono stati analizzati prima e dopo la regolazione del pH (< 4 o = 6). Mentre i grafici di efficienza di incapsulazione/ <i>Drug Loading</i> (EE/DL) (c) sono stati ottenuti da formulazioni con pH 6.....	41

Tabella 6. Valori dei parametri chimico-fisico (Z-medio, pdi, potenziale zeta, efficienza di incapsulamento e <i>drug loading</i>) di TAM_LCN ₂₀ ⁴ con diverse concentrazioni di fase oleosa.....	43
Figura 9. Grafici con valori di diametro medio nei giorni di conservazione (d1 e d30) delle TAM_LCN ₂₀ ⁴ e LCN con fase oleosa (γ LCN, α LCN e β LCN) (a). Sono stati ottenuti i valori di efficienza di incapsulamento/ <i>drug loading</i> (EE/DL) delle stesse formulazioni in d1 (b).....	43
Figure 10. (a) Grafico del potenziale zeta delle Lipo_TAM_MaiLab nei giorni di conservazione 1 e 7, rispettivamente linee rosse e verdi. (b) Immagini di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) di β LCN. Barra di misurazione: 500 nm, ingrandimento 8000x.....	46
Figura 11. Spettro infrarosso da 600 a 4000 cm ⁻¹ di TAM e delle LCN non caricate, TAM_LCN ₂₀ ⁴ e β LCN.....	47
Tabella 7. Risultati della analisi di DSC: valori di onset (°C), endset (°C) e ΔH (J/g) dei rispettivi campioni.....	48
Figura 12. Termogrammi di TAM, LCN non caricate, TAM_LCN ₂₀ ⁴ e β LCN.....	49
Figura 13. Componenti delle LCN: struttura molecolare del fosfolipide lecitina (A), monomero di chitosano (B) e glicirrizina (C). L'immagine D mostra il modello completo della LCN_GLZ, mentre l'immagine E mostra una sezione trasversale delle stesse LCN. Sempre nell'immagine "E" è possibile vedere tutti gli strati, dall'interno verso l'esterno: molecole d'acqua in rosso, lecitina che costituisce la parte interna della LCN_GLZ in verde, molecole di chitosano in giallo e sulla superficie delle LCN e la GLZ molecole in blu. L'immagine F mostra la rete di legami H formati tra i componenti LCN_GLZ.....	50
Figura 14. Analisi ¹ H NMR della GLZ ossidata.....	51
Tabella 8. Valori dei parametri fisico-chimici (dimensione delle particelle, indice di polidispersione, potenziale zeta, efficienza di incapsulamento e <i>drug loading</i>) delle β LCN con diverse concentrazioni di GLZ.....	52
Figura 15. Grafici del Z-medio (a), dell'indice di polidispersione (b), del potenziale zeta (c) e dell'efficienza di incapsulamento/ <i>drug loading</i> (EE, DL) (d) delle β LCN e formulazioni con diverse concentrazioni di GLZ. I valori si riferiscono al giorno 1 successivo alla produzione delle formulazioni.....	53
Figura 16. Immagini dal microscopio elettronico a trasmissione (TEM) delle β LCN (a) e β LCN_GLZ ₂ (b). Barra di misurazione: (a) 500 nm e (b) 200 nm, 8000x e 30000x di ingrandimento rispettivamente.....	53
Figura 17. Analisi di FTIR delle β LCN con diverse concentrazioni di GLZ.....	55
Figura 18. (a) Spettri di assorbimento UV-Vis normalizzati e (b) analisi della derivata seconda di TAM (linea verde continua); GLZ (linea tratteggiata arancione); LCN non	

caricata (linea viola); β LCN (linea blu continua) e β LCN_GLZ₂ (linea rossa continua). Tutti i campioni vengono disciolti in acqua pura, ad eccezione del TAM che è disciolto in etanolo.....56

Figura 19. Cromatogramma della miscela binaria degli standard di GLZ (3,64 min) e TAM (9,28 min).....58

Tabella 9. Tasso di GLZ recuperato e coniugato alle β LCN.....59

Figura 20. Profilo di rilascio *in vitro* di TAM libero e TAM incorporato nelle LCN (β LCN e β LCN_GLZ₂) in ambiente neutro (pH 7,4) e acido (pH 5,5) a 37°C. Ogni punto si riferisce alla media dell'analisi in triplicato e alla loro deviazione standard in diverse ore del test.....61

Figura 21. Effetto antiproliferativo di TAM e GLZ isolati sulle cellule MCF-7 dopo 72 ore di trattamento (i risultati sono espressi come media di tre repliche e percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo). **** P < 0,000162

Figura 22. La vitalità cellulare *in vitro* in cellule MCF-7, dopo 72 ore di trattamento con le LCN non caricate, β LCN e β LCN_GLZ₂, in diverse concentrazioni. I risultati sono espressi come media di tre repliche e percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo (CN). **** P < 0,000163

Figura 23. Effetto delle LCN non caricate sulla vitalità cellulare delle cellule MRC5 non tumorali dopo 72 ore di trattamento (i risultati sono espressi come media di tre replicati e percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo). ****P <0,000164

SIMBOLI, ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

OMS	Organizzazione mondiale della Sanità
DNA	Acido desossiribonucleico
ER	Recettore degli estrogeni
mg/ml	Milligrammo per millilitro
°C	Gradi centigradi
µL	Microliter
Mm	Millimetro
mL/min	Millilitro al minuto
mM	Millimolare
g/mL	Grammi per millilitro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
TLR2	<i>Toll-Like Receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
cm	Centimetro
HMGB1	High Mobility Group Box 1
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
pH	Potenziale di idrogeno
nm	Nanometri
Z-media	Dimensione media delle particelle
cm	Centimetri
DSC	Calorimetria a scansione differenziale
Na ₂ CO ₃	Carbonato disodico
DL	<i>Drug loading</i>
DLS	Dispersione dinamica della luce
EE	Efficienza di incapsulamento
ER	Recettori per gli estrogeni
GAFF	Campo generale Amberforce
GLZ	Glicirrizina
HMGB1	Proteina di alta mobilità umana gruppo 1
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HCl	Acido cloridrico
FTIR	Spectroscopia infrarossa con trasformata di Fourier
Kda	Kilodaltons
Kv	Kilovolt
LB	Lambert-beer
LCN	Nanoparticelle di lecitina:chitosano
LCN_TAM	Nanoparticelle di lecitina:chitosano contenenti tamoxifene

α LCN	Nanoparticelle di lecitina:chitosano con tamoxifene e fase oleosa (1 mg/mL)
β LCN	Nanoparticelle di lecitina:chitosano con tamoxifene e fase oleosa (2 mg/mL)
γ LCN	Nanoparticelle di lecitina:chitosano con tamoxifene e fase oleosa (4 mg/mL)
β LCN_GLZ	Nanoparticelle di lecitina:chitosano con tamoxifene e fase oleosa (2 mg/mL) decorate con glicirrizina
LN_TAM_Mailab	Micelle di lecitina con tamoxifene e fase oleosa (2 mg/mL)
LEC	Lecitina
Lipo_TAM	Micelle di lecitina contenenti tamoxifene
LMWC	Chitosano a basso peso molecolare
MaiLab	Maisine e Labrafac
MCF-7	Cellule di adenocarcinoma mammario
MCR-5	Cellule di fibroblasti polmonari
mV	Millivolt
DM	Dinamica molecolare
DDS	pH sensitive drug delivery system
H_1 NMR	Risonanza magnetica nucleare protonica
Pdi	Indice di polidispersione
rpm	Giri al minuto
Rt	Tempo di ritenzione
$NaHCO_3$	Bicarbonato di sodio
$NaIO_4$	Periodato di sodio
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
TAM	Tamoxifene
TEM	Microscopio elettronico a trasmissione
UV-Vis	Luce ultravioletto-visibile
vdW	Forze di Van der Waals
Zp	Potenziale zeta

Studio, sviluppo e caratterizzazione di nanosistemi funzionalizzati con glicirrizina per il trattamento del cancro

Bitencourt, A.P.R.¹; Rossi, A.²; Silva Júnior, J.O.C¹

¹Laboratorio di P&D farmaceutico e cosmetico, Università Federale del Pará, Belém-PA, Brasile ² Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma, Parma (Italia).

Introduzione: La glicirrizina, componente principale della specie vegetale *Glycyrrhiza glabra*, presenta numerose attività biologiche. Negli ultimi anni è stato esaminato il suo potenziale come ligando di superficie nei nanosistemi. **Obiettivo:** Lo scopo di questa ricerca è stato studiare il potenziale della glicirrizina come vettore in nanosistemi e sviluppare nanoparticelle decorate con questo ligando con applicabilità al cancro al seno. **Metodi:** Le fasi di ottenimento delle formulazioni sono state le seguenti: (1) test con diverse proporzioni di lecitina/chitosano a basso peso molecolare, (2) incorporazione di differenti concentrazioni della miscela di olii labrafac e maisina e (3) aggiunta della glicirrizina alle nanoparticelle. La caratterizzazione delle nanoparticelle è stata condotta mediante tecniche DLS, MET, DM, DSC, Spettroscopia Ottica e FT-IR. Per mezzo del metodo HPLC è stata determinata l'efficienza di incapsulazione, il drug loading e il profilo di rilascio *in vitro* delle nanoparticelle. In seguito, sono stati effettuati gli studi di tossicità sulle cellule di adenocarcinoma mammario. **Risultati:** La review pubblicata, in allegato a questa tesi, è stata importante per la comprensione dello sviluppo e della caratterizzazione dei nanosistemi decorati con glicirrizina e della loro attività biologica. Nel lavoro di ricerca, le LCN sviluppate con chitosano a basso peso molecolare hanno dimostrato una buona stabilità a pH 6. L'incorporazione della miscela di olio nelle LCN ha permesso un aumento dell'incapsulamento del farmaco e di conseguenza un aumento della stabilità delle nanoparticelle. È stato confermato dalle tecniche utilizzate che la presenza di una fase oleosa favorisce una modifica nella formazione delle LCN, dove il tamoxifene è presente nel nucleo senza interferire sulla composizione della membrana delle nanoparticelle. Attraverso le tecniche di modellazione molecolare e caratterizzazione fisico-chimica, è stata confermata l'effettiva coniugazione del ligando sulla membrana delle LCN. Le nanoparticelle decorate con glicirrizina hanno mostrato un profilo di rilascio lento del farmaco nell'arco di 24 ore che dipende dal pH del mezzo di dissoluzione. In ambiente acido, il rilascio del farmaco è più veloce. Questo profilo di comportamento può rappresentare una maggiore ritenzione del farmaco nelle LCN nel sangue (pH 7,4) con conseguente maggiore rilascio del farmaco nella regione tumorale (pH 5,5). La stessa formulazione si è dimostrata molto promettente dovuto al suo effetto antiproliferativo a concentrazioni inferiori rispetto alla soluzione di tamoxifene, dimostrando che il nanosistema è funzionale e biocompatibile. **Conclusioni:** L'ottenimento delle LCN decorate con glicirrizina potrebbe permettere il caricamento di altri farmaci antitumorali con caratteristiche chimiche simili al tamoxifene, e/o permettere la coniugazione di altri ligandi sulla membrana di nanoparticelle composte da lecitina e chitosano.

Parole-chiave: Acido glicirrizico, vettorizzazione, nanoparticelle di lecitina:chitosano, cancro.

Study, development and characterization of glycyrrhizin-functionalized nanosystems for cancer treatment

Bitencourt, A.P.R.¹; Rossi, A.²; Silva Júnior, J.O.C¹

¹ P&D farmacêutico e cosmético laboratory, Federal University of Pará, Belém-PA (Brazil) ² Department of food and drug sciences, University of Parma, Parma (Italy).

Introduction: Glycyrrhizin, the main component of the plant species *Glycyrrhiza glabra*, has numerous biological activities. In recent years, its potential as a surface ligand in nanosystems has been examined. **Objective:** The aim of this research was to study the potential of glycyrrhizin as a vector in nanosystems and to develop nanoparticles decorated with this ligand with applicability to breast cancer. **Methods:** The steps to obtain the formulations were as follows: (1) test with different proportions of lecithin/ low molecular weight chitosan, (2) incorporation of different concentrations of the mixture of labrafac and maisine oils and (3) addition of glycyrrhizin to nanoparticles. The characterization of the nanoparticles was carried out through DLS, MET, DM, DSC, Optical Spectroscopy and FT-IR techniques. The encapsulation efficiency, drug loading and *in vitro* release profile of the nanoparticles were determined by means of the HPLC method. Subsequently, toxicity studies were performed on breast adenocarcinoma cells. **Results:** The published review, attached to this thesis, was important for the understanding of the development and characterization of glycyrrhizin-decorated nanosystems and their biological activity. In our practical work, the LCNs developed with low molecular weight chitosan demonstrated good stability at pH 6. Incorporation of the oil mixture into the LCNs provided an increase in drug encapsulation and consequently an increase in the nanoparticles stability. It has been confirmed by the techniques used that the presence of an oil phase favours a change in the LCN structure formation, the tamoxifen begins to occupy their nucleus without disturbing the connection between the membrane components. Through molecular modelling and physico-chemical characterization techniques, the effective conjugation of the ligand on the LCN membrane was confirmed. The nanoparticles decorated with glycyrrhizin showed a slow-release profile over 24 hours which depends on the pH of the dissolution environment. In an acidic environment, drug release is faster. This behavior profile may represent greater drug retention in LCN in the blood (pH 7,4) resulting in greater drug release in the tumor region (pH 5,5). The same formulation has shown great promise due to its antiproliferative effect at lower concentrations than the tamoxifen solution, demonstrating that the nanosystem is functional and biocompatible. **Conclusions:** Obtaining the LCNs decorated with glycyrrhizin makes it possible to load other anticancer drugs with chemical characteristics similar to tamoxifen, and / or allow other ligands to be conjugated to the wall of particles composed of lecithin and chitosan.

Keywords: Glycyrrhizic acid, vectorization, lecithin:chitosan nanoparticles, cancer.

La necessità di studiare nuovi materiali o di migliorare quelli esistenti risulta continua e necessaria. Nel trattamento del cancro, un'ampia gamma di farmaci è stata usata nel corso degli anni. Alcuni di loro hanno dimostrato di essere molto efficaci, altri nonostante mostrassero ottime proprietà terapeutiche presentavano gravi effetti avversi. L'uso di una terapia che abbia un effetto direzionato alle cellule tumorali senza intaccare la funzionalità delle cellule sane suscita particolare interesse. La nanotecnologia da parte sua riesce ad aumentare l'effetto farmacologico dei farmaci, ciò può accadere attraverso l'utilizzo di nanosistemi funzionalizzati in grado di aumentare il tempo di circolazione del farmaco incapsulato nell'organismo (ALBULET et al., 2017). Oltre a questo vantaggio i nanosistemi possono proteggere la sostanza caricata dalla degradazione da parte dell'organismo prima di arrivare alla zona d'interesse, e in questo modo liberarla in un punto specifico. I nanosistemi rendono perciò possibile che i farmaci siano rilasciati nel sito specifico in un preciso momento e con una concentrazione nota (KANAPATHIPILLAI et al., 2014).

Per i pazienti oncologici è consuetudine convivere con gli effetti avversi dei farmaci con i quali vengono trattati (KANAPATHIPILLAI et al., 2014). Sono proprio gli aspetti farmacologici indesiderati che incentivano molti ricercatori a trovare strumenti utili per la loro diminuzione, con conseguente aumento del numero di studi riguardanti nanosistemi caricati con farmaci (MAJI et al., 2014; BARBIERI et al., 2015; RAVIKUMARA et al., 2016; CHEVALIER et al., 2017; ABBALSALIPOURKABIR et al., 2016). L'uso di nanosistemi funzionalizzati è perciò uno strumento che ne intensifica i benefici del loro utilizzo. Diversi studi precedenti (SHI et al., 2012; ZU et al., 2013; CHOPDEY et al., 2015; WU et al., 2017) hanno utilizzato la glicirizina come ligando delle nanoparticelle grazie alla sua affinità per gli epatociti. Perciò queste nanoparticelle decorate con glicirizina sono state studiate per il trattamento di malattie epatiche, principalmente in relazione al tumore al fegato. Grazie ad un vasto numero di studi che hanno messo in evidenza questo aspetto della glicirizina, è stata effettuata un'analisi della letteratura che è riportata nell'articolo allegato a questa tesi di dottorato e che è stata pubblicata. Lo scopo della review è stato (1) studiare il processo di fabbricazione e caratterizzazione di nanocarrier decorati con

glicirrizina e con il suo derivato acido glicirretico e (2) studiare il meccanismo di targeting in saggi *in vitro* e *in vivo*.

Considerato che la glicirrizina presenta grande affinità per la proteina HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) e che la sua funzione di vettorizzazione su questo bersaglio è stata fino ad oggi poco studiata, nel progetto di ricerca ci siamo focalizzati sullo sviluppo di nanoparticelle decorate con glicirrizina per il trattamento del cancro al seno. L'attenzione verso questa neoplasia è dovuta alla presenza di una grande concentrazione di HMGB1 se confrontata con altre patologie infiammatorie o forme tumorali (HE et al., 2017), oltre al fatto che secondo l'OMS (2019) il cancro al seno è secondo per causa di morte al mondo, con circa 9,6 milioni di morti nel 2018. Nello stesso anno si è stimato che 627.000 donne siano state vittime di cancro al seno, che corrisponde a circa il 15% dei decessi totali nell'anno (FERLAY et al., 2019). Il tamoxifene (TAM) è il primo farmaco autorizzato per il trattamento del cancro al seno ER-positivo, quello più prescritto e continua ad essere il farmaco di prima scelta (CALABRESI e SCHEIN, 1993; BREASTCANCER.ORG, 2019). Mediante l'uso di questo farmaco è possibile bloccare la connessione tra estrogeni e cellule cancerose bloccando ER, impedendo così la crescita e la moltiplicazione del tumore (CALABRESI e SHEIN, 1993). Sebbene TAM sia un farmaco molto efficace, presenta vari effetti collaterali associati alla sua azione in cellule non tumorali che possiedono il recettore per gli estrogeni. Nonostante sia considerato un SERM (modulatore selettivo del recettore degli estrogeni), TAM non ha selettività per le cellule mammarie malate. Tra gli effetti avversi noti e più gravi ci sono coaguli di sangue, ictus, sanguinamento vaginale anormale e cancro dell'endometrio (CALABRESI e SCHEIN et al., 1993; CUZICK et al., 2003; LLARENA et al., 2015; MOON et al., 2017).

Negli ultimi anni sono state sviluppate diverse nanoformulazioni con l'intenzione di veicolare farmaci antineoplastici passivamente o attivamente al tumore (AHMAD et al., 2019). TAM è stato oggetto di studio per ridurre i suoi elevati effetti tossici. Una di queste valide alternative è l'uso di nanosistemi in grado di trasportare farmaci verso un bersaglio specifico (MAJI et al., 2015; BARBIERI et al., 2015; RAVIKUMARA et al., 2016; ABBASALIPOURKABIR et al., 2016; CHEVALIER et al., 2017). L'uso di TAM a basso dosaggio in nanoparticelle rappresenta un'ottima opzione per i trattamenti a lungo termine, soprattutto quando il farmaco è

vettorizzato, permettendo di concentrarlo nel tumore. Pertanto, l'obiettivo di questo lavoro è stato sviluppare nanoparticelle ibride di lecitina:chitosano a basso peso molecolare, caricate con un farmaco antitumorale e decorate con glicirrizina, per l'uso nel trattamento del cancro al seno. Considerando il potenziale della glicirrizina per la funzionalizzazione di nanoparticelle, la figura 1 illustra i principali bersagli biologici della glicirrizina.

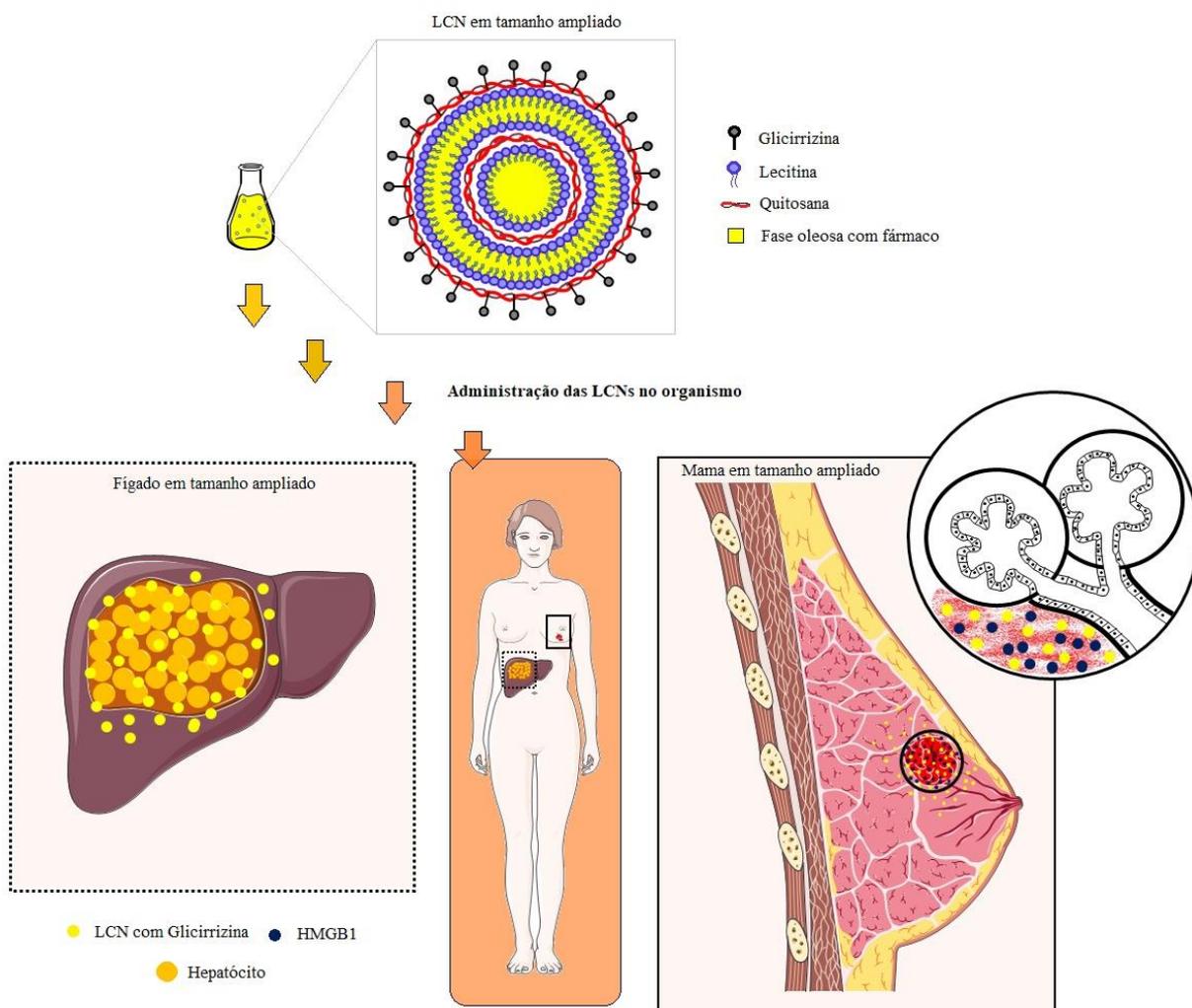


Figura 1. Struttura delle nanoparticelle di lecitina:chitosano decorate con glicirrizina e i potenziali bersagli della glicirrizina all'interno dell'organismo. In figura è indicata la specificità delle nanoparticelle funzionalizzate per i recettori sulla membrana degli epatociti (fegato) e per la proteina HMGB1 nel tumore solido della mammella.

1.1 Nanotecnologia e nanomedicina

Attualmente la nanotecnologia è applicata in differenti aree delle scienze, in virtù dei significativi benefici del suo utilizzo in termini di miglioramento della performance di un prodotto. Gli ambiti scientifici includono l'energia, l'elettronica, l'agricoltura, le scienze alimentari passando per quelle farmaceutiche e cosmetiche e più in generale l'ambito medico sanitario. In merito all'area medico-sanitaria la nanomedicina nasce per fornire nuove soluzioni che permettano di superare complicità che si osservano con le cure convenzionali (MCDONALD et al., 2015; KARGOZAR e MOZAFARI, 2018). La nanomedicina è il ramo della medicina che utilizza lo strumento della nanotecnologia per la prevenzione e la cura di varie patologie sfruttando materiali su scala dimensionale nanometrica, come nanoparticelle biocompatibili e nanorobot per vari impieghi incluso l'utilizzo in diagnostica (MIR et al., 2017; PATRA et al., 2018).

La nanotecnologia altresì attinge conoscenze da diverse aree scientifiche quali la chimica, la fisica, l'ingegneria, la biologia e la medicina. Per quanto riguarda il suo utilizzo in ambito farmaceutico la nanotecnologia è utilizzata per modificare la cinetica di rilascio dei farmaci, aumentarne la solubilità, l'assorbimento, la biodisponibilità e la liberazione. Oltre a puntare sull'aumento dell'efficacia e della riduzione degli effetti avversi di farmaci già in uso, può essere utilizzata per nuove classi terapeutiche e per farmaci dal grande potenziale terapeutico in cui è difficile il direccionamento. Inoltre, i nanosistemi sono largamente utilizzati per lo sviluppo di particelle dalle dimensioni molto ridotte, nell'ordine del nanometro, usando sostanze sia organiche che inorganiche con applicazione in campo biomedico (MIR et al., 2017; PATRA et al., 2018). Per ottenere nanosistemi multifunzionali efficienti è necessario tenere in considerazione la combinazione dei seguenti fattori (figura 2): forma delle particelle, composizione dei materiali, caratteristiche chimiche della membrana e tipo di ligando. Le strategie per ottenere queste combinazioni sono varie e generano nanoparticelle differenti aventi funzioni distinte (SELECI et al., 2016).

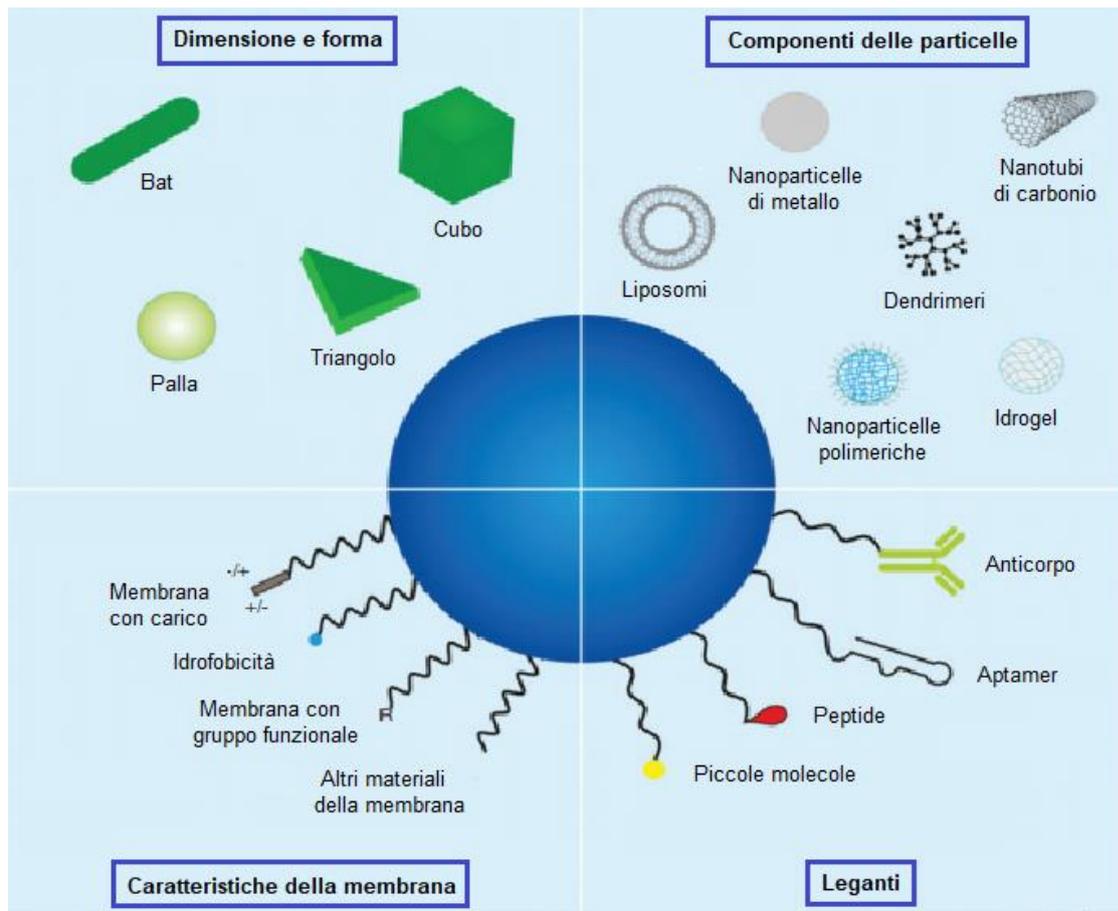


Figura 2. Illustrazione delle caratteristiche strutturali dei nanosistemi. Fonte: adattato da SELECI et al. (2016).

I modelli di nanosistemi studiati e comunemente utilizzati sono liposomi, emulsioni, nanoparticelle polimeriche, nanoparticelle proteiche, nanoparticelle inorganiche, nanotubi di carbonio, dendrimeri e nanoparticelle lipidiche (SHARMA et al., 2015; CHOWNDHURY et al., 2017; MA et al., 2019). McDonald et al. (2015) divisero questi tipi di sistemi nanostrutturati in tre grandi classi (figura 3): nanoparticelle solide, polimeri terapeutici e nanocarrier. L'uso di nanoparticelle (NP) ha mostrato maggiori benefici rispetto ad altri tipi grazie alla capacità di incorporare sostanze idrofobiche in mezzi acquosi, che consente un aumento del tempo di circolazione e di conseguenza migliora l'efficacia della somministrazione del farmaco (MA et al., 2019), riducendo gli effetti negativi sulle cellule sane (AHMAD et al., 2019).

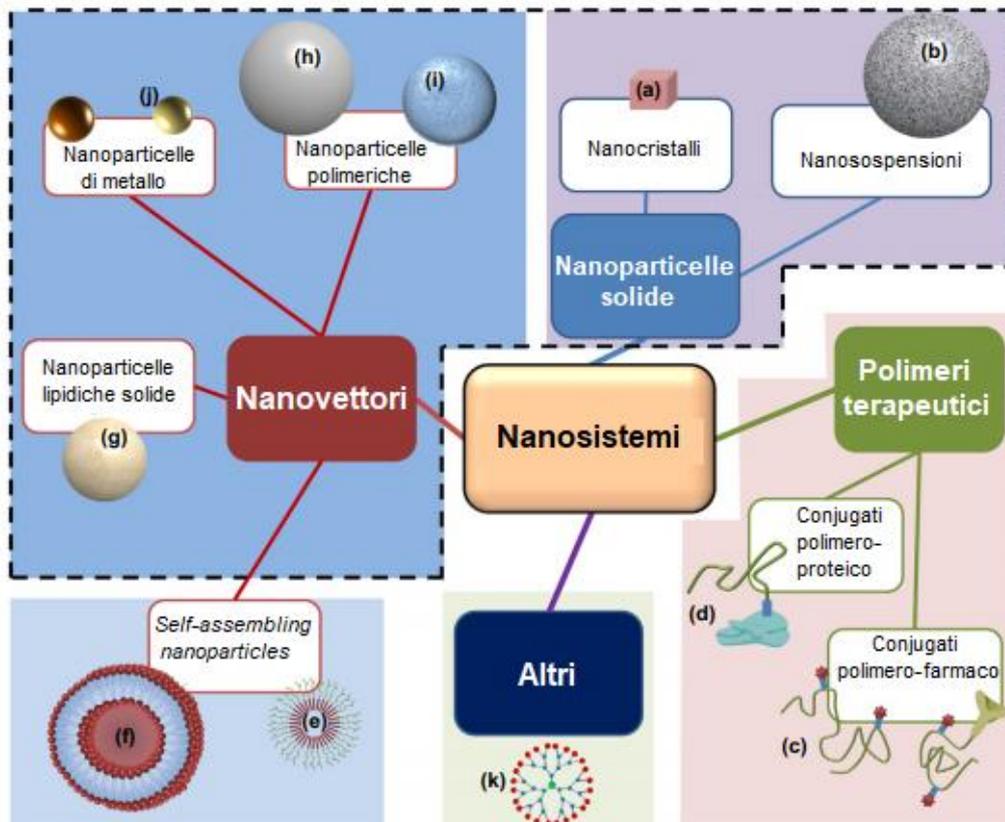


Figura 3. Schema delle diverse categorie e tipi di sistemi di somministrazione dei farmaci. Le strutture mostrate sono semplificate e non sono su scala comparativa. (a) nanocristallo, (b) nanosospensione, (c) coniugato polimerico, (d) coniugato proteico polimerico, (e) micella polimerica, (f) liposoma, (g) nanoparticelle lipidiche solide, (h) nanoparticelle polimeriche solide, (i) nanogel, (j) nanoparticelle metalliche, (k) dendrimeri. Fonte: MCDONALD et al. (2015).

Due tipi di nanoparticelle meritano di essere evidenziati per i vantaggi nel loro utilizzo: nanoparticelle lipidiche e nanoparticelle polimeriche. Le nanoparticelle lipidiche, ad esempio, hanno caratteristiche anfifiliche, biomimetiche e biocompatibili. Tuttavia, l'instabilità strutturale legata all'ossidazione dei lipidi è uno dei suoi principali limiti. Allo stesso modo, le nanoparticelle polimeriche presentano nel tempo problemi di stabilità anche con elevati valori di contenuto di farmaco (KAMALLY et al, 2016). Al fine di risolvere i limiti associati a questi due tipi di nanoparticelle sopra menzionati, molti studi hanno rivolto l'attenzione allo sviluppo di nanosistemi modificati, come la produzione di formulazioni che uniscono i benefici di polimeri e lipidi. È noto che le nanoparticelle ibride lipide-polimero hanno un nucleo lipidico rivestito di polimero, che forma particelle su scala nanometrica con elevata stabilità (CHEN et al., 2019). Possono essere evidenziati vantaggi nell'uso di questo tipo di nanoparticelle quali protezione contro l'attacco di enzimi, maggiore

permeabilità attraverso membrane epiteliali e funzionalizzazione di strutture per fornire "recettori bersaglio" (GRIGORAS, 2017). In aggiunta, queste nanoparticelle mostrano un efficiente incapsulamento di farmaci chimicamente diversi (tamoxifene e corticosteroidi) incrementando la permeabilità attraverso l'epitelio intestinale e permettendo di accumularsi in diversi strati cutanei (SENYIGIT et al., 2009; BARBIERI et al., 2013; BARBIERI et al., 2015).

1.2 Nanoparticelle ibride Lecitina:Chitosano

Per la produzione di questi nanosistemi i loro principali componenti meritano di essere riportati in dettaglio. Il polisaccaride chitosano e il fosfolipide lecitina negli ultimi anni sono stati utilizzati per sviluppare nanocarrier in numerosi studi (ALKHOLIEF, 2019; CHU et al., 2019; KHAN et al., 2019) a causa dei vantaggi riscontrati nelle loro applicazioni trattandosi di componenti biocompatibili e biodegradabili oltre ad essere potenziali componenti di nanoparticelle per l'incapsulamento di farmaci poco solubili e/o insolubili in acqua (BARENHOLZ, 2012; BARBIERI et al., 2015). La lecitina rappresenta la parte lipidica, che forma micelle di diversi fosfolipidi con un'efficace capacità di trasporto delle sostanze lipofile. Il chitosano è un polisaccaride, ottenuto dalla deacetilazione della chitina, principale componente dell'esoscheletro del crostaceo. Questo materiale è importante per formare strutture stabili con elevata carica superficiale positiva (SONVICO et al., 2006b).

La lecitina e il chitosano sono biomateriali che generano un grande interesse nella produzione di sistemi colloidali (DI BARI et al., 2008; CHHONKER et al. 2014). In seguito ad iniezione di una soluzione etanolica di lecitina in una soluzione acquosa di chitosano, l'interazione tra il lipide caricato negativamente (lecitina) e il polisaccaride positivo (chitosano) porta alla formazione di nanoparticelle (LCN) stabili (figura 4) (SONVICO et al., 2006a; DI BARI et al., 2008). Il rapporto dei due principali componenti (lecitina:chitosano) è principalmente 20:1, tuttavia alcuni studi variano la concentrazione della lecitina e del chitosano e/o il peso molecolare del chitosano. Queste modifiche della componente polisaccaridica sono essenziali nell'alterare le caratteristiche fisiche e chimiche delle nanoparticelle e, di conseguenza, modificarne la stabilità. Ad esempio, è noto che l'uso di chitosano con

pesi molecolari e viscosità diversi (8-715 cP) genera LCN con bassa stabilità fisica a pH maggiore di 5 (SONVICO et al., 2006a).

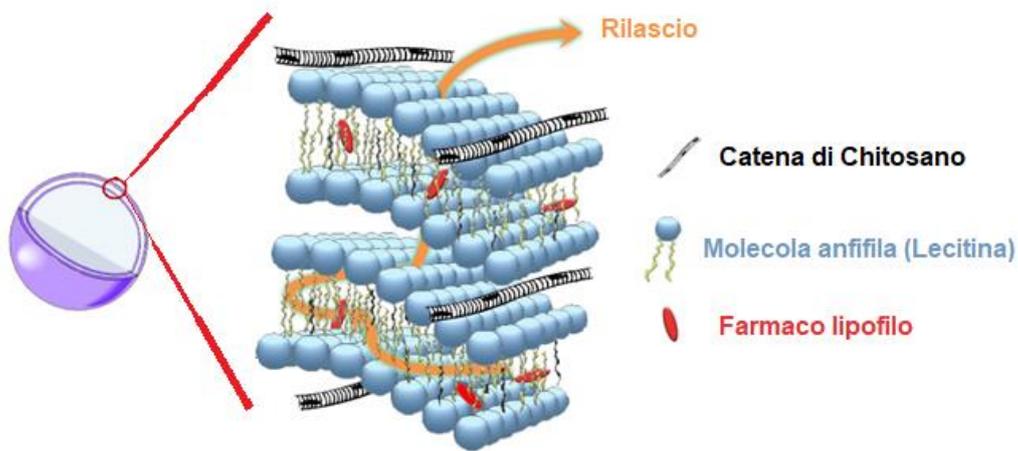


Figura 4. Illustrazione della struttura fisica delle nanoparticelle di lecitina:chitosano. Fonte: adattato da GERELLI et al. (2010).

Alcuni studi hanno dimostrato che la struttura delle LCN è influenzata dalle caratteristiche chimiche del farmaco incapsulato. Le LCN senza farmaci o con farmaci incorporati a carica neutra, ad esempio il progesterone, formano un unico núcleo, con una dimensione tipica di 700Å, circondato da un doppio strato lipidico contenente sulla sua superficie uno strato di chitosano (GERELLI et al., 2008a). Tuttavia, per quanto riguarda l'incorporazione nelle LCN di farmaci a carica positiva, come TAM, sono stati identificati alcuni cambiamenti strutturali. Nonostante la sua caratteristica liposolubilità, quando il TAM è incorporato nelle LCN occupa regioni periferiche delle nanoparticelle. Questa caratteristica del TAM provoca un cambiamento nella conformazione strutturale delle LCN giustificato dalla competizione tra il farmaco e le molecole di chitosano, interferendo nell'interazione tra lecitina e chitosano (GERELLI et al., 2008b).

Successivamente, l'utilizzo di olii ha permesso l'aumento dell'efficienza di incapsulazione del farmaco sinvastatina nelle LCN (CLEMENTINO et al., 2016). E' stata utilizzata una combinazione di monoleato di glicerina (Maisina) e trigliceridi a media catena (Labrafac). L'effetto positivo dell'aggiunta degli olii ha portato ad una migliore localizzazione del farmaco nel nucleo oleoso delle LCN, suggerendo l'ipotesi che la Maisina, un lipide con punto di fusione di 40°C, durante il riscaldamento si mescola facilmente con il Labrafac, formando in fase di

raffreddamento un nucleo oleoso semisolido che favorisce l'incapsulazione del farmaco.

La versatilità di questo tipo di nanosistema ha richiamato l'attenzione di molti ricercatori in diverse aree di ricerca. Le nanoparticelle di lecitina:chitosano sono capaci di veicolare farmaci con differenti caratteristiche fisiche, come per esempio la melatonina (CORREA et al., 2020), il raloxifene (MURTHY et al., 2020), il propranololo (KHALIL et al., 2020), l'aciclovir (MAHMOOD et al., 2020), le statine (CLEMENTINO et al., 2018), la capsaicina (TERRON-MEJIA et al., 2018), la quercetina (SOUZA et al., 2018), l'amfotericina B (JAIN et al., 2018), il diflucortolone valerato (OZCAN et al., 2013), l'insulina (LIU et al., 2016), il clobetasolo propionato (SENYIGIT et al., 2009), il kaempferolo (IHK et al., 2017), il β -lapachone (MORENO et al., 2015) ed altri ancora. Questi nanosistemi, oltre ad essere capaci di incapsulare in modo efficiente sostanze dotate di diversa attività terapeutica, sono i più utilizzati come carrier di farmaci antineoplastici. A tal proposito si possono citare sistemi per l'incapsulamento di farmaci quali il paclitaxel (CHU et al., 2019), la doxorubicina (ALKHOLIEF et al., 2019), il cisplatino (KHAN et al., 2019), l'epicatechina (PEREZ-RUIZ et al., 2018), il tamoxifene (BARBIERI, et al, 2015), ecc.

Il largo impiego delle LCN in progetti che prevedono l'utilizzo di farmaci antitumorali ha come obiettivo il superamento di limiti legati agli effetti su cellule sane. In questo senso, le LCN si mostrano promettenti presentando un'elevata stabilità, e consentendo l'incorporazione di ligandi. Negli ultimi anni nanoparticelle che contengono chitosano come componente strutturale sono state ampiamente utilizzate in particolare per quanto riguarda la loro funzionalizzazione per il trattamento del cancro (MONSALVE et al, 2015, NAG et al., 2016, ESFANDIARPOUR-BOROUJENI et al., 2017). A causa della presenza di gruppi amminici nella sua struttura chimica, il chitosano diventa un materiale di superficie ideale per interagire covalentemente con sostanze vettorizzanti, siano essi ligandi specifici o anche piccole molecole come la glicirrizina (GLZ) (TIAN et al., 2012, CHENG et al., 2013, EL-MARAKBY et al., 2017).

1.3 Applicazione di nanosistemi in ambito terapeutico

Negli ultimi anni la nanotecnologia e i nanosistemi hanno destato molta attenzione a causa della loro ampia versatilità, potendo essere utilizzati per il

trattamento di varie patologie. Nel 2016 Bobo e collaboratori hanno svolto un'indagine sui nanosistemi sviluppati negli ultimi anni, mostrando che 51 di essi sono stati approvati dalla "Food and Drug Administration" (FDA) mentre 77 erano in fase di studio clinico, di cui circa il 40% erano stati iniziati a metà del 2015. Un'altra informazione inerente gli studi condotti su nuove formulazioni in scala nanometrica è che la maggior parte di esse hanno come scopo l'impiego nel trattamento del cancro (AMJADI et al., 2012) e molte di queste formulazioni hanno generato medicinali innovativi che sono attualmente in commercio. Esistono micelle polimeriche, emulsioni e particelle solide già in uso per lo sviluppo di medicinali, possiamo citarne alcuni quali Caelyx®, Doxil®, Transdrug® e Abraxane® (KARGOZAR e MOZAFARI, 2018).

Nel trattamento dei tumori, i nanosistemi sono impiegati comunemente per eliminare o ridurre gli effetti avversi causati da farmaci antitumorali poco specifici per le cellule cancerogene e quindi tossici per le cellule sane del nostro organismo. I nanocarrier infatti vengono utilizzati come strumenti per aumentare la biodisponibilità e quindi l'efficacia dei farmaci antitumorali ottenendo un maggior accumulo del farmaco in un sito specifico dell'organismo (DIN et al., 2017). Alcuni studi *in vivo* hanno mostrato che le nanoparticelle possono aumentare il tempo di circolazione del farmaco nell'organismo e il suo accumulo nel tumore, evidenziando anche un aumento della permeazione e della ritenzione del farmaco (ZHONG et al., 2014). La vettorializzazione della superficie delle particelle, processo conosciuto anche come "decorazione", è un altro strumento che permette l'aumento dell'attività biologica di farmaci già noti (HARRIS et al., 2019). Sono stati pubblicati numerosi studi pre-clinici su diversi tipi di tumore utilizzando nanoparticelle decorate con ligandi (DITTO et al., 2012; ZHONG et al., 2014; KHONDEE et al., 2018; MEHATA et al., 2018).

1.4 Vettorializzazione di nanoparticelle per il cancro

La nanomedicina è un'area che negli ultimi anni è stata esplorata come strumento per il direccionamento dei farmaci a siti specifici. Con il progredire delle conoscenze di medicina molecolare, di biochimica e d'intelligenza artificiale, la nanomedicina ha dimostrato di poter essere una nuova e promettente alternativa rispetto alla terapia convenzionale sviluppando e suggerendo nuove forme di diagnosi e cura dei tumori (RAJ et al., 2019). L'uso della nanotecnologia applicata

alla medicina fornisce vari benefici ed è alla base di numerosi studi effettuati con agenti chemioterapici, allo scopo di ridurre gli eventi avversi derivanti dal trattamento terapeutico antineoplastico, tra cui spicca lo sviluppo di nanocarriers di farmaci vettorizzati. Studi preclinici e clinici con questo tipo di formulazioni hanno dato buoni risultati nella terapia antitumorale, nonostante i limiti dell'efficacia terapeutica a causa della complessità biologica dei tumori e della diversità genetica che li caratterizza (LI et al., 2017; MARQUES et al., 2020).

All'inizio degli anni 2000 fu introdotto da Paul Ehrlich il concetto di "magic bullet" e, attraverso i progressi compiuti nella nanomedicina, la tecnica di "vettorializzazione" ha permesso una maggiore selettività del farmaco nel raggiungimento delle cellule e dei tessuti tumorali. In questo contesto con l'intenzione di indirizzare dosi maggiori di farmaco verso bersagli specifici, le nanoformulazioni vengono adeguatamente progettate per seguire diverse forme di vettorializzazione (SRINIVASARAO et al., 2015). Attraverso la decorazione di nanoparticelle con ligandi che riconoscono bersagli biologici è possibile il raggiungimento del farmaco verso un bersaglio cellulare specifico e/o il controllo dell'assorbimento intracellulare (COUVREUR, 2012). L'aggiunta di un ligando non solo facilita l'ingresso del farmaco nelle cellule tumorali, ma aumenta anche la ritenzione e l'accumulo delle particelle nella regione tumorale, che di conseguenza viene tradotto in un aumento significativo dell'efficacia terapeutica dei farmaci antitumorali e in una diminuzione degli effetti tossici sistemici (ZHANG et al., 2014; HARRIS et al., 2019).

La vettorializzazione di nanoparticelle indirizzate a una massa tumorale può avvenire in modo passivo o attivo. I due tipi di vettorializzazione sono illustrati e schematizzati in Figura 5. La vettorializzazione passiva avviene dopo che le nanoparticelle escono dalla circolazione sanguigna attraverso la diffusione passiva con miglioramento della permeabilità e dell'effetto di ritenzione (*EPR-effect: the enhanced permeability and retention effect*), raggiungendo posizioni periferiche dell'organismo come nel caso dei tumori. Questo tipo di strategia è strettamente connessa con le caratteristiche chimiche del microambiente tumorale (pH) e con le caratteristiche fisiche del vettore. Per esempio, particelle di dimensioni comprese tra 40 e 200 nm mostrano un maggior tempo di circolazione sanguigna, con conseguente maggiore accumulo nella massa tumorale e minore eliminazione

dall'organismo (MISHRA et al., 2016; RAJ et al., 2019; SANNA & SECCHI, 2020).

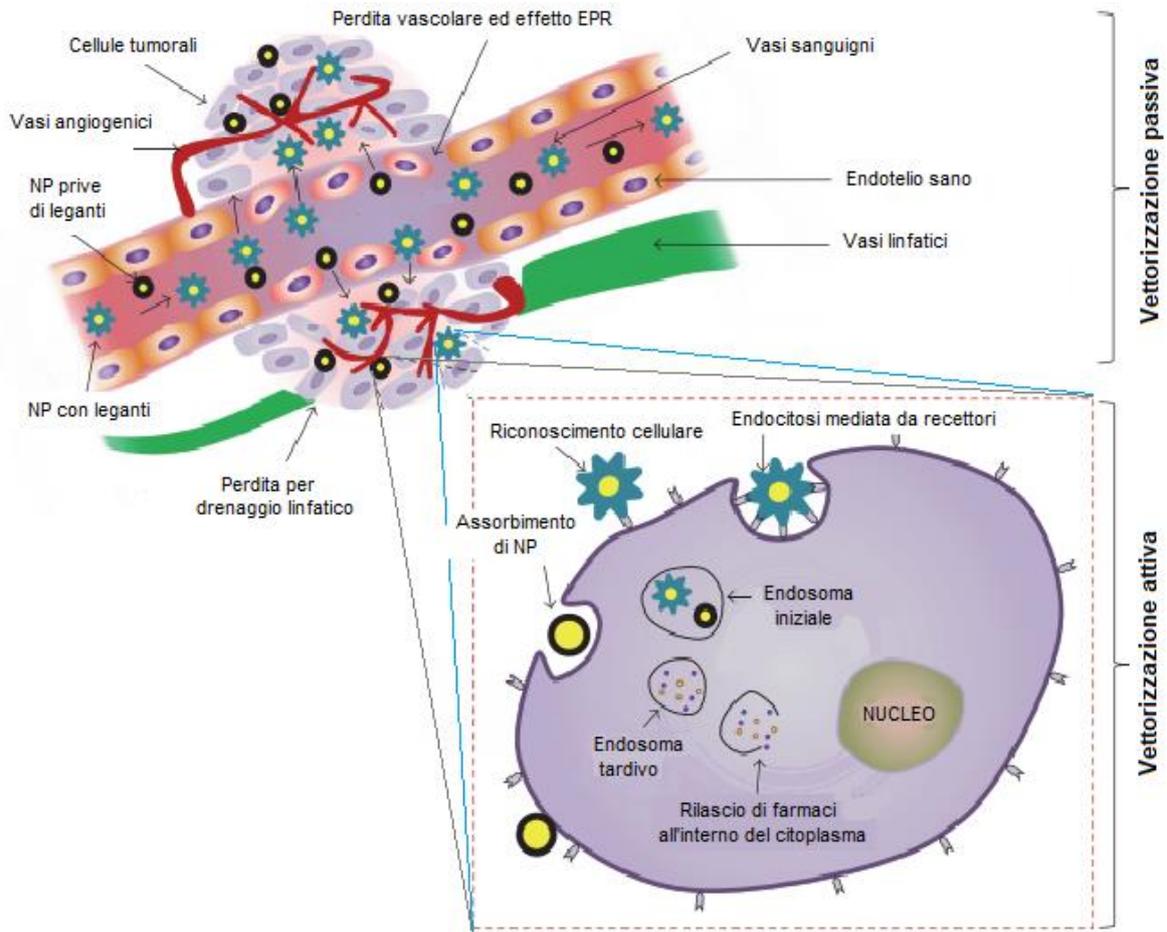


Figura 5. Illustrazione dei tipi di vettorizzazione attiva e passiva. Il diagramma mostra anche i diversi tipi di ligandi che possono decorare le nanoparticelle. I termini contenuti nel testo significano: EPR - *Enhanced permeability and retention*; NP - Nanoparticelle; PEG - Glicole polietilenico. Fonte: adattato da JAHAN et al. (2017).

La vettorizzazione attiva implica un maggiore accumulo delle nanoparticelle in regioni particolari dell'organismo a causa dell'interazione diretta con un recettore bersaglio, con conseguente maggior assorbimento a livello cellulare. Questa strategia di vettorizzazione presenta un vantaggio rispetto a quella di tipo passivo a causa della maggiore affinità delle nanoparticelle per il bersaglio biologico. Ne consegue una maggior permanenza del farmaco nel sito infiammatorio e maggior assorbimento cellulare. Tuttavia, la sfida più grande per lo sviluppo di particelle attive è data dal fatto che dopo la circolazione nel sangue e successivo ingresso nel tessuto tumorale, necessitano di essere vicine al bersaglio per poter interagire (circa 0,5 mm). Inoltre, le dimensioni, la forma e il tipo di membrana delle nanoparticelle

influenzano la scelta del tipo di ligando che sarà aggiunto. Possono essere utilizzati come ligandi proteine, peptidi, anticorpi e suoi frammenti, acidi nucleici, aptameri e piccole biomolecole (Figura 2) (MISHRA et al., 2016; RAJ et al., 2019; SANNA e SECCHI, 2020). In questo lavoro di tesi è stata studiata la glicirrizina come potenziale vettore per il trattamento del cancro al fegato e al seno.

1.5 Glicirrizina come vettore di nanoparticelle

La glicirrizina (GLZ), denominata anche acido glicirrizico, è una saponina glicosidica formata da due molecole di acido glucuronico (porzione idrofila) e una di aglicone riferita all'acido glicirretico (porzione idrofobica) (Figura 6). Questo farmaco si trova in natura nella liquirizia ed è il principale componente (10 – 25%) della specie *Glycyrrhiza glabra* (OMAR et al., 2012; ROSHAN et al., 2012; MATSUOKA et al., 2016; BELLUSSI et al., 2017). La solubilità della glicirrizina è relativamente bassa e può essere influenzata dal pH del mezzo. In ambiente acido (pH 4,5) presenta una solubilità di 2,0 g/L, mentre in ambiente basico (pH 8,5) mostra una solubilità di 8,0 g/L (MATSUOKA et al., 2016; LI et al., 2019).

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi riguardanti l'attività farmacologica della GLZ che include l'attività antinfiammatoria (SHAH et al., 2018), antitumorale (ZHOU et al., 2019), antivirale (SUN et al., 2019), epatoprotettiva (HUA et al., 2019), neuroprotettiva (SUN et al., 2018), antiepatite (ZHANG et al., 2019), oltre al fatto di non presentare effetti tossici anche ad elevate concentrazioni (BELLUSSI et al., 2017). A causa delle attività biologiche sopra menzionate, la GLZ è stata studiata anche in relazione alla sua capacità di vettorizzare nanosistemi per alcune malattie o bersagli nell'organismo. La maggior parte di questi studi è correlato a patologie del fegato, tuttavia la GLZ libera ha anche mostrato un'elevata affinità per la proteina ad alta mobilità (HMGB1), che si trova comunemente in alte concentrazioni nelle malattie infiammatorie e nel cancro.

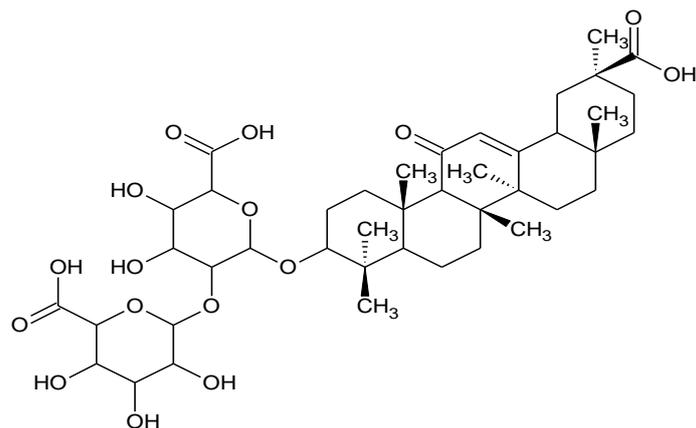


Figura 6. Struttura molecolare della glicirrizina (acido glicirrizico).

1.6 Bersagli biologici della glicirrizina

1.6.1 EPATOCITI

Vari studi hanno dimostrato una grande affinità della GLZ per recettori specifici presenti nella membrana degli epatociti (OSAKA et al., 1994; TSUJI et al., 1991), rendendolo un efficiente vettore per le nanoparticelle, aumentando l'effetto terapeutico dei farmaci per patologie epatiche, in particolare nel caso di carcinoma epatocellulare (ZU et al., 2013; WU et al., 2017). Nel 1986 Ichikawa et al. hanno dimostrato che l'80% della dose di GLZ somministrata per via endovenosa nei topi veniva escreta. Ciò spinse altri ricercatori allo sviluppo di formulazioni in grado di direzionare i farmaci a livello epatico, basandosi sull'ipotesi che la GLZ potesse avere recettori specifici nel fegato (ICHIKAWA et al., 1986). Tsuji et al. inserirono la GLZ sulla membrana di liposomi con l'obiettivo di creare un nuovo nanosistema in grado di direzionare un farmaco al fegato. Dopo 4 ore, il 42,4% della dose di farmaco somministrato attraverso questo sistema si era accumulato nel fegato, suggerendo la presenza di recettori epatici specifici per la GLZ (TSUJI et al., 1991).

In seguito, nel 1994 lo stesso gruppo di ricerca pubblicò un altro articolo che confermava la presenza di recettori specifici per la GLZ nel fegato. In questo studio, inizialmente epatociti di topi furono messi in contatto con una soluzione di GLZ ad una concentrazione di 50 mM, che causava la saturazione dei recettori e di conseguenza riduceva l'assorbimento dei liposomi rivestiti di GLZ dell'80%. Questo effetto non si è osservato in presenza della formulazione senza GLZ, confermando

che i recettori presenti sono bersagli specifici per il ligando. Inoltre, fu effettuato un esperimento che permettesse di capire quale parte della molecola di GLZ si legasse al recettore. Il test fu realizzato con cellule pre-incubate in una soluzione di GLZ ad una concentrazione di 20mM, in grado di inibire l'assorbimento dei liposomi. Questo risultato mostrò che non vi era riduzione nell'assorbimento dei liposomi, indicando che la porzione che si legava al recettore degli epatociti era l'acido glicirretico. Pertanto, è stato osservato che i liposomi erano internalizzati dagli epatociti e non solo la parte che si legava nella membrana, aumentando il rilascio del farmaco all'interno della cellula. Questo ha mostrato che l'assorbimento di liposomi negli epatociti era 20 volte maggiore rispetto a quello dei liposomi privi di GLZ (OSAKA et al., 1994). Lo studio ha aperto le frontiere allo sviluppo di nuovi prodotti per il trattamento di patologie epatiche, soprattutto considerando che molte di esse sono gravi e vengono trattate con farmaci che presentano un ridotto assorbimento e di conseguenza una ridotta efficacia (ZHANG et al., 2015).

2.6.2 HMGB1

Per quanto riguarda la vettorializzazione finalizzata verso altri obiettivi, uno studio realizzato nel 2007 da Mollica et al. ha mostrato che la glicirrizina può essere un efficiente targeting per la sua affinità con i compartimenti "A" e "B" della proteina ad alta mobilità HMGB1 (Figura 7). Nello studio è stata confermata l'inibizione dell'attività chemo-attrattiva e della mitogenesi della proteina. Una volta instaurato un legame tra glicirrizina e HMGB1 avviene un meccanismo che può essere spiegato attraverso la trasduzione di una serie di segnali che condizionano in modo diretto e indiretto le interazioni con alcuni recettori (leganti TLR2, TLR4 e RAGE), che regolano negativamente l'espressione di citochine e altri mediatori (MOLLICA et al., 2007). Alcune strategie prevedono l'utilizzo di molecole con affinità per il recettore HMGB1, bersaglio di piccole molecole, che principalmente nel mezzo extracellulare attuano un antagonismo competitivo con la proteina per prevenire la liberazione di HMGB1 o inibirne l'attività (VENERAU et al., 2016)

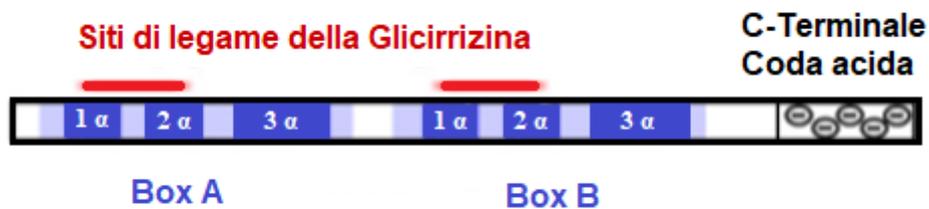


Figura 7. Proteina umana ad alta mobilità (HMGB1 - High Mobility Group Box 1). Specificità della glicirrizina dai siti omologhi (Box A e B) di HMGB1. Fonte: adattato da GIRARD (2007).

Negli ultimi anni sono state studiate piccole molecole, aventi la capacità di inibire alcune delle attività patologiche generate dalla HMGB1, alcune di origine sintetica (nafamostat, sivelestat, atorvastatina, simvastatina, gabesato mesilato, metotrexato) e altre di origine naturale, tra cui la glicirrizina (MUSUMECI et al., 2014). Questa peculiarità della glicirrizina la rende un farmaco promettente per il raggiungimento del bersaglio HMGB1 (SMOLARCZYK et al., 2012; SUN et al., 2018), inquadrandosi come un vettore specifico anche per il cancro al seno (KANG et al., 2013, SOHUN e SHEN, 2016).

La proteina HMGB1 è definita come una proteina cromosomica altamente conservata, non istonica, presente in varie parti dell'organismo e arricchita di cromatina attiva, facente parte della famiglia di proteine ad alta mobilità (SOHUN e SHEN, 2016). E' anche una proteina di legame al DNA che funziona come cofattore strutturale critico per la regolazione di un'adeguata trascrizione in cellule somatiche. La proteina HMGB1 è stata scoperta nel timo del vitello e deve il suo nome alla mobilità elettroforetica in gel di poliaccrilammide. Questa proteina svolge due funzioni principali, intra ed extracellulare. All'interno della cellula la HMGB1 agisce come un accompagnatore del DNA, mentre all'esterno la HMGB1 è un prototipo di modello molecole associato al danno, agendo con citochine, chemochine e fattori di crescita (ULLOA e MESSMER, 2016; KANG et al., 2013; SOHUN e SHEN, 2016; VENERAU et al., 2016).

Alcuni studi hanno dimostrato che questa proteina multifunzionale raggiunge passivamente l'ambiente extracellulare dopo il danno o la morte cellulare, e in questo ambiente la proteina HMGB1 è capace di promuovere la moltiplicazione di cellule dendritiche mieloidi e plasmocitoidi, agendo inoltre come un potente promotore dell'attività infiammatoria che contribuisce alla patogenesi di processi infiammatori o

infezioni (ULLOA e MESSMER, 2006; KANG et al., 2013, SOHUN e SHEN, 2016; VENERAU et al., 2016). HMGB1 può contribuire alla tumorigenesi o in altri casi a miglioramenti nel trattamento del cancro, attraverso la chemioterapia o la radioterapia (KANG et al., 2013; HE et al., 2017). Zhao et al. (2017) hanno dimostrato, attraverso studi con cellule di tumore al seno, che la HMGB1 esercita funzioni paradossali promuovendo la tumorigenicità o la progressione del cancro. Oltre a questo, HMGB1 è più abbondante in un tessuto neoplastico rispetto ad un tessuto sano, specialmente nel fegato, nel colon, nel retto e nel seno (HE et al., 2017).

il rilascio di HMGB1 nell'ambiente extracellulare dopo la morte di cellule tumorali può avere un effetto modulatore nell'infiammazione locale del tumore e nel tasso di crescita delle cellule neoplastiche (YAMADA e MARUYA, 2007; SRINIVASAN et al., 2014). Quindi, la HMGB1 può essere utilizzata come "oncotarget" (KANG et al., 2013). L'interazione tra HMGB1 e fattori di trascrizione ne aumenta la loro attività. Un esempio è l'aumento dell'attività dei recettori per gli estrogeni (ER) che stimolano la cancerogenesi. Alcuni studi hanno confermato che HMGB1 extracellulare in caso di tumore è importante per il risultato della chemioterapia e radioterapia, inoltre regola la localizzazione del marcatore necrotico tumorale. HMGB1 mostra di avere un ruolo importante nei progressi per il trattamento dei tumori, incluso in maniera specifica il cancro al seno (ULLOA e MESSMER, 2006; KANG et al., 2013; SRINIVASAN et al., 2014; SOHUN e SHEN, 2016).

La funzionalizzazione delle nanoparticelle con la glicirrizina è stata ampiamente utilizzata grazie alla sua origine naturale e alla sua ampia funzionalità. La letteratura ha dimostrato che la sua applicazione come componente esterno delle nanoparticelle avviene principalmente con lo scopo di vettorializzare un farmaco incapsulato ad un sito specifico, essendo le cellule epatiche il principale bersaglio. Tuttavia, vari studi puntano sulla specificità della glicirrizina libera per la proteina HMGB1, presente in stati infiammatori e in vari tipi di cancro. A tal proposito, per la prima volta attraverso il nostro studio è stato indagato il potenziale della glicirrizina come targeting di nanoparticelle da sfruttare per il trattamento del tumore al seno. Le nanoparticelle di lecitina:chitosano sono state utilizzate in questo studio per i benefici legati alla loro stabilità chimica e fisica. Nonostante siano una struttura già utilizzata in altre ricerche per caricare farmaci con diverse caratteristiche, non esiste ancora in letteratura uno studio che abbinati i benefici funzionali alla loro struttura esterna.

Pertanto l'obiettivo principale di questo progetto di dottorato è stato comprendere l'azione di funzionalizzazione della glicirrizina nei nanosistemi e sviluppare nanoparticelle ibride di lecitina:chitosano decorate con glicirrizina per il trattamento del tumore al seno.

3.1 Materiali

Il chitosano a basso peso molecolare (LMWC) con grado di acetilazione 85%, viscosità di 20-300 cp e peso molecolare di 50 KDa, è stato acquistato da Sigma-Aldrich® (Italia). La lecitina lipoida S45 è stata acquistata da Lipoid AG (Ludwigshafen, Germania). Maisine CC™ (glicerolo monoleato) e Labrafac™ Lipophile WL1349 (catena media di trigliceridi) sono stati messi a disposizione da Gattefossé (Saint-Priest, Francia). Il tamoxifene (TAM) prodotto da Plantex Ltd (Netanya, Israele) è stato fornito da Lisapharma S.p.A. (Erba, Italia). La glicirrizina (GLZ) è stata ottenuta da Chemyunion G.A. (Brasile). Negli esperimenti è stata utilizzata acqua ultrapura (0,055 µS/cm, TOC 1 ppb) ottenuta dall'apparecchiatura del sistema di acqua ultrapura Purelab pulse + Flex (Elga, Veolia, Milano, Italia). Acetonitrile ed etanolo, alto grado di purezza, sono stati acquistati da VWR Chemicals (Radnor, Pennsylvania, USA). In alcune fasi del lavoro sono stati utilizzati i filtri in acetato di cellulosa da 0,45 µm (Sartorius, Gottingen, Germania). L'ultra-filtro per centrifugazione (Vivaspin® 2; peso molecolare 30000 [MWCO], PES) è stato acquistato da Sartorius (Gottingen, Germania).

3.2 Preparazione delle nanoparticelle ibride

3.2.1 AGGIUNTA DI DIVERSE QUANTITÀ DI CHITOSANO

Le nanoparticelle ibride di lecitina:chitosano (LCN) sono state preparate secondo formazione spontanea, seguendo il metodo di Barbieri et al. (2015) con alcune modifiche. Prima di preparare la formulazione è stata ottenuta una soluzione acida di LMWC (10 mg/mL) in HCl (1%) mediante agitazione magnetica per 24 ore. Questa soluzione è stata conservata in frigorifero per l'uso successivo. Il giorno della preparazione delle nanoparticelle sono state preparate contemporaneamente due soluzioni: (1) acquosa e (2) etanolica. La soluzione acquosa (1) è stata preparata con 4 diversi volumi di soluzione acida di LMWC in acqua ultrapura (quantità necessaria per 92 mL) (Tabella 1). Dopo completa omogeneizzazione, la soluzione

acquosa è stata filtrata attraverso filtri di acetato di cellulosa (0,45 µm). La soluzione etanolica (2) è stata preparata con lecitina (2,5%). Alla soluzione etanolica è stato aggiunto TAM (60 mg) fino a completa omogeneizzazione. La soluzione etanolica di lecitina (8 mL) è stata iniettata nella soluzione acquosa utilizzando una pipetta di vetro, sotto costante agitazione (500 rpm) a 50°C. Per la completa evaporazione dell'etanolo, la formulazione è stata agitata per 1,5 ore a 350 rpm, mantenendo la temperatura a 50°C. A causa dell'aggiunta di diverse concentrazioni di LMWC nella fase acquosa, sono state ottenute 4 formulazioni (Tabella 1) le quali presentavano valori di pH da 2,1 a 3,8. Dopo il primo giorno di conservazione, il pH di tutte le LCN è stato regolato a 6.

Tabella 1. Proporzione dei componenti delle TAM_LCN e la loro rispettiva denominazione.

Concentrazione di chitosano	Concentrazione di lecitina	Concentrazione di tamoxifene	Denominazione delle LCN
0,1 mg/mL	2 mg/mL	0,6 mg/mL	TAM_LCN ₂₀ ¹
0,2 mg/mL	2 mg/mL	0,6 mg/mL	TAM_LCN ₂₀ ²
0,4 mg/mL	2 mg/mL	0,6 mg/mL	TAM_LCN ₂₀ ⁴
0,8 mg/mL	2 mg/mL	0,6 mg/mL	TAM_LCN ₂₀ ⁸

3.2.2 INCORPORAZIONE DI FASE OLEOSA

La formulazione TAM_LCN₂₀⁴, scelta tra quelle nella sezione precedente, è stata aggiunta una miscela di oli Labrafac e Maisine in rapporto 1:1. Le LCN, contenenti una fase oleosa, sono state preparate seguendo la procedura descritta nella sezione 3.2.1. Gli olii sono stati incorporati attraverso la loro solubilizzazione nella soluzione etanolica di lecitina, prima della solubilizzazione del TAM. Per valutare la concentrazione ideale della miscela di olio, sono state testate le seguenti concentrazioni: 1, 2 e 4 mg/mL. A queste formulazioni sono state attribuite le denominazioni considerando la concentrazione della fase oleosa (Tabella 2). La concentrazione di TAM nelle formulazioni è rimasta del valore di 0,6 mg/mL.

Tabella 2. Quantità di Maisine e Labrafac aggiunta alle nanoparticelle e denominazione delle LCN formate.

Designazione delle nanoparticelle	Fase oleosa	
	Labrafac	Maisine
α LCN	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
β LCN	1 mg/mL	1 mg/mL
γ LCN	2 mg/mL	2 mg/mL

3.2.3 AGGIUNTA DI DIVERSE CONCENTRAZIONE DI GLICIRRIZINA

Prima dell'aggiunta della glicirrizina sulla membrana delle nanoparticelle, GLZ è stata sottoposta al processo di ossidazione utilizzando il metodo descritto da Lin et al. (2008). Una soluzione fredda di carbonato in acqua MilliQ (NaHCO_3 : 0,0784 g in 3,7 ml; Na_2CO_3 : 0,02184 g in 1,3 ml) è stata preparata a pH 9,5. In questa soluzione la GLZ è stata solubilizzata nella concentrazione di 0,5 μM . È stata anche preparata una soluzione fredda di periodato di sodio (NaIO_4) (10,8 mg/mL). Le soluzioni sono state quindi miscelate in volumi uguali, sotto agitazione magnetica per 180 minuti e a temperatura controllata di $4 \pm 2^\circ\text{C}$ in un bagno di ghiaccio. In seguito, sono stati aggiunti 40 ml di metanolo e la soluzione è stata filtrata per rimuovere il materiale non solubilizzato. L'intera procedura è stata eseguita in atmosfera di azoto. Il metanolo è stato evaporato utilizzando un evaporatore rotante e la soluzione è stata liofilizzata. Si è ottenuta GLZ ossidata che macroscopicamente si presentava come una polvere gialla, che è stata analizzata mediante $^1\text{H NMR}$.

Dopo un giorno di conservazione delle β LCN a temperatura ambiente (25°C), il suo pH è stato regolato a 6,0 utilizzando NaOH (1 N). È stata formata una soluzione con GLZ ossidata (1 mg/mL), sciolta in acqua MilliQ, ed è stata aggiunta goccia a goccia alle LCN sotto agitazione magnetica (80 rpm). Le formulazioni sono state agitate per 6 ore. Sono state aggiunte quattro concentrazioni di GLZ (Tabella 3) considerando la concentrazione di chitosano in β LCN (0,4 mg/mL).

Tabella 3. Denominazione delle β LCN contenenti diverse concentrazioni di glicirrizina.

Denominazione delle nanoparticelle con GLZ	Concentrazione di GLZ
β LCN_GIz ¹	0,028 mg/mL
β LCN_GIz ²	0,056 mg/mL
β LCN_GIz ³	0,112 mg/mL
β LCN_GIz ⁴	0,200 mg/mL

3.3. Caratterizzazione delle nanoparticelle

3.3.1 DISPERSIONE DINAMICA DELLA LUCE

La dimensione media delle nanoparticelle (Z-media), l'indice di polidispersione (pdi) e il potenziale zeta (PZ) sono stati misurati utilizzando la tecnica di dispersione dinamica della luce (*Dynamic Light Scattering* - DLS). È stato utilizzando Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Malvern, Regno Unito) applicando Back-Scatter non invasivo (angolo di diffusione 173°) a 25°C. Prima di eseguire le analisi, le LCN sono state diluite in acqua ultrapura (1:100). Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato. Nella prima fase, sono state analizzate LCN con diverse proporzioni di lecitina:chitosano contenenti TAM (TAM_LCN₂₀¹, TAM_LCN₂₀², TAM_LCN₂₀⁴ e TAM_LCN₂₀⁸) prima e dopo la regolazione del pH. Dopo aver incorporato la fase oleosa nella formulazione selezionata in diverse concentrazioni (α LCN, β LCN e γ LCN), le nanoparticelle sono state caratterizzate nei giorni 1 e 28 dopo la produzione. Sempre nella seconda fase sono state valutate anche la Z-media e il PZ di una formulazione extra formata da micelle di lecitina contenenti TAM e fase oleosa, nella stessa proporzione di β LCN, denominata LN_TAM_Mailab. Dopo aver analizzato le LCN, nella terza fase è stata scelta la formulazione β LCN, in base alla sua stabilità nel periodo di conservazione, in seguito all'aggiunta di 4 concentrazioni di GLZ (Tabella 3), sono state valutate anche i parametri fisici nei giorni 1 e 7 in seguito alla produzione.

2.3.2 MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE

La morfologia delle LCN selezionate (β LCN e β LCN_GLZ₂) è stata analizzata utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione (TEM), JEM-2100, Jeol, Tokyo, Giappone, dotato di EDS, Thermo Scientific, operante a 200 kV. I campioni sono stati fatti gocciolare su un parafilm e coperti con una griglia. Dopo 10 minuti di riposo, il campione in eccesso è stato rimosso utilizzando carta da filtro. Successivamente la griglia è stata colorata con una goccia di acetato di uracile al 2%, essiccata a temperatura ambiente ed analizzata.

2.3.3 DINAMICA MOLECOLARE

Sono stati utilizzati metodi computazionali per studiare l'interazione tra micelle formate da lecitina ricoperta di chitosano in presenza di GLZ. Il modello formato da lecitina, chitosano e GLZ è stato costruito utilizzando il software Packmol (MARTINEZ et al., 2009). Per valutare l'interazione dei componenti delle LCN sono state eseguite simulazioni di dinamica molecolare (DM) con il software Amber 16 (SALOMON-FERRER et al., 2013; PINTO et al., 2019). In queste simulazioni, sono stati utilizzati il campo di forza General Amberforce (GAFF) (WANG et al., 2004) e il campo di forza Lipid14 (DICKSON et al., 2014). Lo scopo di questa analisi è di valutare le LCN in un sistema biologico, per questo le simulazioni sono state eseguite in un mezzo acquoso con la simulazione delle molecole d'acqua descritte dal modello TIP3P (JORGENSEN et al., 1983).

Quindi, per mezzo del software amber il sistema molecolare è stato sottoposto a fasi di minimizzazione dell'energia e riscaldamento per generare successivamente le traiettorie delle simulazioni di produzione di DM. Le minimizzazioni energetiche sono avvenute in tre fasi. Inizialmente gli atomi di idrogeno delle molecole d'acqua sono stati ridotti al minimo utilizzando 5000 passaggi dell'algoritmo di discesa più ripida e 4000 passaggi del gradiente coniugato. Quindi tutti gli atomi di idrogeno di lecitina, chitosano, GLZ e molecole d'acqua sono stati ottimizzati utilizzando 6000 passaggi dell'algoritmo di discesa più ripida e 5000 passaggi del gradiente coniugato. Nella terza fase l'intero sistema, soluto e solvente,

è stato sottoposto a 5000 passaggi dell'algoritmo di discesa più ripida e 3000 passaggi del gradiente coniugato per ridurre al minimo l'energia. Dopo la minimizzazione, i sistemi sono stati gradualmente riscaldati fino a 298 K in 1 nanosecondo di simulazione DM. Infine, sono stati generati 20 nanosecondi di simulazioni di produzione di DM. Il metodo *Particle Mesh Ewald* (DARDEN et al., 1993) è stato utilizzato per calcolare le interazioni elettrostatiche. L'algoritmo SHAKE (RYCKAERT et al., 1977) è stato utilizzato per limitare le interazioni dell'idrogeno e la temperatura del sistema è stata controllata con il termostato Langevin (LZAGUIRRE et al., 2001) con una frequenza di collisione di 2 ps⁻¹. Le fasi di minimizzazione dell'energia sono state eseguite utilizzando pmemd.MPI, mentre le simulazioni DM sono state generate utilizzando pmemd.CUDA (SOLOMON-FERRER et al., 2013).

2.3.4 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IN TRASFORMATA DI FOURIER

Al fine di identificare e confermare le interazioni che si verificano tra i componenti delle LCN (materiali in superficie, farmaco e fase oleosa) e la coniugazione LCN:GLZ (con diverse proporzioni di GLZ), sono state eseguite analisi spettroscopiche nella regione dell'infrarosso in trasformata di Fourier (FTIR). I campioni sono stati tutti essiccati a temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$). Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro Thermo Nicolet 5700 dotato di un diamante Thermo Smart Orbit ATR. L'intervallo di scansione delle lunghezze d'onda è stato 4000-400 cm⁻¹ con un potere di risoluzione di 2 cm⁻¹.

2.3.5 SPETTROSCOPIA ELETTRONICA DI ASSORBIMENTO UV-VIS E ANALISI IN DERIVATA SECONDA

Gli spettri di assorbimento di TAM, GLZ e LCN e delle formulazioni risultanti (βLCN e $\beta\text{LCN_GLZ}_2$) sono stati acquisiti in uno spettrofotometro JASCO, modello V-670. Tutti i campioni sono stati diluiti nella proporzione 1:400 v/v per ridurre al minimo gli effetti di diffusione della luce. Come solvente è stata utilizzata acqua pura, ad eccezione del TAM che è stato sciolto in etanolo. Durante le misurazioni, i campioni sono stati posti in cuvette di quarzo con cammino ottico di 1,0 cm. L'analisi

della derivata seconda degli spettri (SAAKOV et al., 2013) è stata impiegata e ha fornito ulteriori approfondimenti sui picchi nascosti.

2.3.6 CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE

L'analisi termica è stata eseguita mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC) condotta in un calorimetro modello DSC-60 (Shimadzu), in atmosfera di azoto, con un flusso di 50 mL/min e una velocità di riscaldamento di 10°C/min nell'intervallo di scansione 25 - 300°C. I campioni secchi sono stati posti, in quantità di circa 5-10 mg, in un crogiolo aperto di alluminio e sono stati successivamente analizzati. La perdita di massa e le variazioni di entalpia sono state stimate utilizzando il programma TA 60w (Shimadzu), come descritto da Gomes et al. (2020).

2.3.7 QUANTIFICAZIONE DI TAM E GLZ NELLE NANOPARTICELLE

L'apparecchiatura utilizzata per la determinazione del contenuto di TAM e di GLZ nelle nanoparticelle è stato un cromatografico Agilent serie 1200 (St. Claire, CA, USA), equipaggiato con rivelatore UV, pompe, autocampionatore e degasatore. L'elaborazione del segnale del rivelatore è stata eseguita utilizzando il software Agilent Chem Station RevB.03.02. Come fase stazionaria è stata utilizzata la colonna YMC C18 250 x 4,6 mm, 5µm (Waters, USA), mantenuta a 40°C, e le analisi sono state eseguite utilizzando un metodo a gradiente (Tabella 4) in cui la fase mobile era composta da acetonitrile (eluente A) e acqua acidificata (eluente B). Per la preparazione dell'eluente B è stata utilizzata una miscela di 96,4 ml di potassio fosfato monobasico (0,013 N) e 3,6 ml di sodio fosfato bibasico decaidrato (0,035 N). Il pH di questa soluzione è stato regolato a 3 utilizzando acido ortofosforico.. Durante l'analisi il flusso utilizzato è stato di 1,0 mL/min e la lunghezza d'onda 250 nm. Le soluzioni madre di ciascun farmaco sono state preparate separatamente alla concentrazione di 1 mg/mL, utilizzando una miscela di acetonitrile e acqua (50:50), e sonicate 10 minuti per la completa solubilizzazione dei farmaci. Le soluzioni madre sono state utilizzate per la preparazioni delle diluizioni aliquote di soluzioni stock per ottenere le diluizioni (1,25, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL) per la costruzione delle

curve di calibrazione per il TAM (equazione: $y = 28,201x - 3,8745$, $R^2 = 0,9983$) e GLZ (equazione: $y = 11,625x - 1,2662$, $R^2 = 0,9991$). Il limite di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) di TAM e GLZ sono stati, rispettivamente, 0,13 e 0,41 $\mu\text{g/mL}$ e 0,33 e 1,01 $\mu\text{g/mL}$. Il metodo è stato sviluppato e convalidato secondo le linee guida Q2 della *International Conference on Harmonization (ICH-Q2)*. Sono stati valutati i parametri di specificità e selettività, linearità, precisione, accuratezza e robustezza.

Tabella 4. Proporzioni dei solventi utilizzate nel metodo del gradiente.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Flusso (mL/min)
0,01	50,00	50,00	1,00
5,00	50,00	50,00	1,00
11,00	80,00	20,00	1,00
12,00	50,00	50,00	1,00

2.3.7.1 Efficienza di incapsulamento, *drug loading* e quantità di GLZ coniugata nelle nanoparticelle

Per valutare l'efficienza di incapsulamento (EE%) delle LCN è stato eseguito un metodo di quantificazione indiretta, che consiste nel determinare il farmaco non incapsulato e/o precipitato e sottrarre tale valore dal totale quantificato nella formulazione (CLEMENTINO et al., 2018). La quantificazione del TAM totale presente nelle formulazioni è stata eseguita diluendo 200 μL della formulazione in 10 mL di soluzione diluente standard (acetonitrile:acqua) con sonicazione per 10 minuti per garantire la completa estrazione del farmaco e successiva filtrazione della soluzione su filtro di cellulosa (0,45 m, Sartorius, Gottinga, Germania). Per quantificare il TAM presente all'esterno delle nanoparticelle, 500 μL della formulazione è stata ultrafiltrata utilizzando un filtro Vivaspin® ultra (MWCO 5 KDa; Sartorius, Gottingen, Germania) a 15.000 rpm per 15 minuti e i campioni ultrafiltrati sono stati analizzati mediante HPLC. Il valore di *drug loading* (DL%) è stato determinato attraverso la relazione tra TAM incapsulato (TAM totale - TAM libero) e massa di lecitina (LEC), LMWC e fase oleosa (Maisina + Labrafac). La

quantificazione di entrambi i parametri è stata determinata mediante HPLC ed espressa in percentuale. Le analisi sono state effettuate in triplicato.

Il calcolo dell'efficienza di incapsulamento (1) e del *drug loading* (2) è stato eseguito utilizzando le formule matematiche seguenti:

$$EE\% = \frac{\text{TAM totale} - \text{TAM libero}}{\text{Quantificazione di TAM totale}} \times 100 \quad (1)$$

$$DL\% = \frac{(\text{TAM totale} - \text{TAM libero}) \times 100}{\text{LEC (g)} + \text{LMWC (g)} + \text{fase oleosa}} \quad (2)$$

Per la determinazione della quantità di GLZ coniugata alle LCN, è stata eseguita la stessa procedura sopra descritta. Pertanto, la GLZ presente nella fase continua delle LCN è stata quantificata dopo l'ultracentrifugazione, questo valore è stato sottratto dalla GLZ totale in soluzione. Le nanoparticelle sono state valutate dopo il primo giorno di preparazione delle formulazioni con diverse concentrazioni di GLZ, secondo la Tabella 3.

2.4 Test *in vitro* con le nanoparticelle

2.4.1 SAGGIO DI RILASCIO

Il saggio di rilascio *in vitro* con TAM libero, TAM_LCN₂₀⁴ e βLCN, è stato effettuato in mezzi di dissoluzione a pH 7,4 ± 0,2 e 5,5 ± 0,2, valori che corrispondono, rispettivamente, al pH del sangue e del tumore. I mezzi di dissoluzioni sono stati preparati secondo le monografie della Farmacopea Brasiliana. Nei mezzi di dissoluzione è stato aggiunto 0,5% di tween 80 (p/v). Il saggio è stato eseguito in una membrana da dialisi con 500 µL dei diversi campioni, contenenti 300 µg di TAM, in 100 mL di mezzo di dissoluzioner. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato. Un incubatore (Shaker SL - 222) è stato utilizzato per mantenere la temperatura (37°C ± 0,2) e l'agitazione costante (80 rpm) durante il test di 24 ore. Ad intervalli predeterminati (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24h), dal mezzo di dissoluzione sono state prelevate aliquote da 300 µL e il volume prelevato è stato mezzo di dissoluzione

fresco. Ciascun campione è stato quantificato mediante analisi HPLC utilizzando il metodo descritto in sezione 2.3.7.

2.4.2 SAGGIO DI TOSSICITÀ

Le linee cellulari MCF-7 (adenocarcinoma mammario) sono state utilizzate nello studio sulla citotossicità. Le cellule sono state coltivate in colture monostrato aderenti in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco®), integrato con siero bovino fetale al 10%, penicillina (100 U/mL) e streptomina (100 mg/mL) (Gibco®), conservate in un forno a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Per il test le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 3x10³ (cellula/pozzetto) e incubate in stufa a 37°C e 5% di CO₂ per l'adesione alla piastra. Successivamente, sospensioni di nanoparticelle (LCN non caricate, βLCN e βLCN_GLZ₂) sono state aggiunte a concentrazioni comprese tra 0,937 - 30 µg/mL. Il saggio è stato effettuato anche con le singole sostanze (TAM a concentrazione di 0,6 mg/mL e GLZ a concentrazione di 0,028 mg/mL). Tutti i gruppi testati sono stati diluiti in acqua distillata e gli esperimenti sono stati condotti in quattro repliche, con il controllo negativo costituito dal campione non trattato. Dopo 72 ore di trattamento, a ciascun pozzetto della piastra sono stati aggiunti 100 µL della soluzione di MTT (soluzione stock 5 mg/mL, diluita 1:10 in terreno DMEM) e incubati a 37°C per 3 ore. L'analisi è stata eseguita mediante uno spettrofotometro per piastre (lettore di micropiastre SpectraMax i3) ad una lunghezza d'onda di 570 nm. La percentuale di vitalità cellulare (CV) dopo il trattamento con i campioni è stata ottenuta utilizzando la seguente equazione:

$$CV = \frac{\text{Assorbimento (gruppo trattato)}}{\text{Assorbimento (gruppo controllo negativo)}} \times 100$$

2.5 Analisi statistica

Tutti i dati sperimentali sono stati espressi come media ± deviazione standard. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test t spaiato tra due gruppi o l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal test post hoc di Tukey tra tre o più gruppi. Le differenze sono state considerate significative quando $p < 0.05$.

4.1 nanoparticelle di chitosano a basso peso molecolare

4.1.1 CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE DLS E HPLC

Al fine di sviluppare formulazioni contenenti farmaci con proprietà chimico-fisiche diverse, sono stati condotti diversi studi con l'intento di comprendere le interazioni polisaccaride-fosfolipidi della struttura interna delle nanoparticelle di lecitina:chitosano (DI BARI et al., 2008). Nel nostro lavoro, la Tabella 5 mostra i risultati dell'analisi di DLS delle LCN prima e dopo la regolazione del pH. In generale, si osserva che le nanoparticelle prima della regolazione del pH mostravano un valore di Z-medio inferiore a 130 nm, un pdi inferiore a 0,2 e un PZ compreso tra 24,8 e 39,9. In Figura 8 sono riportati i grafici delle formulazioni TAM_LCN₂₀¹, TAM_LCN₂₀² e TAM_LCN₂₀⁴. L'aumento del pH non modifica significativamente le dimensioni delle nanoparticelle, ad eccezione di TAM_LCN₂₀⁸, in cui si osserva un aumento significativo del valore di Z-medio (Figura 8A), oltre al fenomeno di flocculazione dopo l'aggiustamento del pH, indice di instabilità della formulazione. Macroscopicamente, le altre LCN sono rimaste omogenee dopo aver aumentato il pH delle formulazioni, senza presenza di precipitati o agglomerati. Questi primi risultati dimostrano che mediante l'uso di LMWC è possibile ottenere LCN stabili con dimensione ridotte a pH circa 6. Pertanto, la scelta del chitosano è un passaggio cruciale per la formazione di nanoparticelle stabili a diversi pH, poiché la solubilità aumenta con la riduzione del peso molecolare del polisaccaride in questione (XUAN et al., 2019).

Nel 2006 Sonvico e collaboratori hanno condotto uno studio che mostrava come le caratteristiche delle LCN variavano al variare del pH del mezzo, considerando l'utilizzo di LMWC. È stato analizzato il comportamento delle LCN a valori di pH da 2,5 a 5 e si è osservato un aumento del diametro delle particelle al diminuire dell'acidità della sospensione. A pH superiore a 5 si è verificato un aumento significativo del Z-medio delle LCN, portando alla formazione di agglomerati, a causa dell'alto valore di pdi. Le LCN sono stabili grazie alla natura elettrostatica dei loro componenti, tuttavia il peso molecolare del polisaccaride può

interferire con l'interazione chimica-fisico delle strutture delle particelle all'aumento del pH. Il chitosano definisce le proprietà superficiali delle particelle in quanto il loro pKa è vicino a 6,5, giustificando la loro instabilità a pH elevato (SONVICO et al., 2006a). È noto che il LMWC ha una maggiore solubilità in acqua a pH più elevato (AMOOZGAR et al., 2012), e nella prima fase della nostra ricerca (Figura 8) è stato dimostrato che il suo utilizzo consente di aumentare il pH delle formulazioni senza perdita significativa della stabilità fisica. Quando il LMWC è in soluzione ad un pH uguale o maggiore di 6, i suoi gruppi amminici liberi sono in uno stato deprotonato, ciò favorisce l'interazione con ligandi che hanno gruppi aldeidi liberi, come la molecola di GLZ (MISHRA et al., 2014; HOU et al., 2020). La scelta di utilizzare il LMWC (50 kd) nella nostra ricerca è stata giustificata al fine di aumentare la stabilità delle LCN in un intervallo di pH più ampio (ABOUELMAGD et al., 2015), e quindi rendere possibile la coniugazione tra la membrana delle LCN e il ligando a carattere ionico (LIU et al., 2015).

Tabella 5. Valori della caratterizzazione fisica di TAM_LCN prima della regolazione del pH. I valori si riferiscono a formulazioni valutate nel primo giorno di conservazione (d1).

Denominazione delle LCN	pH	Z-media	pdi	Potenziale Zeta
TAM_LCN ₂₀ ¹	3,8 ± 0,20	102,8 ± 0,66	0,165 ± 0,01	24,8 ± 1,00
TAM_LCN ₂₀ ²	2,9 ± 0,10	111,0 ± 0,32	0,141 ± 0,01	30,0 ± 0,87
TAM_LCN ₂₀ ⁴	2,3 ± 0,15	117,3 ± 0,70	0,160 ± 0,02	32,7 ± 1,00
TAM_LCN ₂₀ ⁸	2,1 ± 0,05	125,1 ± 0,71	0,198 ± 0,01	39,9 ± 1,31

La Figura 8a mostra come i valori di Z-medio e del potenziale zeta siano stati influenzati dalla proporzione di LMWC presente nella formulazione. Maggiore è la quantità di LMWC in soluzione, maggiore è l'aumento della dimensione media delle LCN, a conferma di quanto descritto da Sonvico e collaboratori (2006), in cui è stato evidenziato che l'aumento del valore di Z-medio delle LCN è correlata all'aumento della quantità di chitosano. Ciò è dovuto alla formazione di una catena idrofila polimerica, in cui il polisaccaride è in grado di estendersi su tutta la superficie indipendentemente dal suo peso molecolare (SONVICO et al., 2006a). Considerando solo il PZ delle LCN nel nostro studio, si osservano valori positivi

(Figura 8b), indicativi di particelle di dimensioni inferiori al micron ed elevata stabilità (SONVICO et al., 2006a; DILNAWAZ et al., 2010). La carica positiva delle LCN prodotta in questo lavoro conferma la presenza di LMWC sulla superficie delle particelle e dimostra che, con l'aumento della concentrazione di LMWC in soluzione, si verifica un aumento proporzionale della carica superficiale. Dopo la regolazione del pH, tuttavia, si è verificata una riduzione dei valori del PZ in tutte le TAM_LCN, che è correlata alla deprotonazione dei gruppi amminici del LMWC (PILIPENKO et al., 2019). Nonostante la rilevante riduzione del PZ non c'è evidenza di instabilità fisica confermata dal risultato relativo al Z-medio e pdi, che non ha mostrato una differenza significativa ($p > 0,05$) dopo aver modificato il pH delle LCN.

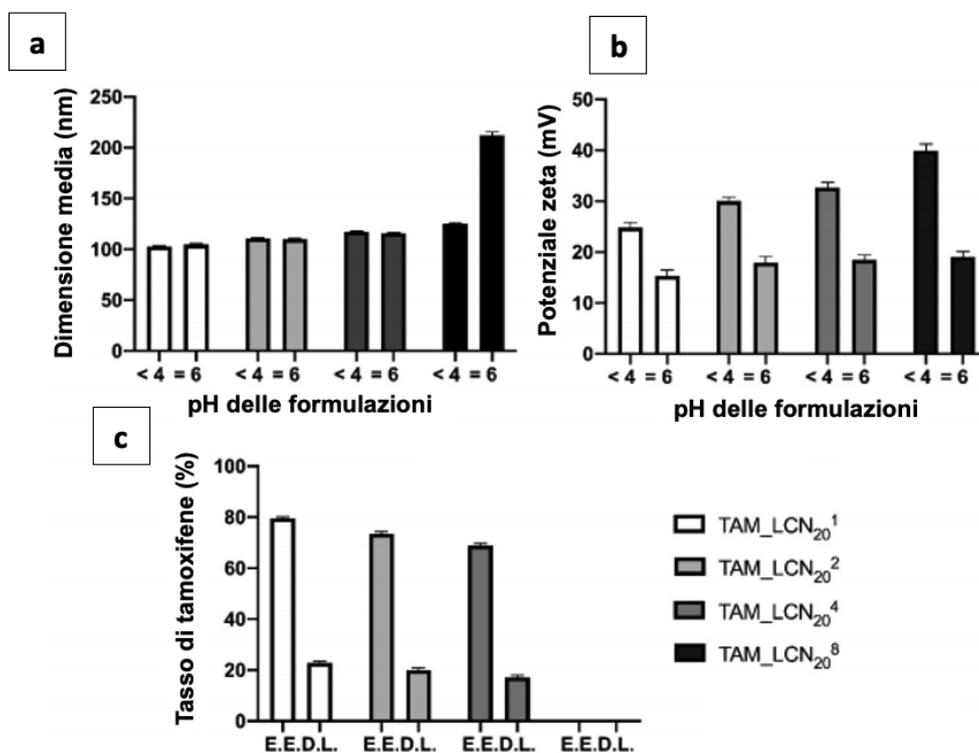


Figura 8. Grafici con valori di diametro medio delle nanoparticelle (a) e potenziale zeta (b). I parametri fisico-chimiche delle TAM_LCN sono stati analizzati prima e dopo la regolazione del pH (< 4 o = 6). Mentre i grafici di efficienza di incapsulazione/ *Drug Loading* (EE/DL) (c) sono stati ottenuti da formulazioni con pH 6.

In merito ai valori di EE delle formulazioni, dal grafico riportato in Figura 8c si evince che esiste un'influenza nell'aumento della concentrazione di chitosano. Gerelli e collaboratori (2008a) hanno mostrato che la proporzione 20:1 (lecitina:chitosano) nelle LCN presenta i valori più alti di EE, che ha confermato i risultati ottenuti nel nostro lavoro, poiché c'è stata una graduale diminuzione dei

valori di EE con l'aumento della concentrazione di LMWC nelle LCN. Si osserva però che la differenza di valori tra le formulazioni stabili (TAM_LCN₂₀⁴ e TAM_LCN₂₀¹) si riduce di circa 10%, e che il valore di DL, pur subendo una riduzione del 5,45%, è comunque > 10%, caratteristico di nanoparticelle stabili (LIU et al., 2020). Tra le formulazioni preparate, TAM_LCN₂₀⁴ è stata selezionata perchè conteneva la più alta concentrazione di LMWC e ha mostrato una buona stabilità chimico-fisico dopo la regolazione del pH. Per scegliere la formulazione ideale sono stati considerati i valori ottenuti con la caratterizzazione chimico-fisico sopra citati.

4.2 Nanoparticelle con nucleo oleoso

4.2.1 PROFILO CHIMICO-FISICO

Lo studio sulla stabilità delle LCN ha permesso di scegliere la formulazione con la più alta quantità di LMWC e comunque stabile in seguito a regolazione del pH. La TAM_LCN₂₀⁴ ha mostrato tali caratteristiche. Questa formulazione è stata preparata successivamente con l'aggiunta di diverse quantità di fase oleosa (1, 2 e 4 mg/mL). L'analisi DLS (Tabella 6) ha mostrato che dopo aver aggiunto gli oli alle nanoparticelle, le formulazione con concentrazione più elevata di fase oleosa (γ LCN) hanno mostrato un aumento significativo, circa 2 volte maggiore, del diametro delle particelle ($213,4 \pm 1,88$ nm) rispetto a TAM_LCN₂₀⁴ ($117,3 \pm 0,70$ nm). La separazione di fase è stata osservata nelle γ LCN nei primi giorni di conservazione. Tuttavia, le formulazioni α LCN e β LCN, anche con un aumento delle dimensioni statisticamente significativa rispetto a TAM_LCN₂₀⁴, sono rimaste stabili a pH 6. L'aumento della dimensione delle particelle è previsto e giustificato dalla presenza di Malsine e Labrafac nel nucleo oleoso delle LCN, tuttavia nonostante questo aumento non si evidenzia instabilità nelle α LCN e β LCN. Il confronto tra i diametri delle TAM_LCN₂₀⁴ e β LCN (LCN con fase oleosa) è mostrato in Figura 9a. Secondo Clementino et al. (2016), usando la fase oleosa nelle LCN si registra un aumento della stabilità delle LCN, correlato all'aumento della EE. Attraverso la quantificazione con il metodo HPLC, sviluppato in questo progetto di dottorato, sono stati valutati anche i valori di EE e DL delle tre formulazioni e i risultati descritti nella Tabella 6. Il tasso di TAM incapsulato, contrariamente a quanto osservato nei risultati DLS, non

è direttamente proporzionale all'aumento della quantità di oli presenti nella formulazione (Figura 9b). α LCN, a bassa concentrazione di olio, ha mostrato un valore di EE ridotto, anche inferiore al valore di TAM_LCN₂₀⁴. Tuttavia le γ LCN, con 4 mg/mL di fase oleosa, ha un percentuale di incapsulamento inferiore rispetto a β LCN, oltre a mostrare separazione di fase dopo 1 giorno di stoccaggio. Infine, la formulazione β LCN ha mostrato un significativo aumento del EE rispetto a TAM_LCN₂₀⁴, raggiungendo il $91,15 \pm 1,2\%$. Questo risultato è in accordo con altri studi che hanno utilizzato le LCN con una fase oleosa (CLEMENTINO et al., 2016; CLEMENTINO et al., 2017; SENYGIT et al., 2009).

Tabella 6. Valori dei parametri chimico-fisico (Z-medio, pdi, potenziale zeta, efficienza di incapsulamento e *drug loading*) di TAM_LCN₂₀⁴ con diverse concentrazioni di fase oleosa.

LCN	Z-medio (nm)	pdi	PZ	EE (%)	DL (%)
α LCN	181,2 \pm 1,17	0,169 \pm 0,02	28,7 \pm 1,60	57,22 \pm 2,70	7,48 \pm 0,11
β LCN	173,1 \pm 0,88	0,137 \pm 0,01	27,3 \pm 1,87	91,15 \pm 1,12	12,42 \pm 0,13
γ LCN	213,4 \pm 1,88	0,200 \pm 0,01	26,6 \pm 1,52	78,44 \pm 3,10	7,35 \pm 0,17

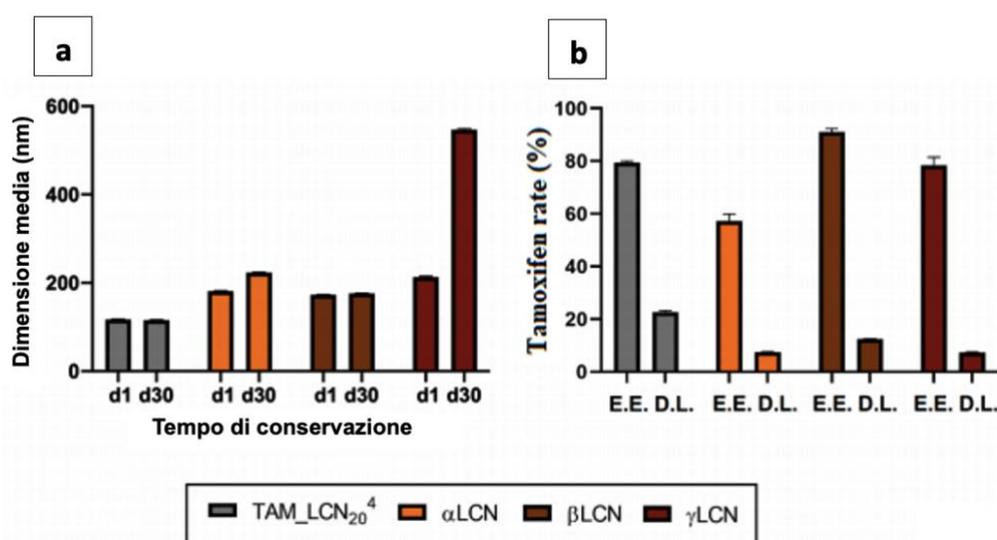


Figura 9. Grafici con valori di diametro medio nei giorni di conservazione (d1 e d30) delle TAM_LCN₂₀⁴ e LCN con fase oleosa (γ LCN, α LCN e β LCN) (a). Sono stati ottenuti i valori di efficienza di incapsulamento/*drug loading* (EE/DL) delle stesse formulazioni in d1 (b).

Secondo lo studio di Senigyt et al. (2009), l'aggiunta di isopropil miristato, un olio utilizzato per aumentare l'assorbimento del farmaco, migliora l'EE ($92,2 \pm 0,5\%$) e il DL (10,9%) del propionato di clobetasolo nelle LCN. Si ritiene che il clobetasolo, per la sua struttura lipofila, sarebbe localizzato nel nucleo lipidico delle particelle per la presenza di isopropil miristato. La struttura delle nanoparticelle è stata riportata in uno studio precedente dopo l'incorporazione di progesterone e isopropil miristato nelle LCN. In questo studio sono state ottenute strutture con un nucleo lipidico circondato da una corona di polisaccaride con dimensioni comprese tra 40 e 250 nm. Clementino et al. (2016) hanno prodotto formulazioni con le stesse caratteristiche precedentemente menzionate utilizzando altri oli. L'aggiunta di una combinazione di Maisine e Labrafac ha mostrato risultati positivi. Questa miscela di oli ha agito sinergicamente nella solubilità della simvastatina, che ha permesso di incapsulare questo farmaco lipofilo generando LCN con dimensioni di 204 nm, alto potenziale zeta (50 mv), basso pdi (0,1), 98% di EE e stabilità fisica di 3 mesi (CLEMENTINO et al., 2017). Tali risultati hanno suggerito la collocazione della simvastatina nel nucleo delle LCN. Gli oli hanno generato significativi cambiamenti strutturali, producendo caratteristiche simili alle LCN non caricate. L'ipotesi è che la miscela riscaldata di Maisine e Labrafac formi un nucleo semisolido nella fase di raffreddamento, favorendo un migliore incapsulamento del farmaco (CLEMENTINO et al., 2016).

L'incorporazione nelle LCN di un farmaco lipofilo caricato positivamente, come il TAM, genera cambiamenti conformazionali nella struttura delle particelle. La presenza di TAM induce la repulsione delle molecole di chitosano che sono anch'esse cariche positivamente, facendo sì che solo una piccola quantità del polisaccaride faccia parte delle particelle. Nonostante la bassa quantità di chitosano, le LCN sono sufficientemente stabili per applicazioni farmaceutiche (GERELLI et al., 2008b). Tale informazione è importante, in quanto consente di conoscere i cambiamenti che avvengono nella struttura delle nanoparticelle dopo l'aggiunta di farmaci con proprietà diverse, consentendo così l'ottimizzazione dell'efficienza di trasporto delle particelle e della loro cinetica di rilascio (GERELLI et al., 2008a). Nel nostro lavoro l'ipotesi è che la fase oleosa, costituita da Maesine e Labrafac, sia in grado di far alloggiare il TAM nel nucleo delle LCN, riducendo l'influenza del TAM sul LMWC presente nella membrana. Analizzando con DLS la formulazione

preparata solo con lecitina, TAM e fase oleosa incorporata (Lipo_TAM_MaiLab), è stata osservata una significativa inversione del valore del potenziale zeta rispetto alla stessa preparazione senza fase oleosa (Lipo_TAM). In Figura 10a si nota che dopo il primo giorno di preparazione, Lipo_TAM_MaiLab presenta una carica negativa (-20 mv), che è direttamente correlata alla presenza di gruppi acidi della lecitina che compongono la membrana micellare, mentre Lipo_TAM mostra un altro profilo, con valore di potenziale zeta positivo (+ 30mV) che è influenzato dalla carica positiva del TAM. Questi dati consentono di affermare che la fase oleosa annulla l'influenza elettrostatica del TAM sulla membrana delle LCN, suggerendo una disposizione del farmaco al centro della micella. Anche le immagini ottenute dal TEM (Figura 10b) evidenziano questa ipotesi, poiché le nanoparticelle ottenute hanno strutture sferiche, con una membrana spessa in contrasto, caratteristica delle nanoparticelle solide di chitosano (DU et al., 2015), che differiscono dalle stesse nanoparticelle prive di fase oleosa ottenute nello studio di Gerelli et al. (2008b). Si assume che la differenza strutturale sia correlata alla presenza di una fase oleosa e di conseguenza ad una minore influenza del TAM sulla conformazione delle strutture delle LCN.

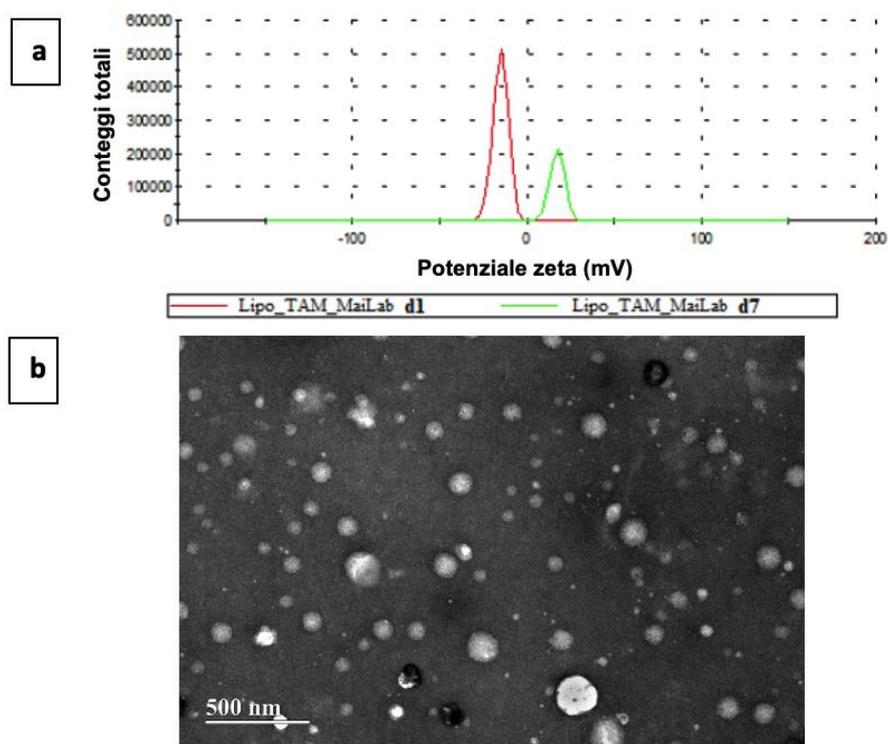


Figura 10. (a) Grafico del potenziale zeta delle Lipo_TAM_MaiLab nei giorni di conservazione 1 e 7, rispettivamente linee rosse e verdi. (b) Immagini di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) di β LCN. Barra di misurazione: 500 nm, ingrandimento 8000x.

4.2.2 ANALISI FTIR

Gli spettri di FTIR del TAM, LCN non caricate, LCN_{TAM20}⁴ e β LCN sono riportati in Figura 11. Lo spettro del TAM mostra bande caratteristiche a 3180 cm⁻¹ (-NH₂), 3028–2872 cm⁻¹ (allungamento =CH), 1615 cm⁻¹ (flessione -NH), 1507 cm⁻¹ e 1477 cm⁻¹ (allungamento dell'anello C=C) (NOSRATI et al., 2018; SREEHARSHA et al., 2019). Bande di assorbimento antisimmetriche e simmetriche sono state trovate rispettivamente vicine a 1229 e 1087 cm⁻¹, ed entrambe corrispondono al gruppo fosfato PO₂ (KHADKA et al., 2015). Tutti gli spettri delle formulazioni ottenute, con o senza TAM, hanno mostrato bande nell'intervallo 2500-3000 cm⁻¹ e 1735 cm⁻¹, caratteristiche delle LCN (PEREZ-RUIZ et al., 2018; DONG et al., 2020). Le regioni con lunghezze d'onda comprese tra 1000 cm⁻¹ e 1250 cm⁻¹ hanno ricevuto maggiore attenzione per comprendere l'influenza della presenza di TAM in diverse LCN, in particolare considerando i picchi a 1250 cm⁻¹ (CO), 1170 cm⁻¹ (-NH) e 1091 cm⁻¹ (CN). Nello spettro delle LCN_{TAM20}⁴ ci sono due cambiamenti in relazione allo spettro delle LCN non caricate. A 1250 cm⁻¹ si ha la comparsa di un caratteristico

picco di vibrazioni delle bande C-H e C-N relative al TAM (LAKKADWALA et al., 2014; GUNEY ESKILER et al., 2018). Tuttavia, a 1170 cm^{-1} c'è una chiara diminuzione del picco, che può essere motivato dalla riduzione del LMWC nella parete delle LCN causata dalla competizione con il TAM per il legame chimico con la lecitina (GERELLI et al., 2008b). Si osserva che gli spettri delle β LCN e LCN caricate sono molto simili, giustificati dal migliore alloggiamento di TAM nel nucleo lipidico delle LCN e da un valore di incapsulamento più elevato, con conseguente riduzione dell'influenza del farmaco sulla struttura delle nanoparticelle. Tuttavia, il picco prominente a 1091 cm^{-1} e a 699 cm^{-1} (C-H) è comune nelle LCN_TAM₂₀⁴ e β LCN, mostrando la presenza di TAM incapsulato in entrambi le LCN (MAJI et al., 2015; BATOOL et al.; 2020).

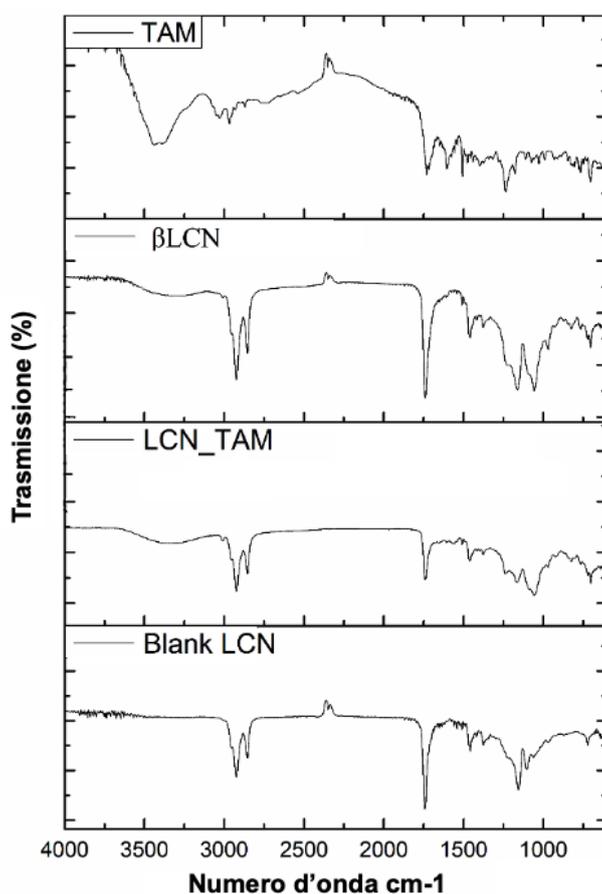


Figura 11. Spettro infrarosso da 600 a 4000 cm⁻¹ di TAM e delle LCN non caricate, TAM_LCN₂₀⁴ e β LCN.

4.2.3 PROFILO TERMICO

Sono state eseguite analisi DSC per ottenere informazioni sull'influenza del TAM sulle caratteristiche chimico-fisico delle LCN, come cristallinità e punto di fusione. Il termogramma del TAM ha mostrato un picco endotermico (148,4 °C) nell'intervallo di temperatura di 136,70 - 156,54 °C con un $\Delta H_f = -22,24$ J/g (Tabella 7 e Figura 12); tale evento endotermico è correlato alla fusione del TAM (SREEHARSHA et al., 2019). In tutte le 3 formulazioni sono stati osservati picchi endotermici caratteristici delle LCN (PEREZ-RUIZ et al., 2018). Tuttavia, si osserva che il picco endotermico del TAM scompare nei termogrammi di TAM_LCN₂₀⁴ e β LCN, indice dell'incapsulamento del farmaco in queste LCN. TAM è stato solubilizzato negli eccipienti della formulazione e non è possibile notare il suo picco nel termogramma, si può supporre che il farmaco incapsulato sia allo stato amorfo (ALIAS et al., 2017). Differiscono invece i termogrammi delle formulazioni (TAM_LCN₂₀⁴ e β LCN), ascrivibili alla solubilità del TAM nelle LCN. Osservando le curve (Figura 12), β LCN presenta un picco più stretto a circa 120°C, ciò può essere correlato ad una maggiore organizzazione della formulazione dovuta ad una migliore solubilizzazione e accomodamento del farmaco nella matrice oleosa (CHU et al., 2019). β LCN, a causa della sua maggiore cristallinità, rappresentata dal picco in una forma più stretta, mostra una temperatura di onset maggiore rispetto a TAM_LCN₂₀⁴ (Tabella 7). Il risultato delle analisi di DLS (Figure 9a) e il valore di EE più elevato di TAM nelle β LCN rispetto a TAM_LCN₂₀⁴ (Figura 8c) confermano l'affermazione precedente. Le curve delle LCN non caricate e TAM_LCN₂₀⁴ mostrano termogrammi simili, giustificati dall'assenza di una fase oleosa.

Tabella 7. Risultati della analisi di DSC: valori di onset (°C), endset (°C) e ΔH (J/g) dei rispettivi campioni.

Campione	Onset (°C)	Endset (°C)	ΔH (J/g)
LCN non caricate	74,61	156,21	-51,22
TAM	136,70	156,54	-22,24
TAM_LCN ₂₀ ⁴	90,80	157,94	-28,89
β LCN	105,19	153,02	-39,10

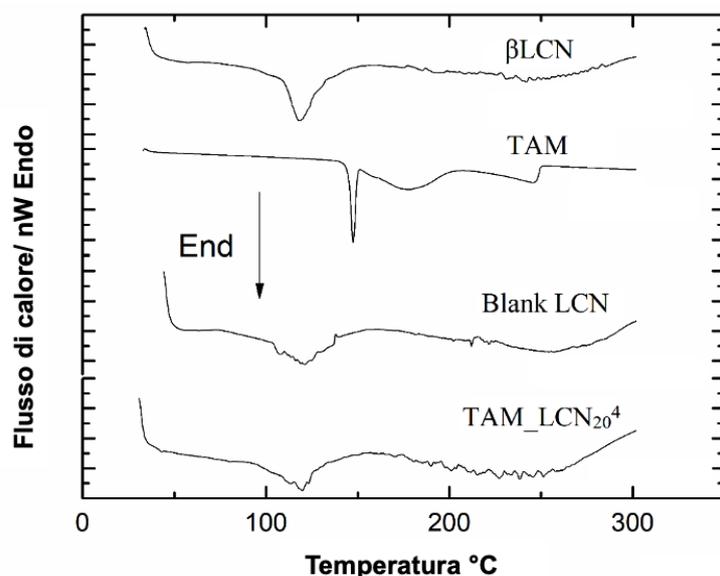


Figura 12. Termogrammi di TAM, LCN non caricate, TAM_LCN₂₀⁴ and βLCN.

4.3 Nanoparticelle decorate con glicirrizina

4.3.1 SIMULAZIONI MODELLISTICA MOLECOLARE

L'interazione tra i componenti della membrana nelle LCN e la coniugazione GLZ:LCN è stata inizialmente studiata mediante simulazione di modelli molecolari. La Dinamica Molecolare (DM) è una tecnica ampiamente utilizzata, che permette di comprendere il contatto di due sostanze attraverso la visualizzazione e la stima della forza di interazione tra di esse, indicativa per la parte sperimentale. In questo senso, ci sono diversi meccanismi che si basano su studi di DM (JHA & LARSON, 2014; MANIRUZZAMAN et al., 2015). Durante l'analisi, è stata valutata la formazione di legami idrogeno tra GLZ e monomeri di chitosano sulla superficie delle LCN, come mostrato in Figura 13. I legami idrogeno aiutano le molecole di GLZ a rimanere sulla superficie delle LCN (Figura 13). In un ambiente fisiologico simulato del corpo umano sono state condotte analisi sulla struttura delle LCN. Le simulazioni di DM prodotte hanno valutato la formazione di legami idrogeno tra GLZ e chitosano delle LCN. Il chitosano è un polimero ricco di idrossili, ammine e ammidi che sono gruppi donatori di idrogeno, ed ha anche gruppi accettori di idrogeno, questo dimostra la capacità del polimero di stabilire legami (ZARGAR et al., 2015). GLZ, allo stesso modo, presenta gruppi accettori e donatori, dimostrando la sua grande capacità di stabilire legami idrogeno (MANOUCHEHRI et al., 2017). GLZ ha mostrato un'elevata

affinità con la superficie delle LCN, poiché si sono formati molto legami idrogeno tra chitosano e GLZ. Queste interazioni sono importanti per il mantenimento della GLZ sulla superficie delle LCN. Oltre a queste interazioni, c'è stata anche la formazione di interazioni idrofobiche e di van der Waals, dovute alla presenza di gruppi polari e non polari.

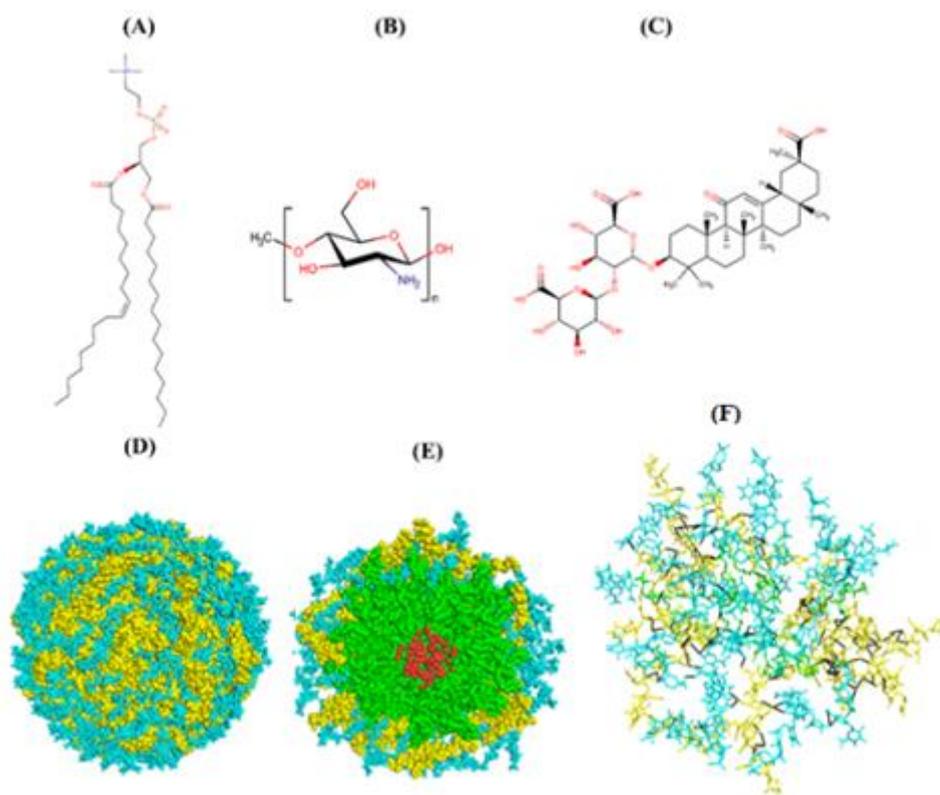


Figura 13. Componenti delle LCN: struttura molecolare del fosfolipide lecitina (A), monomero di chitosano (B) e glicirrizina (C). L'immagine D mostra il modello completo della LCN_GLZ, mentre l'immagine E mostra una sezione trasversale delle stesse LCN. Sempre nell'immagine "E" è possibile vedere tutti gli strati, dall'interno verso l'esterno: molecole d'acqua in rosso, lecitina che costituisce la parte interna della LCN_GLZ in verde, molecole di chitosano in giallo e sulla superficie delle LCN la GLZ in blu. L'immagine F mostra la rete di legami H formati tra i componenti LCN_GLZ.

4.3.2 CARATTERIZZAZIONE DEI PARAMETRI FISICI

Come dimostrato nei risultati dello studio di DM, quando la GLZ è in soluzione si lega alla superficie delle LCN e quindi stabilisce diverse interazioni chimiche, come forze di Van der Waals, elettrostatiche, polari e non polari. Sono state effettuate altre analisi per dimostrare e confermare la coniugazione GLZ:LCN, nonché l'influenza chimico-fisico di GLZ nella formulazione. In precedenza,

l'aggiunta di GLZ nelle LCN richiedeva l'ossidazione del ligando. Questa fase è stata condotta secondo la metodologia utilizzata da Lin et al. (2008). L'ossidazione consisteva nella formazione di gruppi aldeidici dai gruppi idrossilici presenti negli acidi glucuronici della struttura della GLZ (LIN et al., 2009), e questa modificazione nella molecola è stata confermata dall'analisi ^1H NMR (Figura 14) della polvere ottenuta nel processo. I picchi corrispondenti alla formazione dei gruppi aldeidici sono riportati a 8.19 e 8.50 ppm, valori in accordo con quelli trovati da El-Marakby et al. (2017).

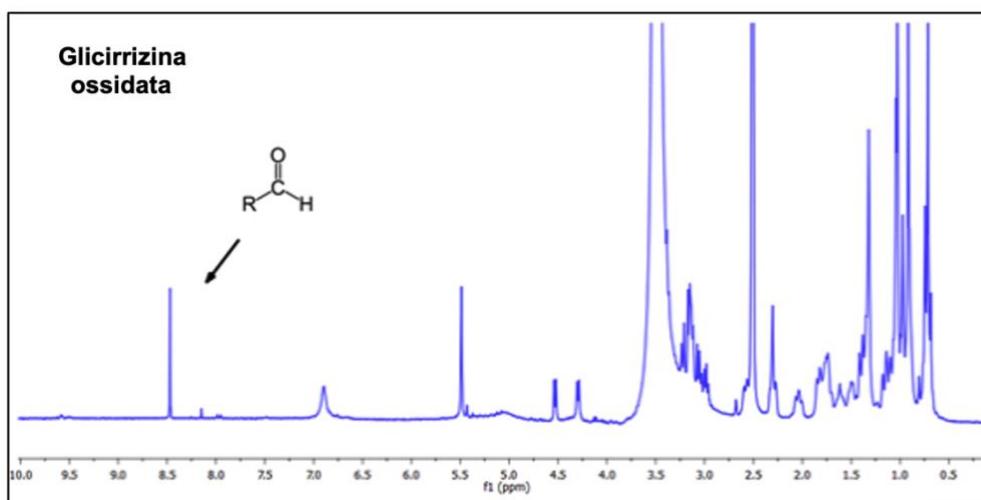


Figura 14. Analisi ^1H NMR della GLZ ossidata.

Dopo aver confermato l'ossidazione della GLZ, il secondo passaggio è stato la preparazione delle LCN con GLZ. Per valutare l'influenza dell'aggiunta di GLZ sulla stabilità delle β LCN, sono state utilizzate 4 diverse concentrazioni, considerando la concentrazione teorica di LWMC (0,4 mg/mL). Il giorno dopo la preparazione, le β LCN_GLZ sono state analizzate mediante DLS. Analizzando i risultati riportati in Tabella 8, è stato osservato che la proporzione di GLZ aggiunta nelle β LCN influenza direttamente la crescita della dimensione delle particelle, in accordo con i risultati delle nanoparticelle descritto nell'articolo di Mishra et al. (2014). Selyutina et al. (2016) hanno studiato l'interazione di GLZ sulla membrana lipidica dei liposomi. Attraverso analisi di NMR e MD è stato osservato che la GLZ è incorporata nella membrana del nanosistema, senza alcun aumento del diametro dei liposomi utilizzando valori di GLZ uguali o inferiori a 0,5 mM. Nel frattempo, un altro studio ha dimostrato che la concentrazione di 1 mM riduce la dimensione delle particelle (WOJCIECHOWSKI et

al., 2016). Considerando il fatto che le LCN nella nostra ricerca sono stati sottoposti a reazione con concentrazioni di GLZ inferiori a 0,5 mM e che il valore di Z-medio delle particelle è aumentato invece di diminuire, questo indica la presenza di GLZ al di fuori delle LCN coniugate a LMWC e non interiorizzata nel nucleo delle particelle. Questi risultati rappresentano indizi che LMWC circonda le particelle, essendo responsabile della coniugazione LCN:GLZ.

Tabella 8. Valori dei parametri fisico-chimici (dimensione delle particelle, indice di polidispersione, potenziale zeta, efficienza di incapsulamento e *drug loading*) delle β LCN con diverse concentrazioni di GLZ.

LCN	Z-medio (nm)	pdi	PZ	EE (%)	DL (%)
β LCN_GLZ ¹	179,7 ± 1,94	0,162 ± 0,013	24,1 ± 0,87	95,36 ± 0,9	13,01 ± 0,11
β LCN_GLZ ²	181,7 ± 1,19	0,146 ± 0,024	23,1 ± 1,81	94,07 ± 1,4	12,82 ± 0,16
β LCN_GLZ ³	240,6 ± 0,63	0,162 ± 0,007	21,0 ± 0,49	87,54 ± 1,2	11,93 ± 0,12
β LCN_GLZ ⁴	656,2 ± 4,23	0,201 ± 0,015	22,8 ± 0,05	78,81 ± 2,3	9,79 ± 0,17

L'aggiunta di concentrazioni inferiori di GLZ nelle LCN, identificati come β LCN_GLZ₁ e β LCN_GLZ₂, ha causato un piccolo ma significativo aumento del diametro delle nanoparticelle rispetto alle β LCN (Figura 15a). Queste formulazioni hanno mantenuto il valore dimensionale per 7 giorni, senza differenze significative rispetto al giorno 1 dopo la loro produzione ($p < 0,05$). La Figura 15b mostra la struttura fisica delle β LCN_GLZ₂ dopo 7 giorni di stoccaggio. Le nanoparticelle hanno mostrato una morfologia sferica e uniforme con dimensioni delle particelle di 163 nm. Questo valore inferiore a quello ottenuto nell'analisi DLS è giustificato dal processo di essiccamento e disidratazione a cui viene sottoposta la formulazione prima dell'analisi. Questo metodo di preparazione provoca comunemente una diminuzione della Z-medio delle nanoparticelle (LAO et al., 2010). Le β LCN_GLZ₃ e β LCN_GLZ₄, invece, hanno mostrato un forte aumento del valore di Z-medio rispetto alle altre formulazioni, oltre alla separazione di fase mostrata dopo pochi giorni di conservazione. Questa differenza di stabilità tra formulazioni con una concentrazione di GLZ maggiore o minore può essere correlata alla saturazione dei legami chimici tra i componenti delle β LCN_GLZ. Si può presumere che la presenza di GLZ in grandi quantità possa disturbare la stabilità del legame tra lecitina e

chitosano nelle LCN a causa della competizione elettronica per i gruppi amminici liberi sulla membrana delle particelle.

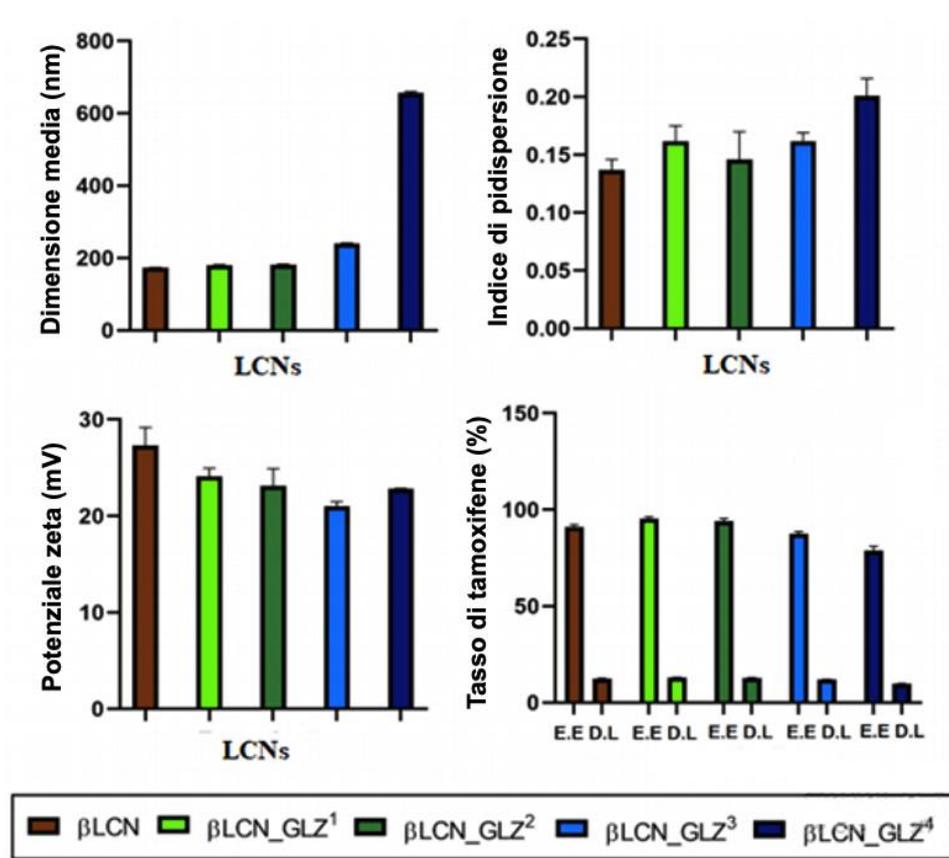


Figura 15. Grafici del Z-media (a), dell'indice di polidispersione (b), del potenziale zeta (c) e dell'efficienza di incapsulamento/*drug loading* (EE, DL) (d) delle β LCN e formulazioni con diverse concentrazioni di GLZ. I valori si riferiscono al giorno 1 successivo alla produzione delle formulazioni.

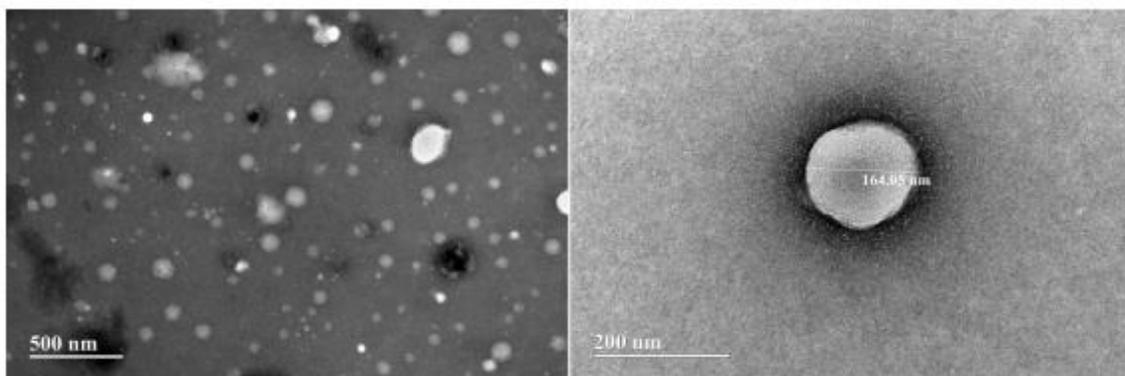


Figura 16. Immagini dal microscopio elettronico a trasmissione (TEM) delle β LCN (a) e β LCN_GLZ₂ (b). Barra di misurazione: (a) 500 nm e (b) 200 nm, 8000x e 30000x di ingrandimento rispettivamente.

Tutti i valori di pdi delle β LCN_GLZ hanno mostrato una differenza statistica in relazione al valore delle β LCN (Figura 15, grafico b). Questo risultato è correlato alla

differenza di quantità tra GLZ coniugata a ciascuna nanoparticella, generando un aumento delle popolazioni. Tali risultati possono anche essere correlati alla formazione di precipitati. Mishra et al. (2014) hanno ottenuto risultati simili dopo l'aggiunta di GLZ nelle nanoparticelle di chitosano. Per quanto riguarda la carica superficiale delle β LCN, si è verificata una diminuzione statisticamente significativa dopo l'aggiunta di GLZ (Figura 15, grafico c), che può essere giustificata dall'interazione chimica tra GLZ e la parte esterna delle LCN. I gruppi amminici del chitosano elettronicamente positivi sono suscettibili di interagire con le aldeidi presenti nell'acido glucuronico della GLZ (HOU et al., 2019). Pertanto, ottenuta la coniugazione GLZ:LCN, il PZ si riduce a causa dell'occupazione parziale dei siti positivi (TIAN et al., 2012; YAN et al., 2017).

4.3.3 DETERMINAZIONE DEI CAMBIAMENTI STRUTTURALI

4.3.3.1 Spettroscopia FTIR

La spettroscopia è considerata uno dei principali strumenti per le applicazioni biomediche. FTIR è una di queste, valutata come una tecnica semplice, riproducibile e non distruttiva per tessuti o campioni di materiale, che richiede quantità minime per l'analisi. Inoltre, questa tecnica spettroscopica permette di ottenere informazioni a livello molecolare attraverso lo studio di gruppi funzionali, conformazioni molecolari e tipi di coniugazione. Le bande spettroscopiche consentono, grazie alla sensibilità del metodo, informazioni dirette sulla composizione biochimica dei composti (TALARI et al., 2017). Attraverso i grafici generati dall'analisi FTIR (Figura 17) è stato possibile identificare la coniugazione dei componenti delle β LCN_GLZ. Per quanto riguarda l'interazione LMWC:GLZ alcuni studi hanno utilizzato questa tecnica per dimostrare la presenza della coniugazione (LIN et al., 2008; SHI et al., 2012; CHENG et al., 2013). Nel nostro lavoro, abbiamo valutato i grafici con diverse quantità di GLZ nelle LCN, che hanno mostrato alcune informazioni rilevanti sulla coniugazione LMWC:GLZ. I picchi a 1731 cm^{-1} , riferiti alle β LCN (linea rossa), corrispondono a gruppi amminici (NH_2) e in questo stesso punto il picco scompare in tutti i grafici delle β LCN_GLZ, indipendentemente dalla concentrazione di GLZ aggiunta. La diminuzione o scomparsa dei picchi di NH_2 è correlata, secondo Lin e collaboratori

(2008), al legame tra questo gruppo funzionale e l'acido carbossilico della GLZ. Oltre a questa evidenza, vi è una maggiore intensità di picchi prossimi a 1600 cm^{-1} che si riferiscono alla formazione di gruppi ammidici. Tutti i grafici delle $\beta\text{LCN_GLZ}$ hanno mostrato la formazione di un evidente picco a 1574 cm^{-1} e la conseguente scomparsa dei picchi rappresentativi del gruppo amminico a 1731 cm^{-1} . I valori trovati in questa analisi confermano i dati trovati in altri studi (CHEN et al., 2012; TIAN et al., 2012; YAN et al., 2016; YAN et al., 2017).

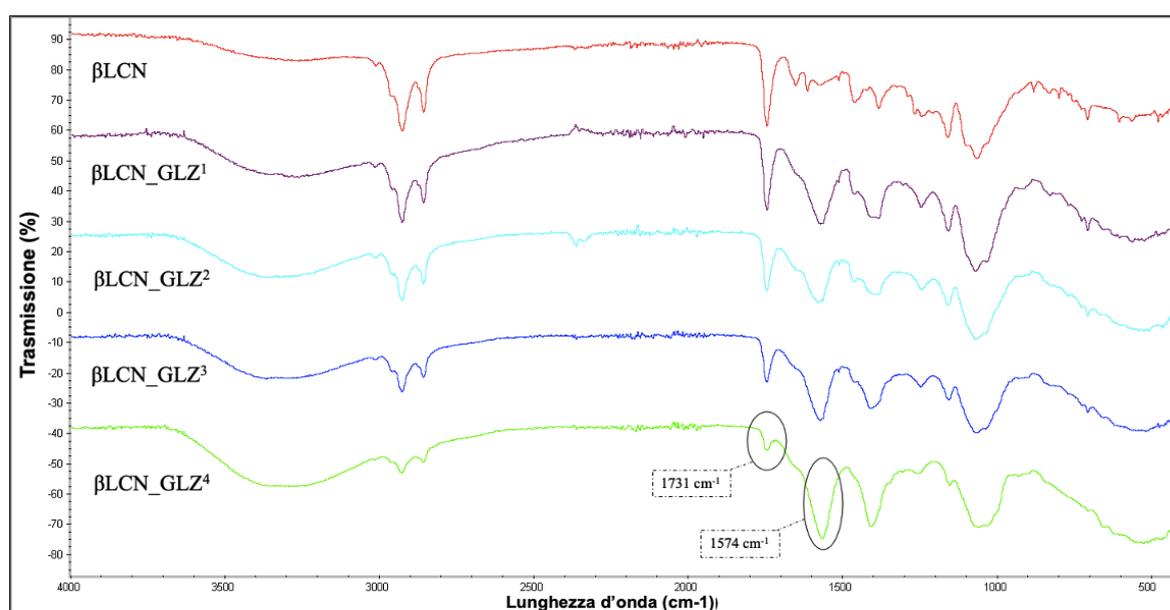


Figura 17. Analisi FTIR delle βLCN con diverse concentrazioni di GLZ.

4.3.3.2 Spettroscopia UV

La spettroscopia di assorbimento UV-vis è una tecnica sensibile per indagare i campi locali sperimentati da una data molecola (SKOOG et al., 2006; LANZANI, 2012; PARSON, 2015), è stata usata per ottenere ulteriori approfondimenti sulle formulazioni, ispezionando le caratteristiche bande di assorbimento UV relative al TAM, che dovrebbero comportarsi distintamente in soluzione e all'interno delle nanoparticelle. Si osserva nello spettro a righe verdi della Figura 18a che il TAM dissolto in etanolo mostra picchi a $\sim 238\text{ nm}$ e $\sim 277\text{ nm}$, in accordo con la letteratura (MEREY et al., 2013; SALEH et al., 2018). A causa della forma asimmetrica della banda a $\sim 277\text{ nm}$, l'analisi della derivata seconda (SAAKOV et al., 2013; LOPES et al., 2019; LOPES et al., 2020) è stata impiegata per esplorare le transizioni nascoste attorno a questo centro. Come mostrato in Figura 18b, (linea continua verde) lo

spettro del TAM in soluzione si sviluppa in tre transizioni che si trovano a 238 nm, 277 nm e 296 nm. Queste lunghezze d'onda sono utilizzate come standard. Poiché gli altri componenti presenti nelle formulazioni possono aggiungere picchi nello spettro di β LCN e β LCN-GLZ₂, abbiamo caratterizzato separatamente la GLZ e le LCN non caricate. GLZ (Figura 18a, linea arancione tratteggiata) mostra una caratteristica banda di assorbimento a ~263 nm, mentre lo spettro delle LCN mostrano curve con profilo lineare caratteristico degli effetti di diffusione della luce spuria nella spettroscopia di assorbimento (SKOOG et al., 2006; KUMIRSKA et al., 2010; LANZANI, 2012; PARSON, 2015). Considerando le dimensioni delle nanoparticelle qui formate, ci si aspetta che si comportino come siti di scattering efficienti nelle soluzioni (BRAR & VERMA, 2011). Sebbene non sia chiaro dalla Figura 18a, attraverso l'analisi della seconda derivata le LCN non caricate mostrano una banda di assorbimento a ~240 nm, che può essere correlata al chitosano (KUMIRSKA et al., 2010), come mostrato in Figura 18b.

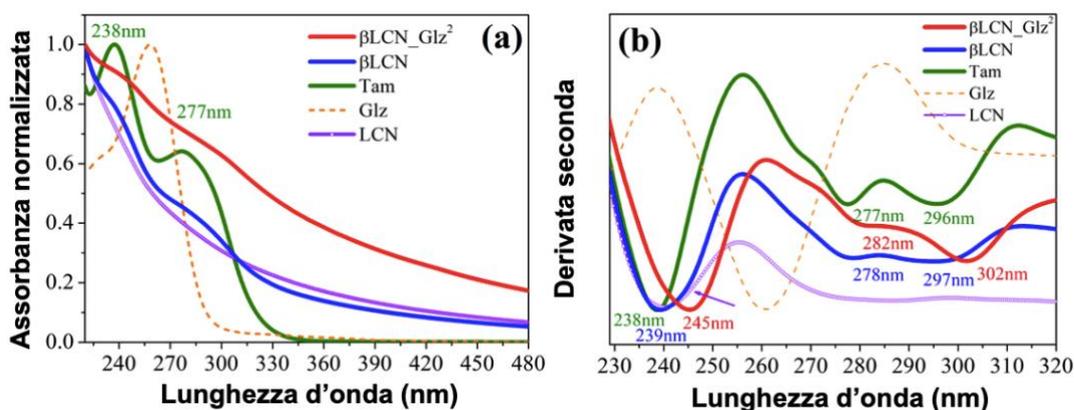


Figura 18. (a) Spettri di assorbimento UV-Vis normalizzati e (b) analisi della derivata seconda di TAM (linea verde continua); GLZ (linea tratteggiata arancione); LCN (linea viola); β LCN (linea blu continua) e β LCN_GLZ₂ (linea rossa continua). Tutti i campioni vengono disciolti in acqua pura, ad eccezione del TAM che è disciolto in etanolo.

Osservando lo spettro delle β LCN e β LCN_GLZ₂, i picchi relativi al TAM come previsto sono rilevabili (Figura 18), sebbene questi picchi siano sovrapposti alle curve lineari (β LCN e β LCN_GLZ₂) e alla banda caratteristica della struttura delle LCN non caricate, tuttavia è possibile verificare che subiscono spostamenti rispetto ai loro centri precedenti (238, 277 e 296 nm), trovati in soluzione. L'analisi della derivata seconda, applicata agli spettri β LCN e β LCN_GLZ₂, ha fornito un metodo per diminuire il segnale di fondo correlato alla diffusione della luce, consentendo la

chiara indagine degli spostamenti che si verificano nei picchi del TAM. Le curve a righe blu e rosse nella Figura 18b mostrano che i picchi caratteristici del TAM in soluzione subiscono uno spostamento verso il rosso complessivo ($\Delta\lambda$), quando la molecola viene inserita nelle nanoparticelle (β LCN e β LCN_GLZ₂). Se da un lato tale spostamento è piccolo e omogeneo per il caso delle β LCN, dall'altro osserviamo che lo spostamento delle β LCN_GLZ₂ è più significativo per il picco a 238 nm ($\Delta\lambda = 1.200 \text{ cm}^{-1}$) rispetto ai picchi a 277 nm ($\Delta\lambda = 640 \text{ cm}^{-1}$) e 296 nm ($\Delta\lambda = 671 \text{ cm}^{-1}$). Tale spostamento risulta potenziato dalla sovrapposizione tra il picco di TAM a 238 nm e i contributi della banda di assorbimento delle LCN non caricate (situata a circa 240 nm). Sebbene GLZ possa svolgere un ruolo nello spostamento a causa del suo assorbimento a circa ~243 nm, i nostri dati indicano che tale molecola quasi non influisce sullo spettro delle formulazioni a causa della sua bassa concentrazione rispetto agli altri componenti.

Questo scenario ha giustificato l'analisi degli spostamenti considerando il picco meno energetico del TAM a 296 nm. A questo valore di lunghezza d'onda, caratteristico del farmaco incapsulato, non ci sono sovrapposizioni considerando che GLZ e le LCN non assorbono oltre i 275 nm. Pertanto, si conclude che nelle β LCN, TAM è leggermente influenzato dal suo comportamento in soluzione, essendo lo spostamento d'ordine di 114 cm^{-1} . L'effetto è più evidente ($\Delta\lambda = 671 \text{ cm}^{-1}$) nelle β LCN_GLZ₂. Tale modello dimostra che questi tre ambienti (soluzione di TAM, β LCN e β LCN_GLZ₂) causano i propri effetti di campo locale sul TAM. I nostri risultati indicano anche che la decorazione delle LCN con GLZ porta a una modifica nell'ambiente delle nanoparticelle che è in totale accordo con il PZ e l'analisi delle dimensioni delle LCN presentata sopra. Gli effetti di campo locali riportati dipendono dalle interazioni elettrostatiche che sono strettamente associate alla carica della nanoparticella e alla distanza media tra la parete e il TAM incorporato, supportando la nostra analisi (SKOOG et al., 2006; LANZANI, 2012; PARSON, 2015). Infine, va evidenziato che oltre agli spostamenti, anche l'intensità relativa tra le bande di TAM subisce variazioni significative in funzione dell'ambiente. Dalla Figura 18b si può osservare che l'intensità relativa tra le transizioni 296 nm e 277 nm è invertita quando si passa dalla soluzione a β LCN_GLZ₂ questo supporta la presenza di interazioni intermolecolari tra TAM e la struttura interna delle LCN.

4.3.4 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEL FARMACO INCAPSULATO E DEL LIGANDO

La validazione del metodo HPLC è stata effettuata secondo le linee guida stabilite dalla *International Harmonization Conference* (ICH) per la validazione delle procedure analitiche. Il metodo HPLC è stato sviluppato per fornire la quantificazione di TAM e GLZ. Il metodo del gradiente che utilizza acetonitrile:acqua acidificata (50:50 e 80:20) ha prodotto un picco simmetrico stretto a un flusso di 1 mL/min. L'assorbimento massimo dei farmaci è stato osservato a 250 nm. L'aggiunta di alcune gocce di acido ortofosforico ha migliorato la separazione dei farmaci, sopprimendo la ionizzazione e riducendo la coda del picco. I risultati hanno ottenuto una buona risoluzione e picchi simmetrici con un tempo di ritenzione (Rt) di 3,64 min per GLZ e 9,28 min per TAM. Il cromatogramma è mostrato in Figura 19. Il metodo si è dimostrato lineare, selettivo, preciso e accurato per la quantificazione simultanea dei farmaci TAM e GLZ, oltre ad essere applicabile quando i farmaci sono presenti nelle LCN. Lo sviluppo del metodo è stato importante perché ha consentito la quantificazione indiretta del farmaco incapsulato (TAM) e anche della GLZ coniugata alle particelle. I valori di EE e DL del TAM nelle β LCN_GLZ sono riportati in Tabella 8. Si osserva che i valori di EE di queste LCN sono influenzate dalla presenza della GLZ in soluzione. Aumentando la concentrazione di GLZ, il valore di EE diminuisce come mostrato in Figura 15d. Le β LCN_GLZ₁ e β LCN_GLZ₂ mostrano valori di EE superiori a quelli trovati nelle β LCN (91,12%), ma statisticamente molto vicini ($p > 0,05$). Tuttavia, EE delle β LCN_GLZ₃ e β LCN_GLZ₄ ha subito una riduzione significativa rispetto al valore delle β LCN, rispettivamente di circa il 5% e il 14%. Da questi risultati si presume che ci sia stato un aumento della diffusione del TAM dovuto all'interazione della GLZ con la membrana delle LCN.

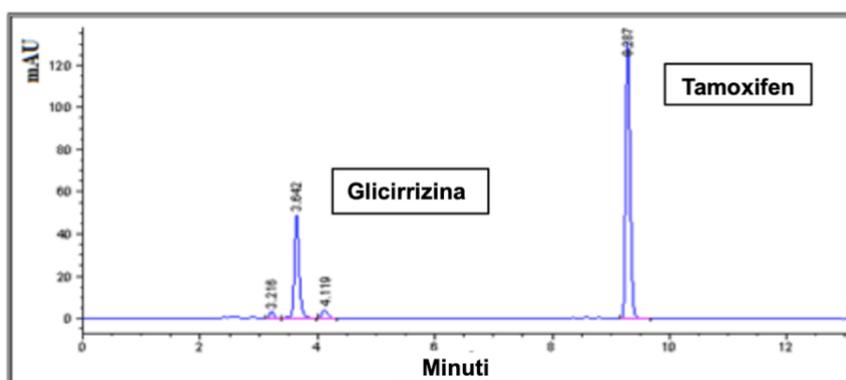


Figura 19. Cromatogramma della miscela binaria degli standard di GLZ (3,64 min) e TAM (9,28 min).

La Tabella 9 mostra un valore percentuale di GLZ recuperato statisticamente accettabile ($p < 0,02$), con una media di circa il 98,48% in base alla concentrazione di GLZ aggiunta in ciascuna formulazione. Per quanto riguarda la percentuale di GLZ riscontrata nelle formulazioni ultrafiltrate, i valori sono bassi. Nelle β LCN_GLZ₁, con una concentrazione di GLZ inferiore, non è stato rilevato alcun valore nella fase continua cioè fuori delle nanoparticelle. Questi dati possono essere correlati alla coniugazione totale di GLZ alle β LCN, oppure i valori trovati nell'ultrafiltrato erano inferiori al valore rilevabile con il metodo HPLC. Tuttavia, le soluzioni ultrafiltrate delle β LCN_GLZ₂ e β LCN_GLZ₃ contenevano rispettivamente circa il 5,44% e l'8,92% di GLZ, a dimostrazione che la maggior parte della GLZ aggiunta interagiva con le LCN. La β LCN_GLZ₄, con una maggiore concentrazione di GLZ, ha mostrato una percentuale di farmaco non coniugato più alto; nonostante ciò, il valore del ligando presente nelle LCN è considerato elevato. Questa formulazione ha mostrato una separazione di fase dal secondo giorno di conservazione. Dai dati sopra citati si presume che vi sia una limitazione dei "siti di legame" nelle β LCN. A seconda del valore di GLZ aggiunto nelle formulazioni, si verifica un valore di coniugazione maggiore o minore. Mettendo in relazione questi risultati con i dati riferiti ai parametri fisici delle formulazioni β LCN_GLZ, si può affermare che la stabilità strutturale delle LCN è garantita con l'aggiunta fino a 56 μ g/mL di GLZ. Le β LCN_GLZ₃ e β LCN_GLZ₄ con il tasso di coniugazione LCN:GLZ maggiore dell'80% sono risultati instabili dopo 2 giorni di conservazione e sono stati quindi esclusi dalle analisi successive.

Tabella 9. Percentuale di GLZ recuperata e coniugata alle β LCN.

Denominazione delle nanoparticelle	Recupero della GLZ (%)	Coniugazione LCN:GLZ (%)
β LCN_GLZ ¹	98,05	100
β LCN_GLZ ²	98,24	94,66
β LCN_GLZ ³	98,23	91,08
β LCN_GLZ ⁴	99,41	79,78

4.3.5 PROFILO DI RILASCIO

Il test di rilascio *in vitro* è stato effettuato con l'intento di comprendere il rilascio del TAM attraverso le LCN in mezzi a pH diversi. La quantificazione del farmaco rilasciato è stata eseguita con il metodo sviluppato mediante HPLC, precedentemente descritto. In Figura 20 i grafici a (pH 5,5) e b (pH 7,4) mostrano il profilo di rilascio del TAM libero e TAM incapsulato nelle β LCN e β LCN_GLZ₂. Per quanto riguarda il farmaco libero, è stato osservato il rilascio totale (100%) attraverso la membrana da dialisi fino a 6 ore, indipendentemente dal pH del mezzo di dissoluzione. Tuttavia, il profilo di rilascio del TAM è diverso quando è incapsulato in nanoparticelle, poiché quando viene confrontato con il profilo del farmaco libero, la differenza è statisticamente significativa ($p < 0,05$). Questo risultato dimostra che le nanoparticelle sono in grado di controllare la diffusione del farmaco nel tempo, indipendentemente dal pH del mezzo. Analizzando i profili di rilascio delle nanoparticelle è possibile notare che questi profili sono molto simili. Anche se il risultato statistico riferito al rilascio in ambiente acido mostra una differenza significativa tra le nanoparticelle (β LCN e β LCN_GLZ₂), circa il 7%, i valori sono ancora molto vicini tra di loro. Pertanto, possiamo assumere che la presenza del ligando GLZ sulla superficie delle LCN non interferisca nel loro profilo di rilascio.

Per quanto riguarda il profilo di rilascio a pH diversi, a pH 7,4 è stato osservato un rilascio ridotto del TAM, circa 5 volte inferiore rispetto al mezzo acido. Questo basso valore può essere correlato al contenuto di farmaco non incapsulato nelle LCN, che conferma i valori di EE (Figura 15d) dimostrando che circa l'8% di TAM è solubile nella fase esterna. Questo rappresenta quindi una diffusione bassa o quasi nulla di TAM a pH neutro. Mentre a pH 5,0 si è notato un rilascio superiore al 50% in 24h, anche se in modo più lento e graduale nel tempo. Questa differenza di diffusione in diversi mezzi con le LCN caricate con TAM è già stata verificata da Barbieri et al (2013). Nella loro ricerca, però, è stato osservato che anche a pH più acido (circa 1,2) la diffusione del TAM è stata bassa, raggiungendo un valore di circa il 40% considerando anche il farmaco non incapsulato. Questo risultato è stato attribuito all'interazione elettrostatica del TAM con la parte fosfolipidica della lecitina, generando una conseguente ostruzione della diffusione del farmaco incapsulato. I nostri risultati invece hanno mostrato un evidente rilascio del farmaco, superiore al

40% in entrambe le formulazioni, senza considerare la percentuale di farmaco non incapsulato. Possiamo ipotizzare che la presenza di una fase oleosa modifichi la posizione del TAM incapsulato, riducendo la sua interazione chimica con la lecitina nelle LCN. Questo cambiamento organizzativo, che è dimostrato nei risultati sopra descritti, può essere la caratteristica responsabile della maggiore diffusione del TAM nel mezzo di dissoluzione.

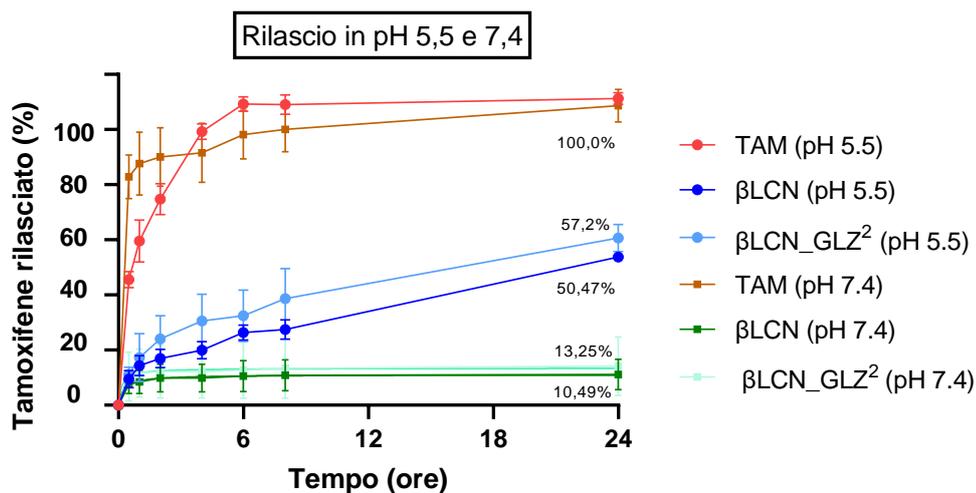


Figura 20. Profilo di rilascio *in vitro* di TAM libero e TAM incorporato nelle LCN (β LCN e β LCN_GLZ₂) in ambiente neutro (pH 7,4) e acido (pH 5,5) a 37°C. Ogni punto si riferisce alla media dell'analisi in triplicato e alla loro deviazione standard in diverse ore del test.

Si può quindi affermare che la diffusione del TAM attraverso le LCN è dipendente dal pH. Questo meccanismo rappresenta un importante strumento di applicazione nel trattamento del cancro per la peculiarità dell'ambiente extracellulare nei tumori (VIVEK et al., 2013). Pertanto, entrambe le formulazioni valutate in questo esperimento, β LCN e β LCN_GLZ₂, possono essere considerate "*pH sensitive drug delivery system*" (DDS). Queste nanoparticelle inibiscono il rilascio del farmaco a pH 7,4, che ipoteticamente potrebbe aumentare la permanenza delle LCN nel flusso sanguigno e rilasciare gradualmente il TAM a pH più basso, ad esempio in un tumore solido (ZHANG et al., 2012).

4.3.6 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO *IN VITRO*

La valutazione dell'attività citotossica delle molecole GLZ e TAM alle concentrazioni utilizzate per la preparazione delle LCN, rispettivamente 0,028 mg/mL e 0,6 mg/mL, ha dimostrato che GLZ non ha alterato la vitalità cellulare, rispetto al controllo negativo. La soluzione di GLZ non ha attività sulle MCF-7 e non ha un effetto additivo sulla citotossicità, probabilmente a causa della bassa concentrazione utilizzata. Al contrario, TAM libero ha mostrato un effetto antiproliferativo, rispetto al controllo negativo, confermando i dati della letteratura che evidenziano l'azione del TAM sulle cellule di cancro al seno (MCF-7) (HASSAN et al., 2018; THOTAKURA et al., 2017). Tali dati sono mostrati in Figura 21.

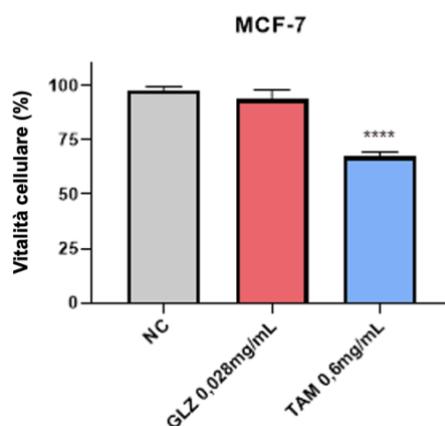


Figura 21. Effetto antiproliferativo di TAM e GLZ isolati sulle cellule MCF-7 dopo 72 ore di trattamento (i risultati sono espressi come media di tre repliche e percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo). **** $p < 0,0001$.

La valutazione dell'effetto antiproliferativo attraverso il saggio MTT nelle cellule MCF-7 ha indicato che il trattamento con β LCN e β LCN_GLZ₂ ha ridotto la vitalità cellulare in modo dipendente dalla concentrazione. Con l'aumento della concentrazione a 3,75 μ g/mL, tale riduzione diventa statisticamente significativa rispetto al controllo negativo, come mostrato in Figura 22. Questi due gruppi di formulazioni (β LCN e β LCN_GLZ₂), rispettivamente senza e con GLZ, hanno mostrato una significativa e promettente attività citotossica, poiché per concentrazioni fino a 3,75 μ g/mL la vitalità è diminuita di circa il 30% rispetto al controllo negativo. Questo risultato è ancora più notevole se confrontato con la soluzione di farmaco libero, che è stato testato a una concentrazione molto più elevata (600 μ g/mL), in cui si è osservato una diminuzione della vitalità dello stesso

ordine delle formulazioni. Pertanto, si osserva che quando incorporato nelle β LCN e β LCN_GLZ₂, TAM presenta un'azione citotossica in concentrazioni circa 80 volte inferiori, dimostrando che l'uso di nanoparticelle è molto più efficiente del trattamento con TAM libero. Questo comportamento concorda con studi presenti in letteratura dimostrando come i nanosistemi, veicolando farmaci chemioterapici, possono portare ad una migliore efficienza dell'azione del farmaco in modelli tumorali (MARTINEZ-CARMONA et al., 2018; JARDIM et al., 2019; DAY et al., 2020).

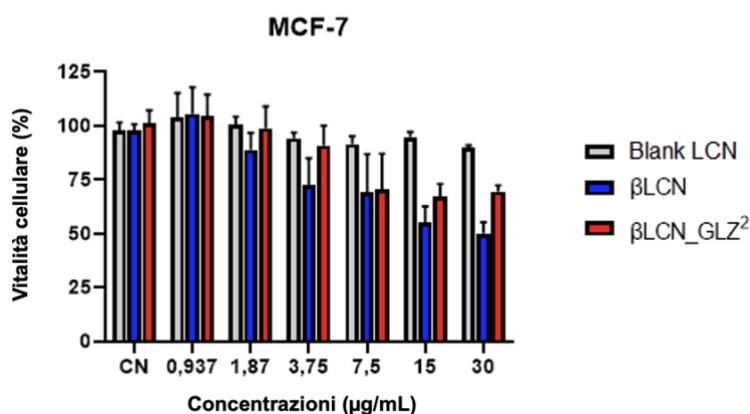


Figura 22. La vitalità cellulare *in vitro* in cellule MCF-7, dopo 72 ore di trattamento con le LCN non caricate, β LCN e β LCN_GLZ₂, in diverse concentrazioni. I risultati sono espressi come media di tre repliche e percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo (CN). **** $p < 0,0001$.

Per quanto riguarda le LCN non caricate (formulazione senza TAM e GLZ), non si osserva differenza significativa nell'effetto antiproliferativo sulle MCF-7 rispetto al controllo negativo, mostrando una vitalità di circa il 90%, indicando che la formulazione citata non è citotossica. È importante notare che le LCN non caricate sono state testate anche in cellule non tumorali di fibroblasto polmonare (MRC5) non mostrando cambiamenti significativi sulla vitalità cellulare, in relazione al controllo negativo, suggerendo così che i nanosistemi senza il farmaco abbiano buona biocompatibilità *in vitro*, come mostrato in Figura 23. La biocompatibilità con cellule non tumorali delle LCN non caricate deve essere influenzata dal valore di Z-medio, considerando che la letteratura stabilisce che le nanoparticelle di piccole dimensioni causino più cambiamenti nelle cellule non tumorali (LI et al., 2012; JADHAV et al., 2018). Tuttavia, le LCN non caricate hanno dimensioni relativamente grandi ($\cong 165$ nm) che giustificano l'assenza di tali effetti dannosi. La biocompatibilità è indispensabile per un possibile utilizzo di questo tipo di nanosistemi come forma

terapeutica poiché potrebbe essere indirizzato più specificamente alle cellule tumorali.

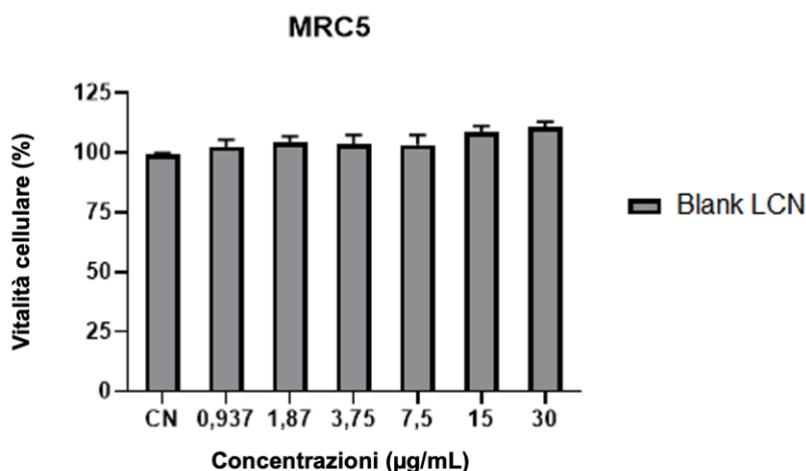


Figura 23. Effetto delle LCN non caricate sulla vitalità cellulare delle cellule MRC5 non tumorali dopo 72 ore di trattamento (i risultati sono espressi come media di tre replicati e percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo). ****P <0,0001.

L'analisi del gruppo β LCN_GLZ₂, con la GLZ sulla sua superficie, ha mostrato il mantenimento del profilo di riduzione della vitalità, indicando che il ligando non altera strutturalmente il sistema e mantiene l'azione del farmaco incapsulato, quindi le nanoparticelle sono promettenti per il rilascio del TAM nel sito d'azione. Tuttavia, è chiaro che nonostante la riduzione della vitalità, il gruppo con GLZ (β LCN_GLZ₂) ha presentato, in termini quantitativi, una percentuale di vitalità leggermente superiore alle β LCN. Ciò è probabilmente correlato a una maggiore ritenzione di TAM nel nucleo delle β LCN_GLZ₂ e ad un processo di rilascio del farmaco più controllato, che avvalorava i risultati dell'efficienza di incapsulamento. Questi risultati suggeriscono che la formulazione β LCN_GLZ₂ sviluppata in questa ricerca può essere una buona alternativa per la somministrazione efficace di farmaci, in un approccio di rilascio graduale di TAM con aumento della citotossicità (MAJI et al., 2015; NOSRATI et al., 2018).

5. CONCLUSIONI

GLZ ha richiamato l'attenzione in ambito scientifico grazie ad una serie di attività biologiche studiate e confermate. Queste funzionalità la rendono un farmaco molto versatile, potendo essere utilizzata nel trattamento di patologie infiammatorie e/o virali, principalmente quelle che riguardano le vie respiratorie o quella epatica. Nel fegato, GLZ presenta specificità per proteine presenti nella membrana degli epatociti, ciò giustifica il suo impiego per alcune patologie, in particolare il fegato e alcuni tumori. Alcuni studi sfruttano la specificità della GLZ in modo secondario, come la funzionalizzazione di nanoparticelle che indirizzano farmaci al fegato. I risultati di questi lavori dimostrano che la sua incorporazione in diversi tipi di nanosistemi è possibile attraverso semplici processi, senza però che interferisca sulla stabilità della formulazione o sull'attività biologica del farmaco incapsulato. Questo aumento della specificità di nanosistemi causato dalla presenza della GLZ li rende utili per l'applicazione in altre patologie come il tumore al seno alla luce della sua specificità per la proteina HMGB1, incontrata ad elevate concentrazioni in questo e in vari tipi di tumore.

L'utilizzo di nanoparticelle in grado di veicolare farmaci verso il focolaio della malattia è uno strumento ampiamente utilizzato negli ultimi anni, principalmente per il trasporto di farmaci antineoplastici. In questo lavoro di dottorato è stato possibile lo sviluppo di nanoparticelle contenenti TAM, farmaco di prima scelta nel trattamento del tumore al seno, e GLZ sulla superficie delle nanoparticelle, con l'intenzione di ottenere una struttura innovativa che renda possibile un maggior accumulo del farmaco nella regione in presenza di un tumore solido, ovvero direzionando le particelle direttamente al focus del cancro al seno.

Le caratteristiche intrinseche dei nanocarrier sono prese in considerazione per il loro sviluppo e utilizzo, poiché le proprietà chimico-fisico del farmaco incapsulato possono influenzare direttamente la formazione di particelle stabili. Le LCN sono già state ampiamente studiate per la loro versatilità, trasportando farmaci con caratteristiche chimiche diverse. Tuttavia, l'incorporazione di un farmaco a carica positiva in questo tipo di nanoparticelle attira l'attenzione a causa dell'influenza sulla struttura delle particelle formate e sulle loro proprietà. In questa ricerca è stato possibile migliorare le LCN_TAM utilizzando LMWC e fase oleosa

all'interno delle nanoparticelle. Tali cambiamenti hanno reso possibile aumentare il pH della formulazione senza perdita di stabilità fisica e migliorare il valore dell'efficienza di incapsulamento delle LCN_TAM. Attraverso la caratterizzazione chimico-fisica è stato possibile rilevare che i vantaggi precedentemente menzionati sono stati aumentati grazie al migliore alloggiamento del farmaco nelle nanoparticelle e alla sua conseguente minore influenza sulla formazione strutturale delle LCN.

Le formulazioni sviluppate con GLZ sono state caratterizzate attraverso le analisi di docking molecolare, DLS, FT-IR e spettroscopia UV che hanno confermato l'effettiva coniugazione della glicirizina sulla parete delle nanoparticelle. Il metodo CLAE, sviluppato e validato in questo studio, si è rivelato allo stesso modo importante per permettere la quantificazione simultanea del tamoxifene e della GLZ permettendoci di determinare l'efficienza di incapsulazione di ogni formulazione e la percentuale di GLZ coniugata alle nanoparticelle. Lo studio di rilascio *in vitro* ha mostrato la sensibilità delle nanoparticelle al pH del mezzo di dissoluzione. Il rilascio di farmaco è stato maggiore, anche se controllato, a pH acido.

I risultati osservati nel presente studio consentono di considerare β LCN e β LCN_GLZ₂ come nanosistemi efficaci nel trasporto di un farmaco chemioterapico (TAM). La presenza di GLZ non modifica significativamente il profilo di rilascio di TAM attraverso le LCN, in accordo con risultati di attività antiproliferativa *in vitro*. Nonostante ciò, β LCN_GLZ₂ ha dimostrato di essere funzionale e promettente, poiché ha mostrato una buona citotossicità a concentrazioni inferiori rispetto al TAM libero, sebbene tali risultati necessitino di conferma con successivi studi *in vivo*.

L'ottenimento delle LCN decorate con GLZ potrebbe rendere possibile il caricamento di altri farmaci utilizzati per il trattamento del cancro al seno, così come potrebbe rappresentare un punto di partenza per lo sviluppo di altre formulazioni innovative per mezzo dell'incorporazione di farmaci con caratteristiche chimiche simili al TAM, e/o permettere che altri ligandi facciano parte della struttura esterna di particelle composte da lecitina e chitosano.

ABBASALIPOURKABIR, R.; SALEHZADEH, A.; ABDULLAH, R. Tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles induced apoptosis in breast cancer cell lines. **Journal of Experimental Nanoscience**. n. 11. v. 3. p. 161-174. 2016.

ABOUELMAGD, S. A.; KU, Y. J.; YEO, Y. Low molecular weight chitosan-coated polymeric nanoparticles for sustained and pH-sensitive delivery of paclitaxel. **J. Drug Target**. v. 23. n. 7–8, p. 725–735. 2015.

AHMAD, N.; AL-SUBAIE, A. M.; AHMAD, R.; SHARMA, S.; ALAM, M. A.; ASHAFQAQ, M.; RUB, R. A.; AHAMD, F. J. Brain-targeted glycyrrhizic-acid-loaded surface decorated nanoparticles for treatment of cerebral ischaemia and its toxicity assessment. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. v. 47. n. 1. p. 475–490. 2019.

ALBUULET, D.; FLOREA, D. A.; BOARCA, B.; DITTU, L. M.; CHIFIRLUC, M. C.; GRUMEZSCU, A. M.; ANDRONESCU, E. Nanotechnology for personalized medicine: cancer research, diagnosis, and therapy. **Nanostructures for Cancer Therapy**. 2017.

ALKHOLIEF, M. Optimization of Lecithin-Chitosan nanoparticles for simultaneous encapsulation of doxorubicin and piperine. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 52. p. 204–214. 2019.

ALIAS, D.; YUNUS, R.; CHONG, G. H.; CHE ABDULLAH, C.A. Single step encapsulation process of tamoxifen in biodegradable polymer using supercritical anti-solvent (SAS) process. **Powder Technol.** v. 309. n. December 2018. p. 89–94. 2018.

AMOOZGAR, Z.; PARK, J.; LIN, Q.; YEO, Y. Low molecular-weight chitosan as a pH-sensitive stealth coating for tumor-specific drug delivery. **Mol pharm.** v. 9. n. 5. p. 1262–1270. 2012.

AMJADI, I.; RABIEE, M.; HOSSEINI, M.; MOZAFARI, M. Synthesis and characterization of doxorubicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as a sustained-release anticancer drug delivery system. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 168. p. 1434-1447. 2012.

BARENHOLZ Y. Doxil® – the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of Control Release**. v. 160. n. 2. p. 117–134. 2012.

BATOOL, R. A.; RAZZAQ, S.; NOUSHEEN, K.; KIANI, M. H.; SHAHNAZ, G. Formulation and evaluation of hyaluronic acid-based mucoadhesive self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of tamoxifen for targeting breast cancer. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 152. p. 503–515. 2020.

BARBIERI S.; SONVICO, F.; COMO, C.; COLOMBO, G.; ZANI, F.; BUTTINI, F.; BETTINI, R.; ROSSI, A.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan controlled release nanopreparations of tamoxifen citrate: loading, enzyme-trigger release and cell uptake. **Journal Control Release**. v. 167. p. 276-83. 2013.

BARBIERI, S.; BUTTINI, F.; ROSSI, A.; BETTINI, R.; COLOMBO, P.; PONCHEL, G.; SONVICO, F.; COLOMBO, G. Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan nanoparticles. v. 491. n. 1-2. p. 99-104. 2015.

DI BARI, M. T.; GERELLI, Y.; SONVICO, F.; DERIU, A.; CAVATORTA, F.; ALBANESE, G.; COLOMBO, P.; FERNANDEZ-ALONSO, F. Dynamics of lipid-saccharide nanoparticles by quasielastic neutron scattering. **Chem. Phys**. v. 345. n. 2–3. p. 239–244. 2008.

BELLUSSI, L. M.; COCCA, S.; PASSALI, G. C.; PASSALI, D. HMGB1 in the Pathogenesis of Nasal Inflammatory Diseases and its Inhibition as New Therapeutic Approach: A Review from the Literature. **Int Arch Otorhinolaryngol**. v. 21. p. 390–398. 2017.

BREASTCANCER.ORG. Breast Cancer. Disponibile in; <<https://www.breastcancer.org/research-news/by-date/2019>>.

CALABRESI, P.; SCHEIN, P. S. **Medical oncology**: second edition. p. 308, 833-834. 1993.

CHEN, C., SUN, J.; CHEN, S.; LIU, Y.; ZHU, S.; WANG, Z. CHANG, S. A multifunctional targeted nano agent for dual-mode image-guided therapeutic effects on ovarian cancer cells. **Int. J. Nanomedicine**. v. 14. p. 753-769. 2019.

CHEN, Y.; WANG, J.; WANG, L.; CHEN, L.; WU, Q. Absorption and interaction of the main constituents from the traditional Chinese drug pair ShaoyaoGancao via a Caco-2 cell monolayer model. **Molecules**. v. 17. n. 12. p. 14908–14917. 2012.

CHENG, M.; XU, H.; WANG, Y.; CHEN, H.; HE, B.; GAO, X.; LI, Y.; HAN, J.; ZHANG, Z. Glycyrrhetic acid-modified chitosan nanoparticles enhanced the effect of 5-fluorouracil in murine liver cancer model via regulatory T-cells. **Drug Des Devel Ther**. v. 7. p. 1287–1299. 2013.

CHEVALIER, M. T.; RESCIGNANO, N.; MARTIN-SALDANA, S.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, Á.; KENNY, J. M.; ROMÁN, J. S.; MIJANGOS, C.; ÁLVAREZ, V.A. Non covalently coated biopolymeric nanoparticles for improved tamoxifen delivery. **European Polymer Journal**. v. 95. p. 348-357. 2017.

CHHONKER, Y. S.; PRASADA, Y. D.; CHANDASANA, H.; VISHVKARMA, A.; MITRA, K.; SHUKLA, P.K.; BHATTA, R.S. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 72. p. 1451-1458. 2014.

CHOPDEY, P. K.; TEKADE, R. K.; MEHRA, N. K.; MODY, N.; JAIN, N. K. Glycyrrhizin conjugated dendrimer and multi-walled carbon nanotubes for liver specific delivery of doxorubicin. **J. Nanosci. Nanotechnol.** v. 15. p. 1088–1100. 2015.

CHU, X-Y.; HUANG, W.; WANG, Y-L.; MENG, L-W.; CHEN, L-Q.; JIN, M-J.; CHEN,, L.; GAO, C-H.; GE, C.; GAO, Z-G.; GAO, C-S. Improving antitumor outcomes for palliative intratumoral injection therapy through lecithin – chitosan nanoparticles loading paclitaxel– cholesterol complex. **Int. J. Nanomedicine.** v. 14. p. 689–705. 2019.

CLEMENTINO, A.; BATGER, M.; GARRASTAZU, G.; POZZOLI, M.; DEL FAVERO, E.; RONDELLI, F.; GUTFILEN, B.; BARBOZA, T.; SUKKAR, M. B.; SOUZA, S. A. L.; CANTÙ, L.; SONVICO, F. The nasal delivery of nanoencapsulated statins – An approach for brain delivery. **International Journal of Nanomedicine.** v. 11. p. 6575–6590. 2016.

CLEMENTINO, A.; SONVICO, F. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous detection and quantification of simvastatin's isoforms and coenzyme Q10 in lecithin/chitosan nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 155. p. 33–41. 2018.

CLEMENTINO, A.; DEL FAVERO, E.; PELLEGRINI, G.; CANTÙ, L.; SONVICO, F. Mucoadhesive and Biodegradable Lecithin/Chitosan Nanoparticles for the Nasal Delivery of Statins. **Respiratory Drug Delivery Europe.** 2017.

CORREA, V. L. R.; MARTINS, J. A.; SOUZA, T. R.; RINCON, G. de C. N.; MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B.; AMARAL, A. C. Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 162. p. 1465-1475. 2020.

COUVREUR, P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 2012.

CUZICK, J.; POWLES, T.; VERONESI, U.; FORBES, J.; EDWARDS, R.; ASHLEY, S.; BOYLE P. Overview of the main outcomes. **The Lancet.** v. 361. p. 296-300. 2003.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **J. Chem. Phys.** v. 98. p. 10089–10092. 1993.

DI BARI, M. T.; GERELLI, Y.; SONVICO, F.; DERIU, A.; CAVATORTA, F.; ALBANESE, G.; COLOMBO, P.; FERNANDEZ-ALONSO, F. Dynamics of lipid–saccharide nanoparticles by quasielastic neutron scattering. **Chemical Physics.** v. 345. p. 239–244. 2008.

DICKSON, C.J.; MADEJ, B.D.; SKJEVIK, Å.A.; BETZ, R.M.; TEIGEN, K.; GOULD, I.R.; WALTER, R.C. Lipid14: The amber lipid force field, *J. Chem. Theory Comput.* v. 10. p. 865–879. [2014](#).

DIN, F. U.; AMAN, W.; ULLAH., U.; QURESHI, O. S.; MUSTAPHA, O.; SHAFIQUE, F.; ZEB, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. **International Journal of Nanomedicine**. v. 12. p. 7291–7309. 2017.

DILNAWAZ, F.; SINGH, A.; MOHANTY, C.; SAHOO, SK. Dual drug loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. **Biomaterials**. v. 31. p. 3694-3706. 2010.

DITTO, A. J.; SHAH, K. N.; ROBISHAW, N. K.; PANZNER, M. J.; YOUNGS, W. J.; YUN, Y. H. The Interactions between L-Tyrosine Based Nanoparticles Decorated with Folic Acid and Cervical Cancer Cells Under Physiological Flow. **Mol Pharm**. v. 9. n. 11. p. 3089–3098. 2012.

DONG, W.; YE, J.; WANG, W.; YANG, Y.; WANG, H.; SUN, T.; GAO, L.; LIU, Y. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles based on phospholipid complex: A feasible strategy to improve entrapment efficiency and transdermal delivery of poorly lipophilic drug. **Int. J. Nanomedicine**. v. 15. p. 5629–5643. 2020.

DU, H.; LIU, M.; YAN, G. X.; ZHAI, G. The role of glycyrrhetic acid modification on preparation and evaluation of quercetin-loaded chitosan-based self-aggregates. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 460. p. 87-96. 2015.

DU, D. X.; VUONG, B. X. Study on Preparation of Water-Soluble Chitosan with Varying Molecular Weights and Its Antioxidant Activity. **Advances in Materials Science and Engineering**. 2019.

EL-MARAKBY, E.M., HATHOUT, R.M., TAHA, I., MANSOUR, S., MORTADA, N.D. A novel serum-stable liver targeted cytotoxic system using valerateconjugated chitosan nanoparticles surface decorated with glycyrrhizin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 525. n. 1. p. 123-138. 2017.

ESFANDIARPOUR-BOROUJENI, S.; BAGHERI-KHOULENJANI, S.; MIRZADEHA, H.; AMANPOUR, S. Fabrication and study of curcumin loaded nanoparticles based on folate-chitosan for breast cancer therapy application. **Carbohydrate Polymers**. v. 168. p. 14-21. 2017.

ESKILLER, G. G.; CECENER, G.; DIKMEN, G.; EGELI, U.; TUNCA, B. Solid lipid nanoparticles: Reversal of tamoxifen resistance in breast cancer. **Eur. J. Pharm. Sci**. v. 120. n. March, p. 73–88. 2018.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**. n.144. p.1941–1953. 2019.

GERELLI, Y.; BARBIERI, S.; DI BARI, M. T.; DERIU, A.; CANTÙ, L.; BROCCA, P.; SONVICO, F.; COLOMBO, P.; MAY, R.; MOTTA, S. Structure of Self-Organized Multilayer Nanoparticles for Drug Delivery. **Langmuir**. v. 24. n. 20. p. 11378-11384. 2008a.

GERELLI, Y.; DI BARI, M. T.; DERIU, A.; CANTÙ, L.; COLOMBO, P.; COMO, C.; MOTTA, S.; SONVICO, F.; MAY, R. Structure and organization of phospholipid/polysaccharide nanoparticles. **J. Phys.: Condens. Matter.** v. 20. 2008b.

GERELLI, Y.; DI BARI, M. T.; BARBIERI, S.; SONVICO, F.; COLOMBO, P.; NATALI, F.; DERIU, A. Flexibility and drug release features of lipid/saccharide nanoparticles. **Soft Matter.** 2010.

GOMES, A. T. A.; PEREIRA, R. R.; JUNIOR, A.; RODRIGUES, A. M. C.; REMEDIOS, C. M. R.; BRASIL, D. S. B.; MORAIS, L. R. B.; SILVA-JUNIOR, J. O. C.; RIBEIRO-COSTA, R. M. Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) fat: an Amazonian material as a pharmaceutical input for lipid nanoparticle production. **J. Therm. Anal. Calorim.** 2020.

GIRARD, JP. A Direct Inhibitor of HMGB1 Cytokine. **Chemistry & Biology.** v. 14. 2007.

GRIGORAS, AG.. Polymer-lipid hybrid systems used as carriers for insulin delivery. **Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.** v.13. n. 8. v. 2425–2437. 2017.

HARRIS, J. C.; SCULLY, M.A.; DAY, E.S. Cancer Cell Membrane-Coated Nanoparticles for Cancer Management. **Cancers.** v. 11. p. 1836. 2019.

HE, S-J.; CHENG, J.; FENG, X.; YU, Y.; TIAN, L.; HUANG, Q. The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer. **Oncotarget.** v. 8. n. 38. p. 64534-64550. 2017.

HOU, Y.-T.; WUB, K. C.-W. ; LEE, C.-Y. Development of glycyrrhizin-conjugated, chitosan-coated, lysine-embedded mesoporous silica nanoparticles for hepatocyte-targeted liver tissue regeneration. **Materialia.** v. 9. 2020.

HUA, S.; MA, M.; FEI, X.; ZHANG, Y.; GONG, F.; FANG, M. Glycyrrhizin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing HMGB1-dependent GSDMD-mediated kupffer cells pyroptosis. **International Immunopharmacology.** v. 68. p. 145–155. 2019.

ICH, ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Int. Conf. Harmon. 2005.

ICHIKAWA, T.; ISHIDA, S.; SAKIYA, Y.; SAWADAS, Y.; HANANO, M. Biliary Excretion and Enterohepatic Cycling of Glycyrrhizin in Rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 75. n. 7. 1986.

ILK, S.; SAGLAM, N.; ÖZGEN, M. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.** v. 45. n. 5. p. 907-916. 2017.

JAIN, S.; REDDY, C. S. K.; SWAMI, R.; KUSHWAH, V. Amphotericin B loaded chitosan nanoparticles: implication of bile salt stabilization on gastrointestinal stability, permeability and oral bioavailability. **Pharm. Sci. Tech.** v. 19. n. 7. p. 3152-3164. 2018.

JHA, P. K.; LARSON, R. G. Assessing the Efficiency of Polymeric Excipients by Atomistic Molecular Dynamics Simulations. **Mol. Pharmaceutics.** v. 11. n. 5. p. 1676–1686. 2014.

JORGENSEN, W.L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.D.; IMPEV, R.W.; KLEIN, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **J. Chem. Phys.** v. 79. p. 926–935. 1983.

KAMALY, N.; YAMEEN, B; WU, J.; FAROKHZAD, O.C. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. **Chem. Rev.** v. 116. p. 2602-2663. 2016.

KANAPATHIPILLAI, M.; BROCK, A.; INGBER, D.E. Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 79-80. p. 107–118. 2014.

KANG, R.; ZHANG, Q.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T.; TANG, D. HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both? **Clin Cancer Res.** v. 19. n. 15. p. 4046–57. 2013.

KARGOZAR, S.; MOZAFARI, M. Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. V. 5. Issue 7. p. 15492-15500. 2018.

KHADKA, N. K.; CHENG, X.; HO, C. S.; KATSARAS, J.; PAN, J.. Interactions of the Anticancer Drug Tamoxifen with Lipid Membranes. **Biophys. J.** v. 108. n. 10, p. 2492–2501, 2015.

KHALIL, R. M.; ARINI, S. K. E.; SAMRA, M. M. A.; ZAKI, H. S.; EL-GAZAERLY, O. N.; ELBARY, A. A. Development of Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Promoting Topical Delivery of Propranolol Hydrochloride: Design, Optimization and *In-Vivo* Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 110. n. 3. p. 1337-1348. 2020

KHAN, M. M.; MADNI, A.; TORCHILIN, V.; FILIPCZAK, N.; PAN, J.; TAHIR, N.; SHAH, H. Lipid-chitosan hybrid nanoparticles for controlled delivery of cisplatin. **Drug Delivery.** v. 26. n. 1. p. 765–772. 2019.

KHONDEE, S.; CHITTASUPHO, C.; TIM, S.; ANUCHAPREED, S. Doxorubicin-loaded Micelle Targeting MUC1: A Potential Therapeutic for MUC1 Triple Negative Breast Cancer Treatment. **Current Drug Delivery,** v. 15. p. 406-416. 2018.

LAKKADWALA, S.; NGUYEN, S.; LAWRENCE, J.; NAULI, S. M.; NESAMONY, J.. Physico-chemical characterisation, cytotoxic activity, and biocompatibility studies of tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification method. **J. Microencapsul.** v. 31. n. 6. p. 590–599. 2014.

LAO, S-B; ZHANG, Z-X; XU, H-H; JIANG, G-B. Novel amphiphilic chitosan derivatives: Synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone. **Carbohydrate Polymers**. v. 82. n. 4., p. 1136-1142. 2010.

LI, Q.; JIANG, T.; LIU, R.; FENG, X.; LI, C. Tuning the pH profile of beta-glucuronidase by rational site-directed mutagenesis for efficient transformation of glycyrrhizin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103. p. 4813-4823. 2019.

LI, C.; PENG, S.; LIU, X.; HAN, C.; WANG, X.; JIN, T.; LIU, S.; WANG, W.; XIE, X.; XUE, H.; ZHANG, H.; LING, S.; FAN, C.; SHAN, Z.; TENG, W. Glycyrrhizin, a direct HMGB1 antagonist, ameliorates inflammatory infiltration in a model of autoimmune thyroiditis via inhibition of TLR2-HMGB1 signaling Running head: HMGB1 and Spontaneous Autoimmune Thyroiditis. **American Thyroid Association**. v. 27. n. 5. p. 722-731. 2017.

LIN, A.; LIU, Y.; HUANG, Y.; SUN, J.; WU, Z.; ZHANG, X.; PING, Q. Glycyrrhizin surface-modified chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 359. n. 1–2. p. 247-253. 2008.

LIN, A.; CHEN, J.; LIU, Y.M.; DENG, S.; WU, Z.; HUANG, Y.; PING, Q.N. Preparation and evaluation of N-caproyl chitosan nanoparticles surface modified with glycyrrhizin for hepatocyte targeting, **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 35. n. 11. p. 1348-1355. 2009.

LIU, Y.; PURICH, D. L.; WU, C.; WU, Y.; CHEN, T.; CUI, C.; ZHANG, L.; CANSIZ, S.; HOU, W.; WANG, Y.; YANG, S.; TAN, W. Ionic Functionalization of Hydrophobic Colloidal Nanoparticles to Form Ionic Nanoparticles with Enzymelike Properties. **J. Am. Chem. Soc.** v. 137. n. 47. p. 14952–14958. 2015.

LIU, L.; ZHOU, C.; XIA, X.; LIU, Y. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation. **International Journal of Nanomedicine**. v. 11. p. 761–769. 2016.

LIU, Y.; YANG, G.; JIN, S.; XU, L.; ZHAO, C-X. Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. **Chem Plus Chem**. v. 85. n. 9. p. 2143-2157. 2020.

LLARENA, N.C.; ESTEVEZ, S.L.; TUCKER, S.L.; JERUSS, J.S. Impact of fertility concerns on tamoxifen initiation and persistence. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 107. n. 10. 2015.

LZAGUIRRE, J.A.; CATARELLO, D.P.; WOZNIAK, J.M.; SKEEL, R.D. Langevin stabilization of molecular dynamics. **J. Chem. Phys.** v. 114. p. 2090–2098. 2001.

MA, Z.; FAN, Y.; WU, Y.; KEBEBE, D.; ZHANG, B.; LU, P.; PI, J.; LIU, Z. Traditional Chinese medicine-combination therapies utilizing nanotechnology-based targeted delivery systems: a new strategy for antitumor treatment. **International Journal of Nanomedicine**. V. 14. p. 2029–2053. 2019.

MAJI, R.; DEY, N. S.; SATAPATHY, B. S.; MUKHERJEE, B.; MONDAL, S.

Preparation and characterization of Tamoxifen citrate loaded nanoparticles for breast cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**. v. 9. p. 3107–3118. 2014.

MAHMOOD, S.; KIONG, K. C.; THAM, C. S.; CHIEN, T. C.; HILLES, A. R.; VENUGOPA, J. R. PEGylated Lipid Polymeric Nanoparticle–Encapsulated Acyclovir for In Vitro Controlled Release and Ex Vivo Gut Sac Permeation. **AAPS Pharm Sci Tech**. v. 21. n. 285. 2020

MARQUES, A. C.; COSTA, P. J.; VELHO, S.; AMARAL, M.H. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. **Journal of Controlled Release**. v. 320. p. 180–200. 2020.

MANIRUZZAMAN, M.; PANG, J.; MORGAN, D. J.; DOUROUMIS, D. Molecular Modeling as a Predictive Tool for the Development of Solid Dispersions. **Mol. Pharmaceutics**. v. 12. p. 1040–1049. 2015.

MANOUCHEHRI, F.; IZADMANESH, Y.; GHASEMI, J.B. Characterization of the interaction of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid with bovine serum albumin by spectrophotometric-gradient flow injection titration technique and molecular modeling simulations. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 102. p. 92–103. [2017](#).

MARTINEZ, L.; ANDRADE, R.; BIRGIN, E.G.; MARTINEZ, J.M.; PACKMOL, A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. **J. Comput. Chem.** v. 30. p. 2157–2164. 2009.

MATSUOKA, K.; MIYAJIMA, R.; ISHIDA, Y.; KARASAWA, S.; YOSHIMURA, T. Aggregate formation of glycyrrhizic acid. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 500. p. 112-117. 2016.

MCDONALD, T. O., SICCARDI, M., MOSS, D., LIPTROTT, N., GIARDIELLO, M., RANNARD, S., AND OWEN, A. The application of nanotechnology to drug delivery in medicine. **Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues**. p. 173–223. 2015.

MIR, M.; ISHTIAQ, S.; RABIA, S.; KHATOON, M.; ZEB, A.; KHAN, G. M.; REHMAN, A. U.; DIN, F. U. Nanotechnology: from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery. **Nanoscale Research Letters**. v. 12. n. 500. 2017.

MEHATA, A. K.; BHARTI, S.; SINGH, P.; VISWANADH, K.; KUMARI, L.; AGRAWAL, P.; SINGH, S.; KOCH, B.; MUTHU, M. S. Trastuzumab decorated TPGS-g-chitosan nanoparticles for targeted breast cancer therapy. **Colloids and surfaces B:Biointerfaces**. v. 173. 2018.

MISHRA, D.; JAIN, N.; RAJORIYA, V.; JAIN. ASHISH KUMAR. Glycyrrhizin conjugated chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of lamivudine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 66. n. 8. p. 1082-1093. 2014.

MISHRA, P.; NAYAK, B.; DEY, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 11. p. 337–348. 2016.

MOLLICA, L.; DE MARCHIS, F.; SPITALERI, A.; DALLACOSTA, C.; PENNACCHINI, D.; ZAMAI, M.; AGRETI, A.; TRISCIUGLIO, L.; MUSCO, G.; BIANCHI, M.E. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. **Chem Biol.** v. 14. p. 431–41. 2007.

MONSALVE, Y.; TOSI, G.; RUOZI, B.; BELLETTI, D.; VILELLA, A.; ZOLI, M.; VANDELLI, M. A.; FORNI, F.; LÓPEZ, B. L.; SIERRA, L. PEG-g-chitosan nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26 for brain drug targeting. **Nanomedicine (Lond.)** v. 10. n. 11. p. 1735–1750. 2015.

MUSUMECI, D.; ROVIELLO, G. N.; MONTESARCHIO, D. An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 141. p. 347–357. 2014.

MURTHYA, A.; RAVIA, P. R.; KATHURIA, H.; VATS, R.. Self-assembled lecithin-chitosan nanoparticles improve the oral bioavailability and alter the pharmacokinetics of raloxifene. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 588. 2020.

MOON, Z., MOSS-MORRIS, R., HUNTER, M. S., CARLISLE, S., & HUGHES, L.D. Barriers and facilitators of adjuvant hormone therapy adherence and persistence in women with breast cancer: A systematic review. **Patient Preference and Adherence.** n. 11. P. 305–322. 2017.

MORENO, E.; SCHWARTZ, J.; LARREA, E.; CONDE, I.; FONT, M.; SANMARTIN, C.; IRACHE, J. M.; ESPUELAS, S. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.** v. 11. n. 8. p. 2003-2012. 2015.

NAG, M.; GAJBHIYE, V.; KESHARWANI, P.; JAIN, N. K. Transferrin functionalized chitosan-PEG nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel to cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 148. p. 363-370. 2016.

NOSRATI, H.; RASHIDI, N.; DANAFAR, H.; MANJILI, H. K.. Anticancer Activity of Tamoxifen Loaded Tyrosine Decorated Biocompatible Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Against Breast Cancer Cell Lines. **J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.** v. 28. n. 3. p. 1178–1186. 2018.

OMAR, H. R.; KOMAROVA, I.; EL-GHONEMI, M.; FATHY, A.; RASHAD, R.; ABDELMALAK, H. D.; YERRAMADHA, M. R.; ALI, Y.; HELAL, E.; CAMPORESI, E. M.. Licorice abuse: Time to send a warning message. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism.** v. 3, n. 4. p. 125–138. 2012.

OSAKA, S.; TSUJI, H.; KIWADA, H. Uptake of liposomes surface-modified with Glycyrrhizin by primary cultured rat hepatocytes. **Biol. Pharm. Bull.** v. 17. n. 7. p. 940-943. 1994.

OZCAN, I., AZIZOGLU, E.; SENYIGIT, T.; OZYAZICI, M.; OZER, O. Comparison of PLGA and lecithin/chitosan nanoparticles for dermal targeting of betamethasone

valerate. **Journal of Drug Target.** v. 21. n. 6. 2013.

PATRA, J. K.; DAS, G.; FRACETO, L. F.; CAMPOS, E. V. R.; RODRIGUEZ-TORRES, M. D. P.; ACOSTA-TORRES, L. S.; DIAZ-TORRES, L. A.; GRILLO, R.; SWAMY, M. K.; SHARMA, S.; HABTEMARIAM, S.; SHIN, H.-S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J Nanobiotechnol.** v. 16. n. 71. 2018.

PEREZ-RUIZ, A. G.; GANEM, A.; CORICHI, I. M. O.; GARCIA-SANCHEZ, J. R. Lecithin–chitosan–TPGS nanoparticles as nanocarriers of (?)-epicatechin enhanced its anticancer activity in breast cancer cells. **The Royal Society of Chemistry.** v. 8. p. 34773–34782. 2018.

PILIPENKO, I.; KORZHIKOV-VLAKH, V.; SHAROYKO, V.; ZHANG, N.; SCHAFFER-KORTING, M.; RUHL, E.; ZOSCHKE, C.; TENNIKOVA, T. pH-Sensitive Chitosan–Heparin Nanoparticles for Effective Delivery of Genetic Drugs into Epithelial Cells. **Pharmaceutics.** v. 11. n. 317. 2019.

PINTO, V. S.; ARAUJO, J. S. C.; SILVA, R. C.; COSTA, G. V.; CRUZ, J. N.; NETO, M. F. A.; CAMPOS, J. M.; SANTOS, C. B. R.; LEITE, F. H. A.; JUNIOR, M. C. S. In silico study to identify new antituberculosis molecules from natural sources by hierarchical virtual screening and molecular dynamics simulations. **Pharmaceutics.** v. 12. n. 1. 2019.

ROSHAN, A.; VERMA, N. K.; CHAUDHARY, S. K.; CHANDRA, V.; SING, D. P.; PANDY, M. J. Phytochemical constituent, pharmacological activities and medicinal uses through the millennia of *Glycyrrhiza glabra* Linn: a review. **International Research Journal of Pharmacy.** v. 3. n. 8. p. 45–55. 2012.

RAJ, S; KHURANA, S.; CHOUDHARI, R; KUMAR KESARI, K.; KAMAL, M. A.; GARG, N.; RUOKOLAINEN, J.; DAS, B. C.; KUMAR, D. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology.** v. 69. p. 166-177. 2019.

RAVIKUMARA, N. R.; BHARADWAJ, M.; MADHUSUDHAN, B. Tamoxifen citrate-loaded poly (D,L) lactic acid nanoparticles: Evaluation for their anticancer activity in vitro and in vivo. **Journal of biomaterials application.** v. 311. n. 5. 2016.

RYCKAERT, J-P; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. **Journal of Computational. Physics.** v. 23. p. 321-341. 1977.

SAAKOV, V. S.; DRAPKIN, V. Z.; KRIVCHENKO, A. I.; ROZENGART, E. V.; BOGACHEV, Y. V.; KNYAZEV, M. N. Derivative Spectrophotometry and Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy for Ecological and Biological Questions. Vienna: Springer Vienna, 2013.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D.A.; WALKER, R.C. An overview of the Amber biomolecular simulation package, Wiley Interdiscip. **Rev. Comput. Mol. Sci.** v. 3. p. 198–210. 2013.

SALOMON-FERRER, R.; GÖTZA, W.; POOLE, D.; LE GRAND, S.; WALKER, R.C. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh ewald, *J. Chem. Theory Comput.* v. 9. p. 3878–3888. 2013.

SANNA, V.; SECHI, M. Therapeutic Potential of Targeted Nanoparticles and Perspective on Nanotherapies. **ACS Med. Chem. Lett.** v. 11. p. 1069–1073. 2020.

SELECI, M.; SELECI, D. A.; JONCZYK, R.; STAHL, F. Cornelia Blume and Thomas Scheper Smart multifunctional nanoparticles in nanomedicine. **Bio Nano Mat.** v. 17. n. 1-2. p. 33–41. 2016.

SELYUTINA, O.Yu.; APANASENKO, I.E.; KIM, A.V.; SHELEPOVA, E.A.; KHALIKOV, S.S.; POLYAKOV, N.E. Spectroscopic and molecular dynamics characterization of glycyrrhizin membrane modifying activity. **Institute of Chemical Kinetics Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 147. p. 459–466. 2016.

ŞENYIGIT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, F.; BARBIERI, S.; ÖZER, Ö.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release.** v. 142. n. 3. p. 368–373. 2009.

SHAH, S. L.; WAHID, F.; KHAN, N.; FAROOQ, U.; SHAH, A. J.; TAREEN, S.; AHAMD, F.; KHAN, T. Inhibitory Effects of Glycyrrhiza glabra and Its Major Constituent Glycyrrhizin on Inflammation-Associated Corneal Neovascularization. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** p. 1-8. 2018.

SHARMA, V.K., FILIP, J., ZBORIL, R., VARMA, R.S.. Natural inorganic nanoparticles: formation, fate, and toxicity in the environment. **Chem. Soc. Rev.** v. 44. p. 8410–8423. 2015.

SHI, L.; TANG, C.; YIN, C. Glycyrrhizin-modified O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as drug vehicles targeting hepatocellular carcinoma. **Biomaterials,** v. 33, n. 30, p.7594-7604, 2012.

SMOLARCZYK, R.; CICHONÍ, T.; MATUSZCZAK, S.; MITRUS, I.; LESIAK, M.; KOBUSIŃSKA, M.; SZALA, S. The Role of Glycyrrhizin, an Inhibitor of HMGB1 Protein, in Anticancer Therapy. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.** v. 60. n. 5. p. 391–399. 2012.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; DI BARI, M. T.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 324. n. 1. p. 67–73. 2006a.

SONVICO, F.; DI BARI, M. T.; BOVE, L.; DERIU, A.; CAVATORTA, F.; ALBANESE, G. Mean square hydrogen fluctuations in chitosan/lecithin nanoparticles from elastic neutron scattering experiments. **Physica B.** p. 725–727. 2006b.

SOHUN, M.; SHEN, H. The implication and potential applications of high-mobility group box 1 protein in breast cancer. **Ann Transl Med.** v. 4. n. 11. p. 217. 2016.

SOUZA, M. P.; VAZ, A. F. M.; COSTA, T. B.; CERQUEIRA, M. A.; DE CASTRO, C. M. M. B.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Construction of a Biocompatible and Antioxidant Multilayer Coating by Layer-by-Layer Assembly of κ -Carrageenan and Quercetin Nanoparticles. **Food and Bioprocess Technology.** v. 11. p. 1050-1060. 2018.

SRINIVASAN, M.; BARNERJEE, S.; PALMER, A.; ZHENG, G.; CHEN, A.; BOSLAND, M. C.; KAJDACSZY-BALLA, A.; KALYANASUNDARAM, R.; MUNIRATHINAM, G. HMGB1 in Hormone-Related Cancer: a Potential Therapeutic Target. **Horm. Canc.** v. 5. p. 127–139. 2014.

SREEHARSHA, N.; HIREMATH, J. G.; CHILUKURI, S.; AITHA, R. K.; AL-DHUBIAB, B. E.; VENUGOPALA, K. N.; ALZHRANI, A. M.; MERAVANIGE, G. An approach to enhance dissolution rate of tamoxifen citrate. **Biomed Res. Int.** v. 2019. 2019.

SUN, Z-G.; ZHAO, T.-T.; LU, N.; YANG, Y.-A.; ZHU, H.-L. Research Progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry.** v. 19. n. 10. p. 826-832. 2019.

SUN, Y.; CHEN, H.; DAI, J.; WAN, Z.; XIONG, P.; XU, Y.; HAN, Z.; CHAI, W.; GONG, F.; ZHENG, F. Glycyrrhizin Protects Mice Against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Expression and Neuronal HMGB1 Release. **Front. Immunol.** v. 9. n.1518. 2018.

TALARI, A. C. S.; MARTINEZ, M. A. G.; MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; Ihtesham Ur REHMAN, I. U. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues, **Applied Spectroscopy Reviews.** v. 52. n. 5. p. 456-506. 2017.

TERRON-MEJIA, K. A.; MARTINEZ-BENAVIDEZ, E.; HIGUERA-CIAPARA, I.; VIRUES, C.; HERNANDEZ, J.; DOMINGUEZ, Z.; ARGUELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M.; LOPEZ-RENDON, R.; GOICOHEA, A. G. Mesoscopic Modeling of the Encapsulation of Capsaicin by Lecithin/Chitosan Liposomal Nanoparticles. **Nanomaterials.** v. 8. n. 425. 2018.

TIAN, Q., WANG, X.H., WANG, W., ZHANG, C.N., WANG, P., YUAN, Z. Self-assembly and liver targeting of sulfated chitosan nanoparticles functionalized with glycyrrhetic acid. **Nanomedicine.** v. 8. p. 870–879. 2012.

TSUJI, H.; OSAKA, S.; KIDAWA, H. Targeting of liposomes surface-modified with Glycyrrhizin to the liver. I. Preparation and biological disposition. **Chem. Pharm. Bull.** v. 39. n. 4. p. 1004-1008. 1991.

ULLOA, L.; MESSMER, D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** v. 17. p. 189–201. 2006.

VIVEK, IR.; NIPUN BABU, V.; THANGAM, R.; SUBRAMANIAN, K.S.; KANNAN, S. pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 111. p. 117-123. 2013.

VENEREAU, E.; DE LEO, F.; MEZZAPELLE, R.; CARECCIA, G.; MUSCO, G.; BIANCHI, M. E. HMGB1 as biomarker and drug target. **Pharmacological Research**. v. 111. p. 534–544. 2016.

WANG, J.; WOLF, R.M.; CALDWELL, J.W.; KOLLMAN, P.A.; CASE, D.A. Development and testing of a general Amber force field. **J. Comput. Chem.** v. 25. p. 1157–1174. 2004.

WOJCIECHOWSKI, K.; ORCZYK, M.; TRAPP, M.; GUTBERLET, T. Effect of triterpene and steroid saponins on lecithin bilayers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. n. 510. p. 150-158. 2016.

World Health Organization – WHO. Breast Cancer. 2019. Disponibile in: <<https://www.who.int/cancer/>>.

WU, M.; LIA, B.; DENG, Y.; FENG, Z.; ZHONG, C.; WU, W.; HUANG, Y.; WANG, L.; ZU, C.; ZHAO, X. Resveratrol-loaded glycyrrhizic acid-conjugated human serum albumin nanoparticles wrapping resveratrol nanoparticles: Preparation, characterization, and targeting effect on liver tumors. **J. Biomater. Appl.** v. 32. p. 191–205. 2017.

YAN, T.; CHENG, J.; LIU, Z.; CHENG, F.; WEI, X.; HUANG, Y.; HE, J. Acid-sensitive polymeric vector targeting to hepatocarcinoma cells via glycyrrhetic acid receptor mediated endocytosis. **Materials Science and Engineering**. v. 87. p. 32-40. 2018.

YAN, L.; LI, D.; LI, J.; CHENG, F.; CHENG, J.; HUANG, Y.; HE, J. Effective co-delivery of doxorubicin and curcumin using a glycyrrhetic acid-modified chitosan-cystamine-poly(-caprolactone) copolymer micelle for combination cancer chemotherapy **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 145. p. 526–538. 2016.

YAMADA, S.; MARUYAMA, I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. **Clinica Chimica Acta**. v. 375. p. 36–42. 2007.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Rev.** v. 2. n. 3. p. 204–226. 2015.

ZHANG, H.; WANG, C.; CHEN, B.; WANG, X. Daunorubicin-TiO₂ nanocomposites as a “smart” pH-responsive drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7. p. 235–242. 2012.

ZHANG, H.; HUANG, Q.; ZHAI, J.; ZHAO, Y.-N.; ZHANG, L.-P.; CHEN, Y.-Y.; ZHANG, R.-W.; LI, Q.; HU, X.-P. Structural basis for 18- β -glycyrrhetic acid as a novel non-GSH analog glyoxalase I inhibitor. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 36. p. 1145–1150. 2015.

ZHANG, Y.; LI, L.; QI, C.; HUA, S.; FEI, X.; GONG, F.; FANG, M. Glycyrrhizin alleviates Con A-induced hepatitis by differentially regulating the production of IL-17 and IL-25. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 110. p. 692–6990. 2019.

ZHAO, X. L.; FANG, Y.; DENG, S.; LI, X.; ZHOU, Y.; GONG, Y.; ZHU, H.; WANG, W. High-mobility group box 1 released by autophagic cancer-associated fibroblasts maintains the stemness of luminal breast cancer cells. **Journal of Pathology**. v. 243. p. 376–389. 2017.

ZHONG, Y.; MENG, F.; DENG, C.; ZHONG, Z. Ligand-Directed Active Tumor-Targeting Polymeric Nanoparticles for Cancer Chemotherapy. **Biomacromolecules**. v. 15. p. 1955-1969. 2014.

ZHOU, N.; CAIYUANZOU; MENGLINQIN; LI, Y.; HUANG, J. A simple method for evaluation pharmacokinetics of glycyrrhetic acid and potential drug-drug interaction between herbal ingredients. **Scientific Reports**. v. 9. n. 11308. 2019.

ZU, Y.; MENG, L.; ZHAO, X.; GE, Y.; YU, X.; ZHANG, Y.; DENG, Y. Preparation of 10-hydroxycamptothecin-loaded glycyrrhizic acid-conjugated bovine serum albumin nanoparticles for hepatocellular carcinoma-targeted drug delivery. **Int. J. Nanomed.** v. 8. p. 1207–1222. 2013.

Allegato 1. Review pubblicato sulla rivista scientifica *Pharmaceutics*.

Glycyrrhizic Acid and Its Hydrolyzed Metabolite 18 β -Glycyrrhetic Acid as Specific Ligands for Targeting Nanosystems in the Treatment of Liver Cancer

Luciano A. Stecanella ^{1,2,†}, Antonio P.R. Bitencourt ^{1,2,†}, Gustavo Richter Vaz ^{2,3,†}, Eride Quarta ^{2,4}, José O.C. Silva Júnior ¹ and Alessandra Rossi ^{2,5,*}

¹ Laboratory R&D Pharmaceutical and Cosmetic, Federal University of Pará, Street Augusto Correa 01, Belém, 66075110, PA, Brazil; lastecanella@ufpa.br (L.S.); antoniopaulo.ribeirobitencourt@unipr.it (A.B.); carrera@ufpa.br (J.S.)

² Department of Food and Drug, University of Parma, , Parco Area delle Scienze 27/A, Parma, 43124, Italy; gustavo.vaz@unipr.it (G.V.); eride.quarta@studenti.unipr.it (E.Q.)

³ Laboratory of Nanotechnology Applied to Health, Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Rio Grande, Av Italia, Km 8, Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil

⁴ Department of Food and Drug, Plumestars srl, c/o Parco Area delle Scienze 27/A, Parma, 43124, Italy

⁵ Interdepartmental Center for Innovation in Health Products, Biopharmanet-TEC, University of Parma, Parco Area delle Scienze 27/A, Parma, 43124, Italy

[†] These authors contributed equally to this work.

* Correspondence: alessandra.rossi@unipr.it; Tel.: +39-0521-905084.

Citation: Stecanella, L.A.; Bitencourt, Gustavo Richter Vaz, G.; Quarta, E.; Silva Junior, José O.C.; Rossi, A. Glycyrrhizic acid and its hydrolyzed metabolite 18 β -glycyrrhetic acid as specific ligands for targeting nanosystems in the treatment of liver cancer. *Pharmaceutics* 2021,13, x. doi.org/10.3390/pharmaceutics13111792

Academic Editor: Tomáš Etrych

Received: 11 June 2021

Accepted: 19 October 2021

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published articles and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Glycyrrhizic acid and its hydrolyzed metabolite 18 β -glycyrrhetic acid, obtained from the plant *Glycyrrhiza glabra*, have numerous pharmacological activities, such as anti-inflammatory, anti-ulcerative, antiallergic, immunomodulatory, antiviral, antitumor, hepatoprotective, and antioxidant effects, and others. In addition to the pharmacological activities, in the 1980s, an interaction and uptake of these molecules by the liver was verified, which was later confirmed by other studies through the discovery of specific receptors in the hepatocytes. The presence of these specific receptors in the liver led to vectorization and delivery of drugs, by the introduction of glycyrrhizic acid or glycyrrhetic acid on the surface of nanosystems, for the treatment of liver diseases. This review describes experimental evidence of vectorization by conjugating glycyrrhizic acid or glycyrrhetic acid to nanosystems and delivery of antitumor drugs for the treatment of liver cancer and also describes the techniques used to perform this conjugation. We have shown that due to the existence of specific receptors for these molecules, in addition to the targeting of nanosystems to hepatocytes, nanosystems having glycyrrhizic acid or glycyrrhetic acid on their surface had the same therapeutic effect in a significantly lower dose compared to the free drug and unconjugated nanosystems, with consequent reduction of side effects and toxicity.

Keywords: glycyrrhizic acid; glycyrrhetic acid; liver cancer; nanosystems; drug targeting

1. Introduction

1.1. Liver Cancer

Among cancer diseases, in 2018, liver cancer was considered the second highest cause of male mortality with 841,080 cases diagnosed and 781,631 deaths in the same year, being the sixth highest incidence rate by age in the world [1]. Approximately 70–90% of the liver cancer diagnosed in the world is hepatocellular carcinoma (HCC) [2]. Another type of liver cancer, but with a lower incidence, is cholangiocarcinoma, which is also known as bile duct cancer; it is

most commonly diagnosed in Thailand and other parts of Asia due to the presence of liver flukes in the consumed raw fish dishes [3].

The major cause of hepatocellular carcinoma is chronic hepatitis B and C, but other possible causes are cirrhosis linked to excessive alcohol consumption, aflatoxin, smoking, type 2 diabetes, and obesity-induced hepatic steatosis [2,4–6]. Recent studies predict a rise in the incidence of liver cancer by 2030 due to increased alcoholism and obesity [7].

So far, the treatment of liver cancers may include hepatic resection, liver transplantation, transarterial chemoembolization, ablation, first-line and second-line drug therapies, depending on the HCC stage [8].

Specific drug delivery systems that can target the drugs into the tumor site have demonstrated great potential in cancer treatment [9]. With regard to that, there has been a great interest from researchers in using glycyrrhizic acid and its derivative as drug delivery carriers for the treatment of HCC, also on the basis of their hepatoprotective activity exploited for over thirty years for the treatment of liver disease in Asia [10–11].

This review is focused on an in-depth analysis of the research strategies to obtain glycyrrhizic acid or glycyrrhetic acid-conjugated drug delivery systems that are able to target the drug in the HCC and reduce drug side effects and toxicity.

1.2. Glycyrrhizic Acid and 18b-Glycyrrhetic Acid

Glycyrrhizic acid, also known as glycyrrhizin (GL) (Figure 1), is a triterpenic saponin obtained from *Glycyrrhiza glabra* [12] and is composed of two molecules of glucuronic acid and one molecule of glycyrrhetic acid (GA). GA is obtained from hydrolysis of GL, both of them being major compounds of the *Glycyrrhiza glabra* L. root extract [13]. It has also been found that GA is the product of the biotransformation of GL by human intestinal flora [14]. In agreement with published studies, even at high concentrations, GL has pharmacological tolerance and absence of cytotoxicity in rats and humans [15–16]. Even GA, when given intravenously at a dose of 240 mg three times a week for 4 weeks, is well tolerated by humans, and it has no adverse effects [16–17].

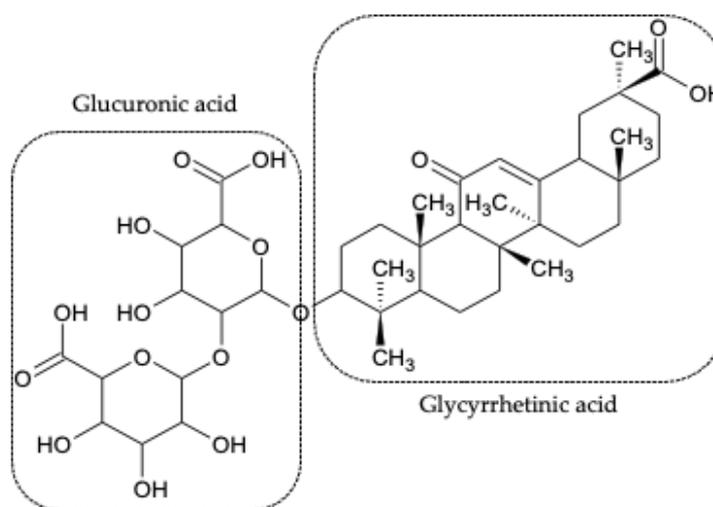


Figure 1. Chemical structure of the triterpenic saponin glycyrrhizic acid (GL) showing the two molecules of glucuronic acid and the molecule of glycyrrhetic acid (GA).

GL and GA have numerous pharmacological activities, such as anti-inflammatory [18–20], anti-ulcerative, antiallergic, immunomodulatory [21–22], antiviral [23–25], antileishmanial [26], antitumor [27–31], hepatoprotective [13,32–35], antioxidant [36–38], cardioprotective [38–40], and neuroprotective effects [41–43]. Moreover, they protect the brain tissue in global ischemia, brain lesions induced by intracerebral hemorrhage, and focal ischemia [12]. In addition to the described activities, a study suggested that GL may be a potential therapeutic agent in the treatment of lymphoid malignancies associated with the Epstein–Barr virus [44]. On the other side, GA studies have demonstrated that GA alone shows therapeutic potential in the treatment of multiple sclerosis [45].

Apart from their therapeutic activities, other uses have been discovered for GL and GA due to the amphiphilic characteristic of the molecules: i) ability to self-associate in aqueous and non-aqueous media forming micelles and other structures; ii) increasing the solubility of lipophilic drugs through the formation of complexes; iii) modification of the lipid bilayer making the cell membrane more flexible and permeable. Thus, due to their ability to interact with the cell membrane, the entry of drugs into the cells can be facilitated, proving to be an efficient drug delivery system [46].

Pharmacological Mechanism

The ammonium salt of glycyrrhizic acid stands out for its anti-inflammatory activity [47-48]. The anti-inflammatory mechanism involves (1) cytokines and chemokines such as TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), IL-1 β (interleukin-1 β), IL-18 (interleukin-18), IL-17 (interleukin-17), IL-12 (interleukin-12), IL-10 (interleukin-10), IL-8 (interleukin-8), IL-6 (interleukin-6), IL-5 (interleukin-5), IL-4 (interleukin-4), IFN- γ (interferon- γ), and eotaxin-1 (eosinophil-specific chemoattractant); (2) ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule) and P-selectin (type-1 transmembrane protein); (3) some enzymes such as iNOS (inducible nitric oxide synthase); and (4) transcription factors, such as NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), STAT-3 (signaling transducer and activator of transcription 3), and STAT6 (signaling transducer and activator of transcription 6) [49].

TNF- α , IL-1 β , and HMGB1 (high mobility group box 1) are pro-inflammatory factors present in the process of many infectious diseases. HMGB1, released in infectious processes, generates severe inflammatory processes due to its connection with several receptors such as TLR2 (toll-like receptor 2), TLR4 (toll-like receptor 4), and RAGE (receptor of advanced glycation end products); this leads to activation of the kinase pathway associated with the IL-1 receptor via the MyD88 (myeloid differentiation factor 88) [19,50–51]. Activation of IKK- α /IKK- β (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta) leads to phosphorylation and degradation of I κ B- α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha), which in turn activates even more NF- κ B and the release of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β , and IL-6, to induce inflammation via the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinases/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin) pathway [19]. Consequently, GL could be useful for the treatment of acute lung injury (ALI) and also for the syndromes from acute respiratory distress [49] and immunoglobulin E-mediated allergic reaction [22]. In addition to these inflammatory mechanisms, HMGB1 stimulates the effector function of immune cells, such as lymphoid and myeloid cells, including natural killer cells (NK), macrophages, and B and T cells, also showing the immunomodulatory action of GL [52,53]. A study showed that GL inhibits HMGB1 and suppresses the secretion of TNF- α and IL-1 β , which are inflammatory cytokines released in ALI models in mice [43,51,54-55]. Moreover, GL effectively attenuated thyroiditis by inhibition of TLR2-HMGB1 signaling [56] and reduced ferroptosis level during acute liver failure through the inhibition of oxidative stress pathways due to GL capacity on reducing HMGB1 and ROS (reactive oxygen species) [57]. The immunomodulatory action of GL is schematically represented in Figure 2.

The potential clinical use of GL has also been observed in the treatment of acute viral hepatitis [58]. Moreover, assessing its potential use as an antiviral, GL has the potential to be used for the treatment of SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) virus [59,60]. With regard to this, GL can act in two different ways. As schematically described in Figure 3, the first way is related to the reduction in the expression of the co-factor known as TMPRSS2 (transmembrane serine protease type 2) through the direct inhibition of 11 β -HSD2 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme) and consequent decrease in ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2), which is linked to the interaction of several organs (lung, heart, liver, and kidneys) with the SARS-CoV-2 [61–63]. The second pathway is related to its antiviral activity [23]. GL induces nitrous oxide synthase in cells, causing inhibition of virus replication. In addition, GL affects cellular signaling pathways, such as protein kinase C, casein kinase II, and transcription factors, such as activating protein 1 and NF- κ B.

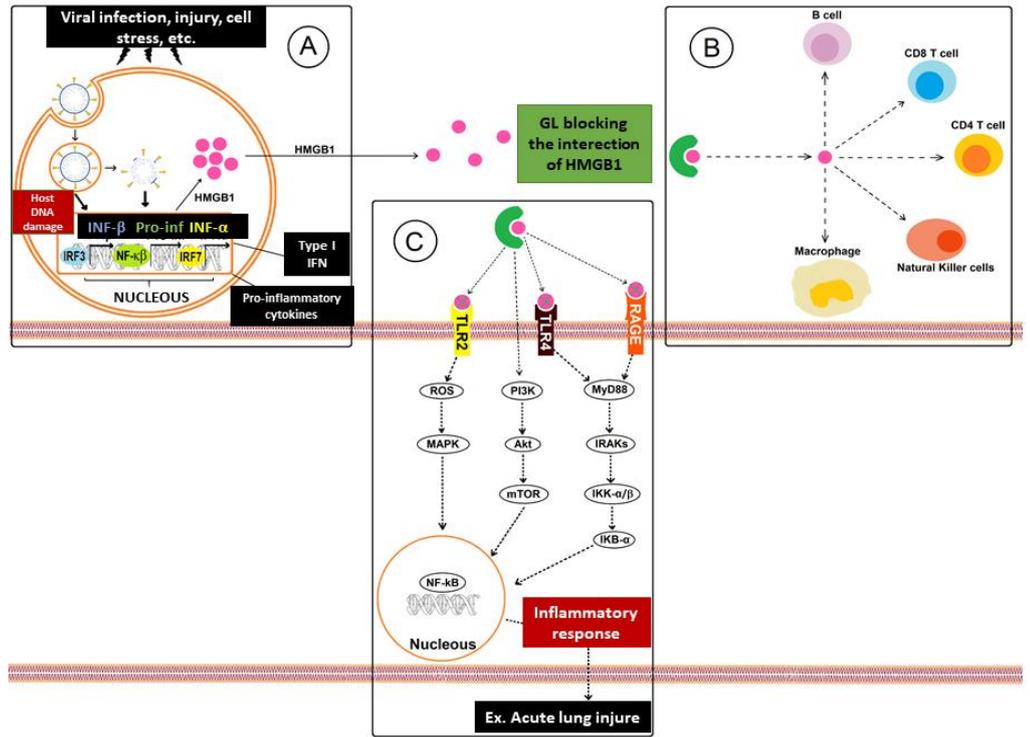


Figure 2. Mechanism of inhibitory action of glycyrrhizic acid in HMGB1 protein-mediated infectious diseases: (A) cells with active replicating virus become apoptotic and die, releasing type I IFN, HMGB1, and pro-inflammatory cytokines in the extracellular environment; (B) HMGB1, actively released after a viral infection, major stress, injury, etc., also acts as a cytokine that plays a modulating role in innate and adaptive immune responses, stimulating NK immune cells, macrophages, and B and T cells; (C) HMGB1 present in the extracellular environment binds to specific receptors on the surface of other cells, such as RAGE, TLR2, and TLR4, inducing the production of inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, and ROS, thus activating the signal of protein kinase pathways by NF- κ B and MAPK (mitogen-activated protein kinase) to mediate inflammatory molecules.

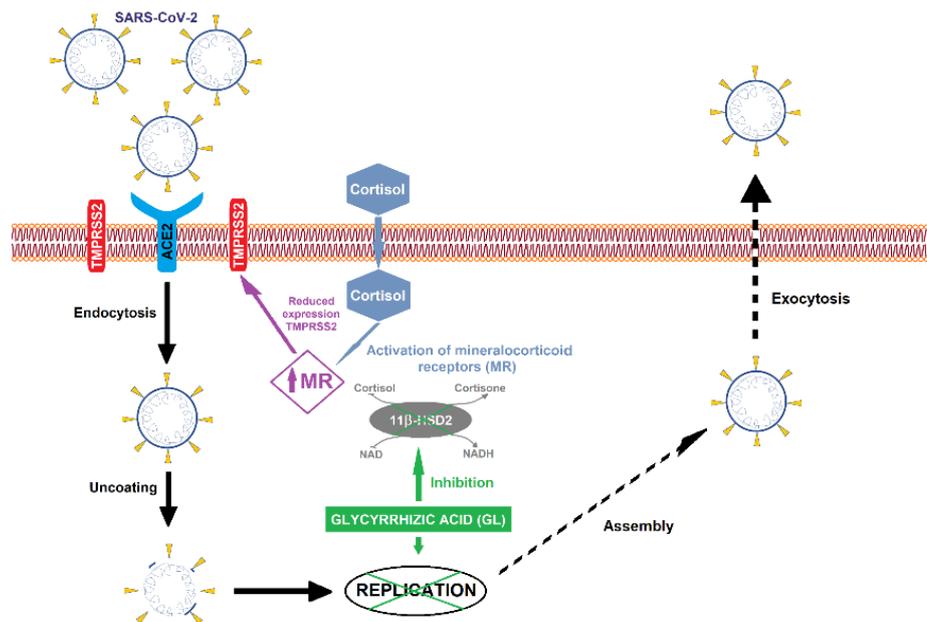


Figure 3. Schematic representation of glycyrrhizic acid effect on SARS-CoV-2 virus replication. The penetration of the SARS-CoV-2 virus into the cells, where it finds the ideal conditions for its replication, is mediated by ACE2 receptor with TMPRSS2 co-factor. Since ACE2 expression is regulated by MR (mineralocorticoid receptors), GL (green box) inside the cell inhibits 11 β -HSD2 enzyme, allowing cortisol to activate MR. Then, the activation of MR leads to reduction of TMPRSS2 expression, causing an ACE2 downregulation. The 11 β -HSD2 inhibition restricts the virus access to the cell, and consequently, the virus replication is inhibited.

1.3. Vectorization of Nanosystems

The direct cellular delivery of most compounds is limited by the lipophilic characteristics of the cell membrane. Simple diffusion is restricted only to molecules smaller than 1KDa (small molecules and ions), requiring administration at the intracellular level to carry out its therapeutic action [64]. For this reason, a great evolution has occurred in the development of drug delivery systems with the use of nanosystems with biocompatible materials, thus improving pharmacokinetics and reducing cytotoxicity [65].

Nanotechnology is being studied for use in all therapeutic classes, but major emphasis is given to anticancer drugs because of their extensive side effects caused by the non-selectivity of the drugs to the cancer cells. For this reason, nanocarriers have been designed to reach only the cancer cells, in particular the constituents of the structure as proteins, peptides, nucleic acids, polysaccharides, and lipids, alone or in combination. The nanosystem's selective activity allows the intracellular release of the drug by enhancing drug efficacy, especially in the case of multidrug resistance [64]. This transport or selective delivery is called vectorization [66].

An example of vectorization is the use of cellular penetration peptides, which are inserted into the surface of the nanoparticles, through which cell membrane translocation occurs, and consequently, the penetration efficiency increases. Thus, the internalization of the nanoparticles favors the impact reduction on patients' health [64]. This internalization was observed with liposomes decorated with glycyrrhizic acid due to the presence of GL receptors on the surface of rat hepatocytes [67]. The increasing evolution of the molecular biology knowledge and the consequent discovery of new targets and promising target ligands provides new information for the development of new nanosystems decorated for vectorization [68–70].

2. Glycyrrhizic Acid and Glycyrrhetic Acid Receptors

The affinity of GA and GL for the receptors in the liver was demonstrated by several researchers. In a study conducted in 1986, Ichikawa et al. found that about 80% of the GL dose intravenously administered to rats was excreted in bile, and this prompted to carry out the development of new products aimed at the delivering of the drug to the liver, based on the hypothesis that GL could have specific receptors in the liver [71]. Tsuji et al. introduced GL on the liposome surface in order to obtain a new colloidal system that allowed the drug delivery to the liver [72]. It was verified an accumulation in the liver of 42 % of intravenously injected dose after four hours of its application, thus suggesting the presence of specific sites for GL in the liver. Subsequently, in 1994, the same research group published an article in which the presence of specific receptors for GL in the liver was confirmed [67]. In this work, primary cultures of rat hepatocytes were placed in contact with a 50 mM solution of GL, causing saturation of the receptors and reducing the uptake of GL-decorated liposomes by 80%. This effect was not observed with the undecorated liposome, thus confirming that the receptors were GL binding site-specific. In order to understand which part of the GL molecule bound to the receptor, a test was performed with the cells pre-incubated with a 20mM glucuronic acid solution. As the GL-decorated liposome uptake was not reduced, the authors concluded that the portion bound to the receptor was GA.

In summary, these works have opened the door for the development of new products for the treatment of liver diseases, among which many are fatal, and the treatments available are with drugs that are poorly absorbed in the hepatocytes and consequently have low efficiency [30].

3. Functionalized Nanoparticles with Glycyrrhizic Acid (GL) or Glycyrrhetic Acid (GA)

In recent years there has been an exponential increase in studies with nanoparticle vectors, mainly focused on the treatment of liver cancer. GL and GA have been highlighted by their specificity for healthy or cancerous liver cells, referring to the ligand group widely used in the vectorization of micelles containing anticancer drugs.

With the discovery of specific hepatic cell receptors for GL and its metabolite (GA) in the 1980s and its combination with nanosystems, a new opportunity was opened up for liver disease therapies, including liver cancer. Therefore, through the union of the nanosystems with GL or GA, it was possible to obtain site-specific delivery systems. New studies with GL- or GA-functionalized nanosystems focusing on liver cancer have been performed in the last 10 years. The nanosystems studied have been liposomes, nanocapsules, solid nanoparticles, and other less used macromolecules, such as dendrimers. Examples of GL- and GA-functionalized nanosystems for liver drug targeting are summarized in Tables S1 and S2 in the Supplementary Material.

Liposomes or solid particles nanosystems containing GA on the surface have been developed by various methods, which generate micelles with sizes between 110 and 200 nm [73–78]. Since for cancer treatment, the ideal size requirement for particles is between 70 and 200 nm, the appropriate size and good dispersion would be favorable to evade the body reticuloendothelial system and accumulate in tumor tissues by EPR (enhanced permeability and retention) effect [79]. In addition to the determination of average particle size performed by dynamic light scattering (DLS) and transmittance electronic microscopy (TEM), other techniques have also been used in order to confirm the synthesis of ligands with different types of nanosystems. In studies with GL and GA, nuclear magnetic resonance (NMR) [80–85] and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) [81–82,86–88] were commonly used.

The conjugation of GL/GA to the nanosystem surface occurs through covalent bonds between the ligand and the wall of the micelles or, in some cases, between the ligand, an intermediate molecule, and the surface material. The incorporation of these ligands may vary depending on the type of nanosystem. To conjugate GL to liposomes, for example, an intermediate molecule is commonly used to bind the ligand to the surface material of the micelles [67]. However, in polymeric nanoparticles, it is observed that in some cases, it is also possible to conjugate GL directly to the nanoparticles without using an intermediate [84]. In the case of other less conventional nanomaterials, such as nanofibers, GL can be directly conjugated to the drug to be vectored [89].

3.1. *Synthesis and Characterization of GL/GA Nanosystems Conjugation*

3.1.1. Liposomes

Tsuji et al. worked with GL functionalized liposomes [72]. First of incorporating GL on liposomes surface, the synthesis of 30-stearyl GL compound (GLOSt) was carried out by ester formation using isoureas. The GLOSt structure was attributed to NMR. In ¹H- and ¹³C-NMR spectral data of GLOSt, the presence of stearyl group was identified, assuming that the diglucuronide moiety of the GL molecule protrudes from the liposomal surface. The mean diameters of control liposomes and GLOSt conjugated liposomes were 54 ± 30 nm and 60 ± 30 nm, respectively [67,72].

In another study with GA, the synthesized compound was 3-succinyl-30-stearyl glycyrrhetic acid (Suc-GAOST), which had an amphiphilic characteristic that facilitated the incorporation, in high proportion, of Suc-GAOST in the liposome lipid layer. The stearyl group was identified by ¹H- and ¹³C-NMR analyses [80].

Chen et al. obtained GA surface-modified oxaliplatin liposomes using the film dispersion method. In this work, the liposomes with GA had a spherical shape with a mean diameter of 93.2 ± 3.1 nm and a zeta potential of -21.3 ± 2.9 mV [90]. Additionally, GAL-GA-LPs (GA liposomes modified with galactosylated derivative ligand) were produced with the film dispersion method, and the results indicated that the particle size decreased when the GA/blank liposomes proportion was optimized [73].

In another study, glycyrrhetic acid was used to obtain the 3-galactosidase-30-stearyl deoxyglycyrrhetic acid liposomes (DGA-O-GAL-LPs) via film dispersion method for the encapsulation of cantharidin (CTD) in liver-targeting liposomes as a potential treatment of hepatocellular carcinoma treatment [91]. ¹³C-NMR spectrum showed that the values of the chemical shifts in the C3 atom were shifted to a lower magnetic field (δ from 79.03 to 90.92), indicating that the esterification process between the deoxyglycyrrhetic acid and acetobromod-galactose proceeded, while the peaks at δ 177.55, 170.53, 170.38, and 169.48 disappeared, proving that the deacetylation was obtained.

Sun et al. developed GA-modified liposomes (GA-LPs), where GA was first covalently bonded to the distal end of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)] (DSPE-PEG) by amide and, second, loaded onto the liposome

surface [92]. GA-LPs were then labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) or coumarin-6 (Cou6) to in vitro study the cellular uptake mechanism and clearance kinetics in the human liver cancer cell line (HepG2), proving the affinity of GA with the hepatocellular carcinoma cells.

3.1.2 Polymeric Nanoparticles

Chitosan/poly(ethylene glycol)-glycyrrhetic acid (CS/PEG-GA) nanoparticles were prepared by the ionic gelation method [78]. PEG-GA moiety influenced the particle size and the zeta potential of the nanoparticles, as evidenced by DLS and TEM analyses. As the PEG-GA concentration increased, the size of the nanoparticles increased, and the zeta potential decreased. However, a suitable concentration of PEG-GA was selected to maintain the CS/PEG-GA nanoparticles size in the 200 nm range to ensure the drug targeting the liver.

The use of another polysaccharide, such as alginate (ALG) or hyaluronic acid (HA), instead of chitosan also generated similar results, where the particle size increased, and the zeta potential decreased as the amount of GA added to the nanoparticles increased [76,93].

The development of nanoparticles containing polysaccharides (ALG, CS, HA, etc.) has been the first choice for several researchers when GL had to be added on the surface of nanosystems for hepatocellular targeted drug delivery [75–77,93–97]. As also reported by Chen [89], the GL ligand has to be oxidized by means of a reaction with sodium periodate (NaIO_4), allowing the formation of aldehyde groups (Figure 4). $^1\text{H-NMR}$ analysis showed the appearance of two peaks at 8.19 and 8.5 ppm, corresponding to aldehyde protons [81–84]. Then, the aldehyde group interacts with the residual amino group on the surface of chitosan nanoparticles.

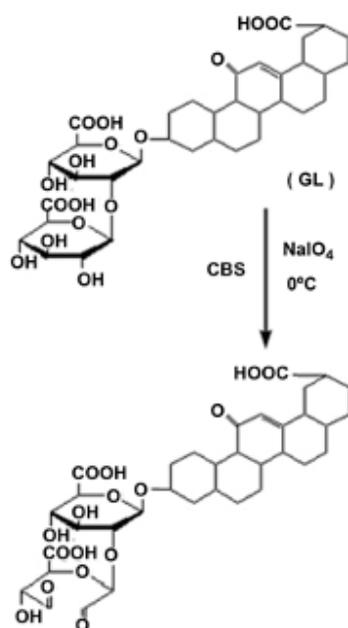


Figure 4. Oxidation reaction in carbonate buffered solution (pH 9.5) and cold sodium periodate solution (50 mM) to obtain the oxidized GL. Adapted with permission from [83], Elsevier, 2012.

In the work performed by Lin and collaborators, the FT-IR analysis of glycyrrhetic acid surface-modified chitosan nanoparticles (GL-CS-NPs) evidenced the appearance of a new strong band at 1579 cm^{-1} and a significant decrease in the intensity of amine group absorption [81]. The new band was attributed to the formation of the C=N bond of the Schiff's base due to the interaction between oxidized GL and CS-NPs. Additionally, the disappearance of the absorption peak of carboxyl group stretching vibration at 1731 cm^{-1} , the appearance of the band at 1408 cm^{-1} (attributed to the COO^- symmetric stretching vibration), and the presence of absorption peak at 1631 cm^{-1} (assigned to the conjugated double bond vibrations in oxidized GL) were observed.

O-carboxymethyl chitosan nanoparticles (CMCS-NPs) were modified by GL [83]. The binding of oxidized-GL to CMCS-NPs was observed with FTIR analysis, being the peak

representing symmetric stretching vibration of carboxyl groups shifted in oxidized-GL from 1351 to 1343 cm^{-1} . Another way of confirming the interaction between the oxidized-GL and the amino groups present on the surface of chitosan nanoparticles was the use of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. Comparing the results from the analysis of chitosan nanoparticles and chitosan nanoparticles with GL surface-modified ones, it was possible to see the appearance of new peaks between 0.8 and 1.2 ppm due to the protons CH_3 , CH_2 , and CH of the steroid portion of GL [82].

The conjugation and insertion of the oxidized GL on the surface of nanoparticles were also observed in serum albumin (bovine or human) nanoparticles, having on their surface reactive amine groups that form the Schiff base through their conjugation with the aldehyde group of oxidized GL [98,99]. The confirmation of the conjugation was performed by FTIR analysis, being easily verified in the spectrum of glycyrrhizic acid-conjugated bovine serum albumin nanoparticles at 1053 cm^{-1} [99], while the characteristic peak of GL and glycyrrhizic acid-conjugated human serum albumin nanoparticles was observed at 1061 cm^{-1} [98].

Additionally, in the case of glycyrrhetic acid-modified chitosan (GA-CS), the conjugation of GA with polysaccharides usually occurs via an ionic bond between the amine of CS and the carboxylic acid group of GA, as described by Cheng and collaborators [86]. FTIR spectrum revealed the disappearance of the GA carboxyl group absorption band (1706 cm^{-1}); this was explained by the formation of the amide bond between the GA carboxyl group and the CS amine.

Another way is the conjugation of GA with CS by a click reaction, by the activation of GA through the formation of the O-acylisourea ester and its stabilization with the addition of N-hydroxysuccinimide, and then favoring the formation of amine in the presence of CS [87]. The conjugation was confirmed by $^1\text{H-NMR}$ and FTIR analyses. In the NMR spectrum, the peak appearance at δ 1.8 ppm was attributed to the tertiary C9 proton of GA molecule, while the FTIR results showed the displacement of amides I and II bands to 1645 cm^{-1} and 1557 cm^{-1} with, in addition, an increase in the amide I peak intensity.

Tian et al. published two articles in 2011 and 2012. The first one had the objective of evaluating whether there was a difference in targeting effectiveness when the GA conjugation was performed on the C3-hydroxyl group or the C30-carboxyl group [100]. The synthesis of PEG-GA from the carboxyl group or the hydroxyl group of GA was performed. In the second article, a drug carrier based on glycyrrhetic acid-modified sulfated chitosan was synthesized from the reaction of the amino group on the skeleton of sulfated chitosan with the carboxyl group in the C30 position of GA [75]. Regardless of which functional group (-hydroxyl group or -carboxyl group) of GA molecule was involved in the reaction, GA-modified nanoparticles had a similar trend to drug targeting to the liver.

ALG and HA nanoparticles functionalized with GA exhibit different formation modes due to the presence of functional groups that render their chemical structures negatively charged [93,96]. Thus, the use of an intermediate substance to allow ionic bonding between the polysaccharide and the vectorizing function component is required. In 2012, Zhang and collaborators published a study with doxorubicin-loaded glycyrrhetic acid-modified alginate nanoparticles (DOX/GA-ALG-NPs), evaluating their bioavailability and antitumor activity in hepatic cells (H22) [93]. The conjugation of glycyrrhetic acid with alginate was obtained by the covalent attachment of GA on the polysaccharide, which gave rise to the formation of amide linkage between the carboxyl group of ALG and the amine group of GA. In a similar way, nanoparticles were prepared using histidine (HIS) to enable the conjugation between HA and GA [97]. A novel copolymer, named GHH, was synthesized using HA modified with GA and HIS. Then, the obtained GHH copolymer was used to prepare doxorubicin loaded nanoparticles (DOX/GHH) for liver-targeted drug delivery and pH-responsive drug release.

Wu et al. developed a hepatoma-targeting mixed micelles composed of hyaluronic acid-glycyrrhetic acid conjugated and hyaluronic acid-L-histidine conjugate (HA-GA/HA-HIS) [101]. The structure of HA, GA, and HA-GA conjugate was confirmed via $^1\text{H-NMR}$. Chemical shifts corresponding to HA were observed at 2.0 and 3.3–4.7 ppm, and the characteristic peaks of GA protons were assigned at the 0.6–1.4 ppm range. The successful introduction of GA into HA was indicated by the presence of characteristic peaks at 0.6–1.4 ppm range. The degree of substitution was determined by comparing the average number of GA molecules attached per 100 HA molecules and was found to be within 3–20 by varying the ratio of GA to HA polymer.

In the study of Wang et al., liver targeting HA-GA succinate (HSG) nanoparticles were synthesized through the hydroxyl group modification of HA with succinate [96]. In order to retain the carboxyl groups of HA, succinic anhydride was selected as a bridge to couple HA

with GA. A carboxyl group was introduced to the C3-hydroxyl group in GA using succinic anhydride; then, the carboxyl group of succinate-GA was covalently coupled with the hydroxyl group of HA. The characteristic peaks emerged in $^1\text{H-NMR}$ and FT-IR analyses confirming the synthesis of HSG co-polymer and suggesting the GA-HA conjugation. $^1\text{H-NMR}$ spectrum showed GA peaks at 0.8–1.7 ppm in the HSG spectrum, corresponding to the methyl and methylene groups. In the FTIR spectrum of HSG, new peak appeared at 1729 cm^{-1} due to the formation of the ester carbonyl group, while the intensity of the band at $2930\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$, attributed to the carbon-to-hydrogen stretching vibrations of methyl and methylene groups of GA moiety in HSG co-polymer, increased.

Another possible way of promoting HA-GA conjugation was achieved through the use of a linker [102]. A liver-targeted DOX and Bcl-2 siRNA (short interfering RNA)-loaded nanoparticles, composed of 1,2-distearoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol-polyetherimide and glycyrrhetic acid-modified hyaluronic acid (siRNA/DOX/GH-DPP-NPs), were prepared for drug combination therapy (Figure 5). The average particle size of siRNA/DOX/GH-DPP-NPs ($185.4 \pm 6.4\text{ nm}$) was significantly bigger than that of siRNA/DOX/DPP NPs ($157.2 \pm 5.7\text{ nm}$), while the zeta potential in siRNA/DOX/GH-DPP-NPs ($-2.64 \pm 1.73\text{ mV}$) was decreased for approximately 15 mV compared to siRNA/DOX/DPP NPs. These results were due to the coverage of the nanoparticles with GA-HA conjugate, which generates particles of bigger size and lower zeta potential.

A study conducted by Cao et al. aimed to synthesize two hydrophobic targeting ligands modified for targeted DNA delivery to hepatocellular carcinoma [88]. Varied amounts of GA or GL were substituted to polyethyleneimine (PEI). Even the direct conjugation of PEI with GA or GL via the N-acylation pathway could improve its interaction with liver carcinoma and the gene transfection efficiency. The conjugation was confirmed by FTIR and $^1\text{H-NMR}$ analyses: the FTIR band of $-\text{CO-NH}-$ at 1649.5 cm^{-1} for GA or 1652.13 cm^{-1} for GL and the shifts at 5.5, 3.4 - 2.0 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 2.0-0.43 ppm for GA, and 7.6 and 6.7 ppm (imidazole ring) for GL indicated the successful synthesis of PEI-GA and PEI-GL.

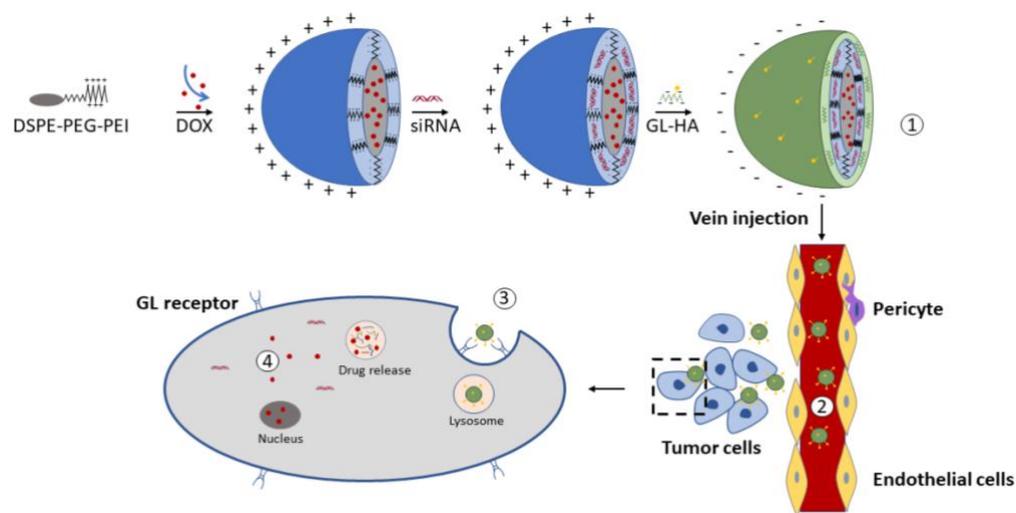


Figure 5. Schematic representation of (1) siRNA/DOX/GH-DPP-NPs preparation, (2) distribution of drugs vectorized to the liver by the blood cycle, (3) cell uptake, and (4) Bcl-2 siRNA and DOX release ph-triggered. Desaturated from [102], Frontiers, 2019.

3.1.3 Other Nanosystems

Some studies with unconventional nanosystems have also been performed. Liu et al. developed a polyamidoamine dendrimer (PAMAM) with GA based on the fact that the surface functional groups of graphene oxide (GO) have significant effects on the performance of GO-based gene delivery vector [74]. The amounts of free amino groups in the PAMAM with and without GA (GO-PAMAM-GA or GO-PAMAM, respectively) were determined by ninhydrin assays. In contrast to GO-PAMAM, the number of free amino groups in GO-PAMAM-GA decreased as the Ga content increased, demonstrating the functionalization of GO with PAMAM and GA molecules.

Chopdey et al. studied GL-conjugated polypropylene imine dendrimer (GL-PPI) and GL-conjugated multi-walled carbon nanotubes (GL-MWCNTs) as models of site-specific hepatic carriers for the delivery of DOX [94]. The conjugation was obtained by oxidation of GL to allow coupling of its carboxy group with the terminal NH₂ group of PPI dendrimer or MWCNTs nanotubes.

Another example is represented by the preparation of a GA modified curcumin (CUR) supramolecular hydrogel, showing an increase in cellular uptake and greater inhibitory effect (smaller IC₅₀ value) on HepG2 cells than the hydrogel without GA [82]. These results suggested the vectorizing effect of GA on liver cancer cells. An alternative type of micellar system for selective delivery of DOX to liver cancer cells is represented by GA-polymeric prodrug as a carrier for the encapsulation of DOX in self-assembled micelles (DOX/PEG-Fmoc-GA micelles) [103]. The coupling of GA to the unprotected amino groups of PEG-Fmoc-Lys, confirmed by NMR spectroscopy, led to the formation of the carrier that, through the thin film method, encapsulated DOX inside the self-assembled micelles, showing in vitro and in vivo antitumor effect.

The GA was also used for enhancing the cytotoxicity of allicin on hepatocellular cancer cell line HepG2 [104]. Allicin-loaded gelatin nanoparticles were conjugated to GA through amide bonds between the carboxyl group of GA and the primary amines of gelatin amino acids. The conjugation was confirmed by ¹H-NMR spectroscopy, in which the disappearance of the OH carboxylic peak of GA (δ 11 ppm) was observed, confirming the link between the OH carboxylic of GA and the gelatin amino group.

3.2 Evaluation of Liver Drug Targeting

After the discovery of the affinity of GL for the liver [71] and the existence of specific GL and GA receptors [66,105] in the liver, the possibility of nanosystem vectors for liver-targeting was found. The efficiency of liver vectorization when GL or GA was added to the carrier was verified by in vitro and in vivo studies. The in vitro experiments involving nanocarriers and different types of cells were carried out to demonstrate that the presence of GL or GA increases the cellular uptake of the formulations.

In 1991 and 1994, the first studies demonstrating the vectorization of nanosystems (liposomes) to the liver by the introduction of GL molecules on the surface of the liposomes were published [66,72]. In these works, in vivo studies (male albino Wistar rats) showed that about 42% of the GLOSt-SUV (30-stearyl glycyrrhizic acid small unilamellar liposomes) injected dose was captured by the liver, presenting a 4-fold higher uptake than the control SUV (without GL); in vitro experiments (hepatocytes isolated from male albino Wistar rats) evidenced that the GLOSt-SUV uptake was 10-fold higher than the control SUV.

Nanoparticles with serum albumin (bovine or human) in the structure for transport and delivery of drugs also presented significant results in the vectorization to liver through the presence of GL on their surface. Mao et al. developed GL surface-modified calcein-loaded bovine serum albumin nanoparticles (CAL-BSA-GL-NPs) and tested their uptake in hepatocytes isolated from the normal liver of male Wistar rats [106]. It has been demonstrated that the modified nanoparticles with GL showed a 4-fold higher uptake than those unmodified with GL. In another study where bovine serum albumin was used, the human hepatocarcinoma cell line was incubated with GL nanoparticles labeled with isothiocyanate of fluorescein [99]. A higher fluorescence intensity of these formulations was observed compared to the same formulations without GL, thus demonstrating an increased uptake of GL-conjugated nanoparticles. Cell proliferation studies also showed high inhibitory rates of GL-conjugated nanoparticles over the unconjugated nanoparticles and the free drug (hydroxycamptothecin).

In a study in which human serum albumin was used, the lethality test performed by MTT assay on HepG2 showed that nanoparticles containing GL had a higher activity compared to the free drug (resveratrol (RES)) [85]. In vivo biodistribution tests in which the GL nanoparticles labeled with Cy5 NIR fluorophore were given to H22 tumor-bearing mice confirmed these results. Through the near-infrared fluorescence imaging technique, a significant drug accumulation in the liver of H22 tumor-bearing mice was observed after 72 h.

Flow cytometry and laser confocal microscopy techniques were used to detect the interaction of glycyrrhizic acid surface-modified chitosan nanoparticles (GL-CS-NPs), rhodamine B isothiocyanate labeled, with hepatocytes (parenchymal cells) and non-parenchymal liver cells [75]. The results showed that hepatocytes captured 4.9-fold more than non-parenchymal liver cells. A different result was observed for CS-NPs, which presented equal uptake to hepatocytes and non-parenchymal liver cells, reaffirming the selective uptake of GL-

CS-NPs in hepatocytes. Another *in vivo* study demonstrated that the biodistribution of adriamycin-loaded GL-conjugated *N*-caproyl chitosan nanoparticles (ADR/GL-CCS-NPs) after injection in mice presented the drug accumulation mainly in the liver, spleen, and lungs [82]. ADR/GL-CCS-NPs obtained an uptake 1.6-fold higher than ADR/CCS-NPs in the liver and 2.1-fold higher in hepatocytes. In the case of GL-modified carboxymethyl chitosan nanoparticles loaded with paclitaxel (PTX/GL-CMC-NPs), the *in vitro* cytotoxicity study on human hepatocarcinoma cell line exhibited IC₅₀ values of 2.7–3.2, 8.1, and 13.5 µg/mL for PTX/GL-CMC-NPs, PTX/CMC-NPs, and PTX, respectively, after 72 h of incubation [83]. The GL-conjugated nanoparticles were then more efficient on anti-proliferation; in addition, the cell uptake was 10-fold higher for PXT/GL-CMC-NPs compared to PXT/CMC-NPs. This trend was confirmed by the *in vivo* tests, in which the tumor inhibition rates were 87.5, 64.0, and 34.5% for PTX/GL-CMC-NPs, PTX/CMC-NPs, and PTX, respectively. In the work of El-Marakby, the effect of an injected dose in mice of valerate-conjugated chitosan, GL-decorated or undecorated, was evaluated [84]. Radiolabeled nanoparticles accumulated in the liver had a value of around 13 % for GL-decorated nanoparticles and 4% for those non decorated, confirming the uptake increase in GL-decorated nanoparticles.

Another study, using GL for decoration, was performed with dendrimers and carbon nanotubes of multiple walls with the aim to obtain nanosystems for vectorization and delivery of drugs to the liver. In the hemolytic toxicity studies performed by Chopdey et al. with GL-PPI and GL-MWCNTs, both loaded with DOX, a significant reduction of DOX toxicity was obtained [98].

With regard to GA, in some cases, the amount of the compound detected inside the cells was two times higher when GA was present in the nanocarrier [75,77,90,101,107]. Experiments performed with cells that don't present receptors for GA, such as MCF-7 and HUVEC (human umbilical vein endothelial), did not demonstrate any enhance in the number of nanocarriers into the cells when GA was present in the formulation, proving that the receptors of GA enhance the cellular intake (Figure 6) [77,101]. The introduction of GA to the micelles significantly increased the affinity of the formulations for HepG2 cells. Yang et al. also evidenced the synergistic effect of DOX and GA, loaded in polymeric micelle carrier, in inhibiting the proliferation of HepG2 cells [103].

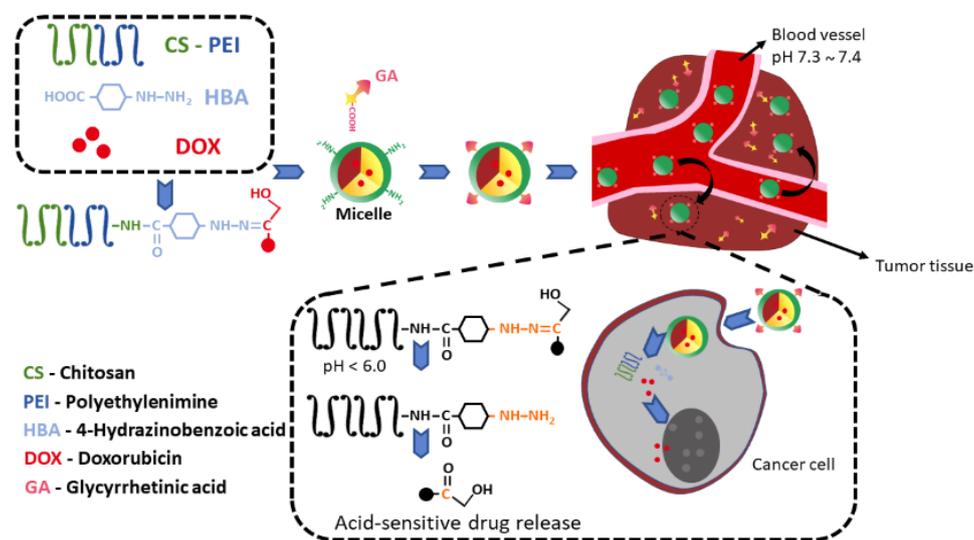


Figure 6. Schematic representation of acid-sensitive micelle with controlled drug release. The micelles decorated with GA would be easily accumulated in the tumor tissue by the EPR effect and internalized in the cancer cells. Adapted with permission from [77], Elsevier, 2018.

The study with Hep3B hepatoma cell line and the human MDA-MB-231 breast cell line (used as a negative control) showed that the presence of GA into the micelles enhanced the uptake into Hep3B cells [108]. In the study carried out by Yang et al., DOX/PEG-Fmoc-GA micelles were more effective in inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis due to the significant intracellular uptake of DOX by HepG2 cells when compared to a DOX solution [103]. Moreover, biodistribution studies with mice showed that the micelles were preferentially

accumulated at the tumor site, demonstrating that the modification of the micelles with GA increased their affinity to liver cancer cells and enhanced their selective uptake by hepatocellular carcinoma cells.

Another example is represented by the synthesized lactobionic acid (LA)/lactoferrin (LF) or GA/LF conjugates used to coat sorafenib and quercetin (QRC) shell-oily core nanocapsules (NCs) to enhance their cellular internalization via binding to asialoglycoprotein or GA receptors, respectively, on liver cancer cells [109]. The dual tumor-targeted NCs for co-drug delivery were *in vitro* and *in vivo* tested and compared with the free drugs. The *in vitro* cytotoxicity and cellular uptake studies on HepG2 liver cancer cells showed that LA/LF-NCs and GA/LF-NCs exhibited higher cytotoxic activity compared to the free drugs co-delivery. The *in vivo* antitumor efficacy of LA/LF-NCs and GA/LF-NCs in HCC-bearing mice reduced tumor proliferation due to their enhanced cellular uptake through LF-mediated endocytosis.

The ability to enhance the liver targeting was also noticed by Chen [73]. *In vitro* study with HepG2 cells showed that the amount of intracellular GA in GA-LPs and GAL-GA-LPs was greater than GA solution (GA-S). Zhu et al. developed a liposome of CTD, a potent drug against hepatocellular carcinoma, with a GA on the surface [79]. The pharmacokinetic and biodistribution experiments on Sprague–Dawley rats revealed that the presence of the GA in the liposome surface increased more than twice the concentration of the drug in the liver compared to the liposome without GA in the surface.

Another study performed by Tian and collaborators compared the uptake ratio of GA-liposomes in HepG2 cells and in human fetal hepatocyte (L-02) cells [110]. The liposomes of wogonin (WG), containing glycyrrhizic acid on the surface, presented a 2.5-fold higher cellular uptake in HepG2, displaying that the GA-modification of liposomes can distinguish hepatic carcinoma cells from normal hepatocytes. These results may indicate that more GA-specific binding sites are present on HepG2 cells than on L02 cells, resulting in increased endocytosis and WG uptake.

In the study of Zhou and collaborators, the liver-targeted GA-CTD liposome showed greater cytotoxicity and increased inhibition of HepG2 cell migration compared to the unmodified liposomes, which does not contain GA [91]. In addition, tissue distribution, efficiency relative targeting, uptake rate, and peak concentration ratio of CTD from the liver-targeted liposomes were higher in comparison to that of the unmodified liposome, concluding that the liposome modified with GA represents a promising nanocarrier for the drug targeted delivery to the liver.

Flow cytometry analysis was performed to compare endocytosis of nanoparticles containing DOX and recombinant human serum albumin (rHSA) in cells [111]. Targeted NPs containing GA showed higher binding to HepG2 cells than untargeted NPs. The mean fluorescence intensity of HepG2 cells treated with the DOX/GA-rHSA-NPs was higher than those incubated with nanoparticles not containing GA. Moreover, the receptor blocking with GA significantly reduced the fluorescence intensity of DOX/GA-rHSA-NPs. This result directly confirms that the cellular uptake of nanoparticles can be enhanced by attaching GA to their surface. Additionally, there was no difference in the fluorescence intensities between DOX/GA-rHSA-NPs and the DOX/rHSA-NPs for HeLa cells, i.e., GA receptor-negative cells. It was then concluded that the GA-targeted-NPs had a higher affinity to HepG2 than the untargeted NPs.

Mao and collaborators developed a calcein-loaded liposome surface modified with GA using the synthesized targeted molecule Suc-GAOST and a calcein liposome without GA [80]. The cellular uptake of the Ga surface-modified liposome in the rat hepatocytes was 3.3 times higher when compared to the liposome without GA. Wang et al. studied nanocarriers with GA, PEI, and DNA to co-deliver drug and gene therapy, demonstrating that the enhanced uptake into HepG2 cells occurs through GA mediation [112]. This effect was also confirmed in a study in which the presence of GL or GA, conjugated with PEI, caused significant increases in the efficiency of gene transfection and superior selectivity for HepG2 cells [88].

To improve the drug bioavailability of QRC, Du et al. developed different drug-loaded self-aggregates of O-carboxymethyl chitosan-cholic acid conjugates with or without the presence of GA during the fabrication process of the nanocarrier, concluding that the presence of the GA enhanced the liver targeting [113].

Nanosystems decorated with GA also demonstrated that the presence of this ligand in the surface was able to target the nanocarriers to the liver, showing a great ability to permeate cancer cells and presenting a significant retention value at the site of action, thus confirming the great potential of GA as a vector of particles for the liver [90,93,108,113–118]. In addition to the studies in which the surface of chitosan nanoparticles was decorated with GA alone, other

researchers decorated the surface of the nanoparticles with two ligands (GA and LA) able to increase the intracellular uptake of DOX [87]. Moreover, the serum biomarkers test (albumin, creatinine, urea, alpha-fetoprotein, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase), together with the histopathological analysis of liver, kidney, and heart tissues, confirmed the safety of nanosystems with the two ligands compared to the conventional DOX.

In this context, several studies have been carried out with the intention of proving that the GA is capable of increasing the targeting of nanosystems to the liver compared to other organs of the body [86,108,111,119–121].

The amount of GA in the nanoparticles can be capable of generating an efficient cellular uptake, as demonstrated in a study conducted by Chu [122]. GA-modified curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (CUR/GA-PEG-NLC) with different GA ratios (5%, 10%, and 15% *w/w*) were prepared to investigate the influence of GA on the cellular uptake and cytotoxicity against HepG2 cells. CUR/GA10%-PEG-NLC showed higher cellular uptake than the other two formulations. MTT assay evidenced higher cellular uptake and cytotoxicity of CUR/GA-PEG-NLC against HepG2 cells compared to the free drug.

In another study, a nanostructured lipid carrier was used to prepare liposomes (CUR-CA4P/GA-LPs) for liver-targeted co-delivery of curcumin and combretastatin A4 phosphate (CA4P), exploiting the apoptotic activity of curcumin with the antitumor angiogenic property of combretastatin [123]. The *in vitro* study on human hepatocellular carcinoma cell line (BEL-7402) showed the cellular uptake of CUR-CA4P/GA-LPs and an increased cytotoxicity activity of the two drugs when in combination in the liposomal structure. *In vivo* antitumor efficacy of CUR-CA4P/GA-LPs in liver tumor, BALB7c male mice model was proven by higher tumor growth-inhibition, in addition to reducing systemic toxicity compared to free drugs. Moreover, the stronger tumor inhibition efficiency of CUR-CA4P/GA-LPs than that of CUR-CA4P/LPs would confirm the uptake of the GA-functionalized liposomes in the tumor cells through the GA-receptor mediated endocytosis.

In addition to increasing the absorption of drugs in healthy or cancerous liver cells, other studies showed the ability of GA to raise gene transfection [74,124]. Liu et al. evaluated the gene delivery capacity of the nanosystem constituted by GO with PAMAM and GA surface modification [74]. The obtained GO-PAMAM-GA hybrid facilitated the pEGFP-N1 gene entering into the human hepatocarcinoma SMMC7721 cells; moreover, the efficiency of the hybrid to target the gene transfection into the SMMC-7721 cells rose with the increase in the GA amount.

Cytotoxicity tests on HepG2, Hep3B, L-02, HUVEC, and HELF (human fibroblast) cells were performed with antitumor drug- or gene-loaded GA micelles [77,95,114,115, 124,125]. The micelles exhibited high lethality to HepG2 and Hep3B cells with enhanced inhibition on their proliferation via receptor-mediated endocytosis while presented low cytotoxicity to HUVEC, HELF, and L-02 cells. In confirmation of this, the cytotoxicity tests carried out with PTX/GA-g-HA-NPs (paclitaxel-loaded glycyrrhetic acid-graft-hyaluronic acid nanoparticles) using HepG2 and B16F10 cells, a type of mouse melanoma cells, demonstrated a difference of drug concentration inside the two types of cell lines (HepG2 and B16F10) [114]. The higher cytotoxicity of PTX/GA-g-HA-NPs in HepG2 cells compared to B16F10 cells was due to the capacity of HepG2 cells to over-express both HA and GA receptors. Another example is represented by the cytotoxicity assessment of allicin-loaded gelatin nanoparticles GA-decorated in HepG2 cells that showed from 2- to 4-fold increase in allicin cytotoxicity compared to free drug, demonstrating that the conjugation of nanoparticles with GA was successful in vectoring the drug for hepatocellular carcinoma [104].

Histological evaluations revealed the capacity of DOX/GA-ALG-NPs to induce the death of cancer cells without affecting the surrounding healthy cells, showing a higher specificity of nanoparticles when compared to free DOX [93].

In another study, the targeting ability of GHH nanoparticles was evaluated with *in vitro* cellular uptake study by fluorescence microscopy, showing that the nanocarriers were internalized into the HepG2 cells [97]. The MTT test showed that the DOX/GHH nanoparticles exhibited a dose-dependent antitumor effect.

The viability of the cells A549 and HepG2 was also evaluated by MTT test after exposure with DOX nanoparticles and compared with free drug and GA [102, 107]. The results suggested that the formulations present different cytotoxicity against HepG2 cells and A549 cells because of the different expressed levels of GA-receptor on these two different tumor cells.

The effect of GA-CS 5-fluorouracil nanoparticles (GA-CS/5-FU-NPs) on drug-resistant cells was investigated on the SMMC-7721 cell line, moderately resistant to 5-FU [86]. The results of this work demonstrated that GA-CS/5-FU-NPs significantly inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells. Cytotoxicity in the GA-CS/5-FU-NPs group was significantly higher than in the 5-FU group. GA-CS nanoparticles enter cells by binding to GA receptors on the membrane, making the nanoparticles effective also against drug-resistant cells.

In vivo studies performed by Wu et al. using female BALB/c mice showed the efficient and rapid ability of the micelles with GA to target doxorubicin to the liver [101]. The in vivo pharmacokinetic studies with Sprague–Dawley rats using micelles of silybin with and without GA and silybin suspension showed that the micelles with GA achieved significant drug concentration in the liver [76]. Zhang et al. demonstrated that the micelles with GA exhibited significantly higher accumulation in the liver than in any other organs [108]. This indicates that GA modified micelles have higher retention time in vivo and exhibit liver-targeting property.

Du et al. investigated the behavior of QRC-loaded GA-decorated chitosan self-aggregates after IV administration in Wistar rats [113]. The presence of GA in the formulation provided the ability of the self-aggregates to target the rat liver. The mean residence time of the formulation containing GA was approximately eight times higher compared to the free drug, indicating a longer in vivo circulation time.

In vivo study on Kunming mice of GA-modified hyaluronic acid nanoparticles for intracellular delivery of DOX evidenced the preferential accumulation of the drug in the liver and hepatoma tissues [115]. Another in vivo study performed on Kunming mice with GA nanoparticles demonstrated two times higher drug accumulation in the liver than the GA-free nanoparticles: the different results were attributed to the presence of GA receptors on hepatocytes [77]. Chen et al. performed an in vivo test with Kunming mice (male and female) demonstrating that after the intravenous administration of GA-S, GA-LP, and GAL-GA-LP, the concentration of GA in the liver was 2.5 times higher in the GAL-GA-LP mice group compared to GA-LP mice group, while the GA plasma concentration and tissue distribution from GA-S declined very fast [73]. The results evidenced the increase in liver targeting of the liposomes when GA was combined with GAL.

Tian et al. worked with H22 tumor-bearing mice analyzing the bio-distribution and antitumor therapeutic effects of siRNA/DOX/GH-DPP-NPs, concluding that the DOX and Bcl-2 siRNA combined therapy in the presence of GA improved antitumor efficacy [9]. GA-receptor-mediated internalization significantly increased the cellular uptake efficiency, and the GA-nanoparticles could induce more cellular apoptosis.

Biodistribution studies of DOX nanoparticles in Balb/c were assessed by single-photon emission computed tomography [78]. The results demonstrated a 19 folds improvement in cell uptake of CS/PEG-GA nanoparticles. In a biodistribution study, Tian et al. identified that GA-WG-LPs could be accumulated rapidly in the tumor, liver, and spleen just 15 min after injection [110]. The uptake of these liposomes in the tumor was the highest among all of the excised tissues and was also much higher than the uptake of the free WG and nanoparticles without GA (WG-LPs). In the same work, the tumor inhibitory ratios of WG-LPs and GA-WG-LPs were 31.34% and 53.73%, respectively. The better in vivo antitumor results of the GA-WG-LPs occurred due to a larger cellular uptake via the GA-specific binding sites on the surface of hepatic cells, which improved liver targeting. GA-WG-LPs can actively and specifically target the liver, resulting in decreased tumor weight. An improvement in biodistribution, tumor accumulation, and therapeutic efficacy due to the increased receptor-mediated uptake of liposomes was observed in liver cells.

Wang et al. performed a study with Kunming mice and BALB/c nude mice. The results showed that the nanocarriers containing GA presented longer blood circulation and a significantly high accumulation in liver and liver tumors [96].

The mouse MDA-MB-231 xenograft model was used for the evaluation of in vivo anticancer activity of glycyrrhetic acid-graft-hyaluronic acid nanoparticles considering the tumor growth and side effects on other tissues because of the enhanced cellular uptake of HGA nanoparticles in the cancer cells [114]. The study permitted to conclude that PTX/GA-g-HA-NPs showed high stability and good biocompatibility when compared to the free drug, inducing higher apoptosis of the cancer cells without unwanted side effects.

In summary, all the studies showed that the formulations including GL or GA can be successfully used for hepatocyte targeting, enhancing the activity of the drug in the

nanosystems but also reducing the adverse effects of the anticancer drugs used in the treatment of hepatic cancer.

4. Conclusions

The search for new drugs has always been the major goal in the medical and pharmaceutical field due to the variate number of existing and newly discovered diseases. Plants have always been and are a great source of new molecules, which are studied and tested for new substances with pharmacological activities. However, some well-known molecules, such as GL and its metabolite GA, obtained from the *Glycyrrhiza glabra* plant, popularly known as licorice, are extensively investigated, seeking new pharmacological activities. These investigations sometimes lead to very significant discoveries, such as specific receptors that explain the greater safety and efficacy of some drugs in certain organs and the possibility of their use in combination with other drugs or delivery systems. As an example, the in vivo studies showed higher biodistribution of GL and GA in the liver, spleen, and lung, with the highest concentration in the liver. In vitro studies in the presence of specific receptors in the hepatocytes supported these results.

Based on the existence of specific receptors for GL and GA, which promote their internalization in liver cells, we presented in this review many recent published works both in vitro and in vivo. The decoration of the nanosystems surface (liposomes and various types of nanoparticles) with the objective to promote the vectorization of these nanosystems opens the delivery of antitumor drugs to the liver and liver tumor cells. Nanosystems decorated with GL or GA by different techniques, dependent on the constituents used in their manufacture, exhibited great success.

Through the use of oxidized glycyrrhizic acid, it was possible to decorate chitosan nanoparticles, serum albumin (human or bovine), dendrimer, and multi-walled carbon nanotubes by conjugation with the terminal -NH₂ group. For liposomes, it was necessary to synthesize the compound GLOSt for GL and for GA, the compound Suc-GAOST.

The vector capability of the GL- or GA-decorated nanosystems was demonstrated by the results of biodistribution or in vitro uptake compared to non-conjugated nanosystems. For example, in vivo studies for glycyrrhizic acid showed about 42% of intravenously injected dose retention of conjugated liposomes and 51% liver accumulation for glycyrrhetic acid nanoparticles compared to 20% for unconjugated nanoparticles. For in vitro tests, cell uptakes were from 1.5 to 10 times higher than non-GL- or GA-conjugated nanosystems, with uptake percentage dependent on the nanosystem type. The studies presented also demonstrated that drug-free GL- or GA-conjugated nanosystems are safe and non-toxic in in vitro and in vivo studies. With regard to biological activity, in the GL- or GA-conjugated nanosystems, the drugs carried out the same therapeutic activity also at a low dosage and in some cases reduced known side effects for the free drug.

Taking into consideration the information described in this review, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid, due to receptors in the liver, have a great potential for the vectorization and delivery of nano-encapsulated antitumor drugs for the treatment of liver cancer, in addition to presenting low toxicity and high activity at low dosage.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13111792/s1>, Table S1: Glycyrrhizic acid (GL) functionalized nanosystems for liver drug targeting, Table S2: Glycyrrhetic acid (GA) functionalized nanosystems for liver drug targeting.

Author Contributions: Conceptualization, A.R., L.A.S., A.P.R.B. and G.R.V.; review analysis and interpretation A.R., L.A.S., A.P.R.B., E.Q. and G.R.V.; writing—original draft preparation, A.R., L.A.S., A.P.R.B., E.Q. and G.R.V.; writing—review and editing, A.R., E.Q., A.P.R.B., G.R.V. and J.O.C.S.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This review received no external funding. **Data Availability Statement:** Not Applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The Plumestars had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript.

ACE2: angiotensin-converting enzyme 2; ADR: adriamycin; ALG: alginate; ALI: acute lung injury; 11 β -HSD2: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme; BSA: bovine serum albumin; CA4P: combretastatin A4 phosphate; CAL: calcein; CAL-BSA-GL-NPs: glycyrrhizic acid surface-modified calcein-loaded bovine serum albumin nanoparticles; ADR/GL-CCS-NPs: adriamycin-loaded glycyrrhizic acid-conjugated *N*-caproyl chitosan nanoparticles; CMCS-NPs: O-carboxymethyl chitosan nanoparticles; CTD: cantharidin; CS: chitosan; CS/PEG-GA: chitosan/poly(ethylene glycol) glycyrrhetinic acid nanoparticles; Cou6: coumarin 6; CUR: curcumin; CUR/GA-ALB-NPs: curcumin-loaded glycyrrhetinic acid surface functionalized albumin nanoparticles; CUR/GA-PEG-NLC: curcumin-loaded glycyrrhetinic acid modified nanostructured lipid carrier; CUR-CA4P/GA-LPs: curcumin-combretastatin A4 phosphate glycyrrhetinic acid liposomes; CUR-CA4P/LPs: curcumin-combretastatin A4 phosphate liposomes; DGA-O-GAL-LPs: 3-galactosidase-30-stearyl deoxyglycyrrhetinic acid liposomes; DLS: dynamic light scattering; DOX: doxorubicin; DOX/GA-ALG-NPs: doxorubicin-loaded glycyrrhetinic acid-modified alginate nanoparticles; DOX/GHH: doxorubicin-loaded GHH nanoparticles; DOX/GA-rHSA-NPs: doxorubicin-loaded glycyrrhetinic acid modified recombinant human serum albumin nanoparticles; DOX/PEG-Fmoc-GA micelles: doxorubicin loaded glycyrrhetinic acid-conjugated polymeric prodrug micelles; DSPE-PEG: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol) - 2000]; EPR: enhanced permeability and retention; FER: ferulic acid; FITC: fluorescein isothiocyanate; 5-FU: 5-fluorouracil; FTIR: Fourier transformed infrared spectroscopy; GA: glycyrrhetinic acid; GA-CS: glycyrrhetinic acid-modified chitosan; GA-CS/CY-PCL: glycyrrhetinic acid-modified chitosan-cystamine-poly(ϵ -caprolactone) copolymer; GA-CS/5-FU-NPs: 5-fluorouracil-loaded glycyrrhetinic acid-modified chitosan nanoparticles; GA-LPs: glycyrrhetinic acid-modified liposomes; GA-OX-LPs: oxaliplatin-loaded glycyrrhetinic acid liposomes; GA-S: glycyrrhetinic acid solution; GA-WG-LPs: wogonin-loaded glycyrrhetinic acid liposomes; GAL: galactosylated derivative ligand; GAL-GA-LPs: glycyrrhetinic acid liposomes modified with galactosylated derivative ligand; GHH: glycyrrhetinic acid-hyaluronic acid-histidine copolymer; GL: glycyrrhizic acid; GL-BSA-HCPT-NPs: 10-hydroxycamptothecin-loaded glycyrrhizic acid-conjugated bovine serum albumin nanoparticles; GL-CS-NPs: glycyrrhizic acid surface modified chitosan nanoparticles; GL-HSA-RES-NPs: resveratrol-loaded glycyrrhizic acid-conjugated human serum albumin nanoparticles; GL-MWCNTs: glycyrrhizin conjugated with multi-walled carbon nanotubes; GL-PPI: glycyrrhizic acid-conjugated polypropylene imine dendrimer; GA: glycyrrhetinic acid; GLOSt: 30-stearyl glycyrrhizin; GLOSt-SUV: 30-stearyl glycyrrhizin small unilamellar liposomes; GO: graphene oxide; GO-PAMAM-GA: polyamidoamine dendrimer and glycyrrhetinic acid functionalized on the dendrimer surface by graphene oxid; HA: hyaluronic acid; HA-GA/HA-HIS: glycyrrhetinic acid conjugated with hyaluronic/glycyrrhetinic acid acid-L-histidine; HCC: hepatocellular carcinoma; HCPT: 10-hydroxycamptothecin; HGA: glycyrrhetinic acid-graft-hyaluronic acid; HepG2: human liver cancer cell line; HIS: histidine; HMGB1: high mobility group box 1; HUVEC: human umbilical vein endothelial; IFN: interferon; IL: interleukin; INL: inulin; LA: lactobionic acid; LF: lactoferrin; LPs: liposomes; MR: mineralocorticoid receptors; MyD88: myeloid differentiation factor 88; NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NK: natural killer cells; NMR: nuclear magnetic resonance; OX: oxliplatin; PAMAM: polyamidoamine dendrimer; PEG: polyethylene glycol; PEG-GA: poly(ethylene glycol)-glycyrrhetinic acid; PEI: polyethyleneimine; PTX: paclitaxel; PTX/GA-g-HA-NPs: paclitaxel-loaded glycyrrhetinic acid-graft-hyaluronic acid nanoparticles; PTX/GL-CMC-NPs: paclitaxel-loaded glycyrrhizic acid modified carboxymethyl chitosan nanoparticles; QRC: quercetin; RAGE: receptor of advanced glycation end products; RES: resveratrol; rHSA: recombinant human serum albumin; ROS: reactive oxygen species; SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SIL: silybin; SCS: sulfated chitosan; siRNA: short interfering RNA; siRNA/DOX/GH-DPP-NPs: 2-distearoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol-polyetherimide and glycyrrhetinic acid-modified hyaluronic acid; STAT: signal transducer and activator of transcription; Suc-GAOST: 3-Succinyl-30-stearyl glycyrrhetinic acid; TEM: transmission electron microscopy; TLR: toll-like receptor; Tmprss2: cofactor transmembrane serine protease type 2; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; VCS: valeric chitosan; WG: wogonin.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424.
2. Torre, L.A.; Siegel, R.L.; Ward, E.M.; Jemal, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2016**, *25*, 16–27.
3. Alsaleh, M.; Leftley, Z.; Barbera, T.A.; Sithithaworn, P.; Khuntikeo, N.; Loilome, W.; Yongvanit, P.; Cox, I.J.; Chamodol, N.; Syms, R.R.; et al. Cholangiocarcinoma: A guide for the nonspecialist. *Int. J. Gen. Med.* **2019**, *12*, 13–23.
4. Ghouri, Y.A.; Mian, I.; Rowe, J.H. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J. Carcinog.* **2017**, *16*, 1.
5. Heimbach, J.K.; Kulik, L.M.; Finn, R.S.; Surlin, C.B.; Abecassis, M.M.; Roberts, L.R.; Zhu, A.X.; Murad, M.H.; Marrero, J.A. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2018**, *67*, 358–380.
6. Bosetti, C.; Turati, F.; La Vecchia, C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2014**, *28*, 753–770.
7. Valery, P.C.; Laversanne, M.; Clark, P.J.; Petrick, J.L.; McGlynn, K.A.; Bray, F. Projections of primary liver cancer to 2030 in 30 countries worldwide. *Hepatology* **2018**, *67*, 600–611.
8. Chen, Z.; Xie, H.; Hu, M.; Huang, T.; Hu, Y.; Sang, N.; Zhao, Y. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, *10*, 2993–3036.
9. Zhang, X.; Ng, H.L.H.; Lu, A.; Lin, C.; Zhou, L.; Lin, G.; Zhang, Y.; Yang, Z.; Zhang, H. Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: Current and future. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12*, 853–869.
10. Cai, Y.; Xu, Y.; Chan, H.F.; Fang, X.; He, C.; Chen, M. Glycyrrhetic acid mediated drug delivery carriers for hepatocellular carcinoma therapy. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 699–709.
11. Su, X.; Wu, L.; Hu, M.; Dong, W.; Xu, M.; Zhang, P. Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 670–678.
12. Xiong, X.; Gu, L.; Wang, Y.; Luo, Y.; Zang, H.; Lee, J.; Krams, S.; Zhu, S.; Zhao, H. Glycyrrhizin protects against focal cerebral ischemia via inhibition of T cell activity and HMGB1-mediated mechanisms. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 241.
13. Li, J.; Xu, H.; Ke, X.; Tian, J. The anti-tumor performance of docetaxel liposomes surface-modified with glycyrrhetic acid. *J. Drug Target.* **2012**, *20*, 467–473.
14. Li, J.-Y.; Cao, H.-Y.; Liu, P.; Cheng, G.-H.; Sun, M.-Y. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: Literature review. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 872139.
15. EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific opinion on the safety and efficacy of glycyrrhetic acid ammoniated (chemical group 30, miscellaneous substances) when used as a flavouring for all animal species. *EFSA J.* **2015**, *13*, 3971.
16. Van Rossum, T.G.; Vulto, A.G.; Hop, W.C.; Brouwer, J.T.; Niesters, H.G.; Schalm, S.W. Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: A double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1999**, *14*, 1093–1099.
17. Bellussi, L.M.; Cocca, S.; Passali, G.C.; Passali, D. HMGB1 in the Pathogenesis of Nasal Inflammatory Diseases and its Inhibition as New Therapeutic Approach: A Review from the Literature. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.* **2017**, *21*, 390–398.
18. Liu, W.; Huang, S.; Li, Y.; Li, Y.; Li, D.; Wu, P.; Wang, Q.; Zheng, X.; Zhang, K. Glycyrrhizic acid from licorice down-regulates inflammatory responses via blocking MAPK and PI3K/Akt-dependent NF- κ B signalling pathways in TPA-induced skin inflammation. *MedChemComm* **2018**, *9*, 1502–1510.
19. Qu, L.; Chen, C.; He, W.; Chen, Y.; Li, Y.; Wen, Y.; Zhou, S.; Jiang, Y.; Yang, X.; Zhang, R.; et al. Glycyrrhizic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 2042–2055.
20. Maione, F.; Minosi, P.; Di Giannuario, A.; Raucci, F.; Chini, M.G.; De Vita, S.; Bifulco, G.; Mascolo, N.; Pieretti, S. Long-lasting anti-inflammatory and antinociceptive effects of acute ammonium glycyrrhizinate administration: Pharmacological, biochemical, and docking studies. *Molecules* **2019**, *24*, 2453.
21. Bernela, M.; Ahuja, M.; Thakur, R. Enhancement of anti-inflammatory activity of glycyrrhizic acid by encapsulation in chitosan-katira gum nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *105*, 141–147.
22. Han, S.; Sun, L.; He, F.; Che, H. Anti-allergic activity of glycyrrhizic acid on IgE-mediated allergic reaction by regulation of allergy-related immune cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7222.
23. Cinatl, J.; Morgenstern, B.; Bauer, G.; Chandra, P.; Rabenau, H.; Doerr, H.W. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet* **2003**, *361*, 2045–2046.
24. Hoever, G.; Baltina, L.; Michaelis, M.; Kondratenko, R.; Baltina, L.; Tolstikov, G.A.; Doerr, H.W.; Cinatl, J. Antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1256–1259.
25. Fu, X.; Wang, Z.; Li, L.; Dong, S.; Li, Z.; Jiang, Z.; Wang, Y.; Shui, W. Novel chemical ligands to Ebola virus and Marburg virus nucleoproteins identified by combining affinity mass spectrometry and metabolomics approaches. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29680.
26. Gupta, P.; Ukil, A.; Das, P.K. Bioactive component of licorice as an antileishmanial agent. In *Biological Activities and Action Mechanisms of Licorice Ingredients*; IntechOpen Book Series; IntechOpen Limited: London, U.K., 2017; Chapter 10, Volume 3, pp. 147–163.
27. Chang, H.-Y.; Chen, S.-Y.; Wu, C.-H.; Yen, G.-C. Glycyrrhizin attenuates the process of epithelial-to-mesenchymal transition by modulating HMGB1 initiated novel signaling pathway in prostate cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3323–3332.

28. Tsai, J.J.; Pan, P.J.; Hsu, F.T.; Chung, J.G.; Chiang, I.T. Glycyrrhizic acid modulates apoptosis through extrinsic/intrinsic pathways and inhibits protein kinase B-and extracellular signal-regulated kinase-mediated metastatic potential in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Am. J. Chin. Med.* **2020**, *48*, 223–244.
29. Khan, R.; Khan, A.Q.; Lateef, A.; Rehman, M.U.; Tahir, M.; Ali, F.; Hamiza, O.O.; Sultana, S. Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of Wistar rats. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56020.
30. Zhang, H.; Huang, Q.; Zhai, J.; Zhao, Y.N.; Zhang, L.P.; Chen, Y.Y.; Zhang, R.W.; Li, Q.; Hu, X.P. Structural basis for 18- β -glycyrrhetic acid as a novel non-GSH analog glyoxalase I inhibitor. *Acta Pharmacol. Sin.* **2015**, *36*, 1145–1150.
31. Chen, J.; Zhang, Z.; Song, J.; Liu, Q.; Wang, C.; Huang, Z.; Chu, L.; Liang, H.; Zhang, B.; Chen, X. 18 β -Glycyrrhetic acid-mediated unfolded protein response induces autophagy and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9365.
32. Huo, H.Z.; Wang, B.; Liang, Y.K.; Bao, Y.Y.; Gu, Y. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 6529–6543.
33. Kleiner, D.; Hegyi, G.; Urbanics, R.; Dezs, L.; Robotka, H.; Feher, E.; Sardi, E.; Szebeni, J.; Blázovics, A. Hepatoprotective liposomal glycyrrhizin in alcoholic liver injury. *Eur. J. Int. Med.* **2016**, *8*, 23–28.
34. Huo, X.; Meng, X.; Zhang, J.; Zhao, Y. Hepatoprotective effect of different combinations of 18 α -and 18 β -Glycyrrhizic acid against CCl₄-induced liver injury in rats. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *122*, 109354.
35. Wu, S.Y.; Cui, S.C.; Wang, L.; Zhang, Y.T.; Yan, X.X.; Lu, H.L.; Xing, G.Z.; Ren, J.; Gong, L.K. 18 β -Glycyrrhetic acid protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through activation of the Sirt1/FXR signaling pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 1865–1873.
36. Beskina, O.A.; Abramov, A.; Gabdulhakova, A.G.; Miller, A.V.; Safronova, V.G.; Zamaraeva, M.V. Possible mechanisms of antioxidant activity of glycyrrhizic acid. *Biomed. Khim.* **2006**, *52*, 60–68.
37. Kao, T.-C.; Shyu, M.-H.; Yen G.-C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *57*, 754–761.
38. Xu, C.; Liang, C.; Sun, W.; Chen, J.; Chen, X. Glycyrrhizic acid ameliorates myocardial ischemic injury by the regulation of inflammation and oxidative state. *Drug Des. Dev. Ther.* **2018**, *12*, 1311–1319.
39. Li, M.; Wen, Z.; Xue, Y.; Han, X.; Ma, D.; Ma, Z.; Wu, Z.; Guan, S.; Sun, S.; Chu, L. Cardioprotective effects of glycyrrhizic acid involve inhibition of calcium influx via L-type calcium channels and myocardial contraction in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2020**, *393*, 979–989.
40. Lv, X.; Zhu, Y.; Deng, Y.; Zhang, S.; Zhang, Q.; Zhao, B.; Li, G. Glycyrrhizin improved autophagy flux via HMGB1-dependent Akt/mTOR signaling pathway to prevent doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology* **2020**, *441*, 152508.
41. Ohnishi, M.; Katsuki, H.; Fukutomi, C.; Takahashi, M.; Motomura, M.; Fukunaga, M.; Matsuoka, Y.; Isohama, Y.; Izumi, Y.; Kume, T.; et al. HMGB1 inhibitor glycyrrhizin attenuates intracerebral hemorrhage-induced injury in rats. *Neuropharmacology* **2011**, *61*, 975–980.
42. Jeong, C.; Sun, H.; Wang, Q.; Ma, J. Glycyrrhizin suppresses the expressions of HMGB1 and ameliorates inflammatory effect after acute subarachnoid hemorrhage in rat model. *J. Clin. Neurosci.* **2018**, *47*, 278–284.
43. Paudel, Y.N.; Angelopoulou, E.; Semple, B.; Piperi, C.; Othman, I.; Shaikh, M.F. Potential neuroprotective effect of the HMGB1 inhibitor glycyrrhizin in neurological disorders. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 485–500.
44. Bentz, G.L.; Lowrey, A.J.; Horne, D.C.; Nguyen, V.; Satterfield, A.R.; Ross, T.D.; Harrod, A.E.; Uchakina, O.N.; McCallip, R.J. Using glycyrrhizic acid to target sumoylation processes during Epstein-Barr virus latency. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217578.
45. Yu, S.; Liu, M.; Hu, K. Natural products: Potential therapeutic agents in multiple sclerosis. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *67*, 87–97.
46. Selyutina, O.Y.; Polyakov, N.E. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier—from physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug. *Int. J. Pharm.* **2019**, *559*, 271–279.
47. Paolino, D.; Lucania, G.; Mardente, D.; Alhaique, F.; Fresta, M. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: In vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *J. Control. Release* **2005**, *106*, 99–110.
48. Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Guccione, C.; Manconi, M.; Fadda, A.; Sinico, C. Vesicles and micelles: Two versatile vectors for the delivery of natural products. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *32*, 241–255.
49. Shi, J.R.; Mao, L.G.; Jiang, R.A.; Qian, Y.; Tang, H.F.; Chen, J.Q. Monoammonium glycyrrhizinate inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 1235–1241.
50. Andersson, U.; Tracey, K.J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 139–162.
51. Qu, L.; Chen, C.; Chen, Y.Y.; Li, Y.; Tang, F.; Huang, H.; He, W.; Zhang, R.; Shen, L. High-mobility group box 1 (HMGB1) and autophagy in acute lung injury (ALI): A review. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 1828–1837.
52. Li, G.; Liang, X.; Lotze, M.T. HMGB1: The central cytokine for all lymphoid cells. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 68.
53. Lee, S.; Kwak, M.S.; Kim, S.; Shin, J. The role of high mobility group box 1 in innate immunity. *Yonsei Med. J.* **2014**, *55*, 1165–1176.
54. Lee, S.A.; Lee, S.H.; Kim, J.Y.; Lee, W.S. Effects of glycyrrhizin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a mouse model. *J. Thorac. Dis.* **2019**, *11*, 1287–1302.
55. Street, M.E. HMGB1: a possible crucial therapeutic target for COVID-19. *Horm. Res. Paediatr.* **2020**, *93*, 73–75.

56. Li, C.; Peng, S.; Liu, X.; Han, C.; Wang, X.; Jin, T.; Liu, S.; Wang, W.; Xie, X.; He, X.; et al. Glycyrrhizin, a direct HMGB1 antagonist, ameliorates inflammatory infiltration in a model of autoimmune thyroiditis via inhibition of TLR2-HMGB1 signaling. *Thyroid* **2017**, *27*, 722–731.
57. Wang, Y.; Chen, Q.; Shi, C.; Jiao, F.; Gong, Z. Mechanism of glycyrrhizin on ferroptosis during acute liver failure by inhibiting oxidative stress. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 4081–4090.
58. Shi, X.; Yu, L.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Liu, P.; Du, P. Glycyrrhetic acid alleviates hepatic inflammation injury in viral hepatitis disease via a HMGB1-TLR4 signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *84*, 106578.
59. Luo, P.; Liu, D.; Li, J. Pharmacological perspective: glycyrrhizin may be an efficacious therapeutic agent for COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *55*, 105995.
60. Bailly, C.; Vergoten, G. Glycyrrhizin: An alternative drug for the treatment of COVID-19 infection and the associated respiratory syndrome? *Pharmacol. Ther.* **2020**, *214*, 107618.
61. Murck, H. Symptomatic protective action of glycyrrhizin (licorice) in COVID-19 infection? *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1239.
62. Cardone, M.; Yano, M.; Rosenberg, A.S.; Puig, M. Lessons learned to date on COVID-19 hyperinflammatory syndrome: considerations for interventions to mitigate SARS-CoV-2 viral infection and detrimental hyperinflammation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1131.
63. Tang, D.; Comish, P.; Kang, R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008536.
64. Falanga, A.; Tarallo, R.; Galdiero, E.; Cantisani, M.; Galdiero, M.; Galdiero, S. Review of a viral peptide nanosystem for intracellular delivery. *J. Nanophotonics* **2013**, *7*, 071599.
65. Demetzos, C.; Pippa, N. Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): A mini-review. *Drug Deliv.* **2014**, *21*, 250–257.
66. Bayford, R.; Rademacher, T.; Roitt, I.; Wang, S.X. Emerging applications of nanotechnology for diagnosis and therapy of disease: A review. *Physiol. Meas.* **2017**, *38*, R183–R203.
67. Osaka, S.; Tsuji, H.; Kiwada, H. Uptake of liposomes surface-modified with glycyrrhizin by primary cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 940–943.
68. Hu, J.J.; Xiao, D.; Zhang, X.Z. Advances in peptide functionalization on mesoporous silica nanoparticles for controlled drug release. *Small* **2016**, *12*, 3344–3359.
69. Perez-Surio, A.F.; Alcarena-Lopez, M.A. Drug vectoring systems to target drug delivery using nanotechnologies. *Curr. Nanomed.* **2018**, *8*, 39–44.
70. Sun, H.; Dong, Y.; Feijen, J.; Zhong, Z. Peptide-decorated polymeric nanomedicines for precision cancer therapy. *J. Control. Release* **2018**, *290*, 11–27.
71. Ichikawa, T.; Ishida, S.; Sakiya, Y.; Sawada, Y.; Hanano, M. Biliary excretion and enterohepatic cycling of glycyrrhizin in rats. *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 672–675.
72. Tsuji, H.; Osaka, S.; Kiwada, H. Targeting of liposomes surface-modified with glycyrrhizin to the liver. I. Preparation and biological disposition. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1004–1008.
73. Chen, J.; Chen, Yu.; Chen, Yi; Gao, Y.; Zheng, P.; Li, C.; Tong, Y.; Li, Z.; Luo, W.; Chen, Z. Modifying glycyrrhetic acid liposomes with liver-targeting ligand of galactosylated derivative: Preparation and evaluations. *Oncotarget* **2017**, *8*, 102046–102066.
74. Liu, F.; Yang, D.; Lui, Y.; Cao, Q.; Sun, Y.; Wang, Q.; Tang, H. Improving dispersive property, biocompatibility and targeting gene transfection of graphene oxide by covalente attachment of polyamidoamine dendrimer and glycyrrhetic acid. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *171*, 622–628.
75. Tian, Q.; Wang, X.-H.; Wang, W.; Zhang, C.-N.; Wang, P.; Yuan, Z. Self-assembly and liver targeting of sulfated chitosan nanoparticles functionalized with glycyrrhetic acid. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 870–879.
76. Han, X.; Wang, Z.; Wang, M.; Li, J.; Xu, Y.; He, R.; Guan, H.; Yue, Z.; Gong, M. Liver-targeting self-assembled hyaluronic acid-glycyrrhetic acid micelles enhance hepato-protective effect of silybin after oral administration. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 1818–1829.
77. Yan, T.; Cheng, J.; Liu, Z.; Cheng, F.; Wei, X.; Huang, Y.; He, J. Acid-sensitive polymeric vector targeting to hepatocarcinoma cells via glycyrrhetic acid receptor-mediated endocytosis. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *87*, 34–40.
78. Tian, Q.; Zhang, C.N.; Wang, X.H.; Wang, W.; Huang, W.; Cha, R.T.; Wang, C.H.; Yuan, Z.; Liu, M.; Wan, H.Y.; et al. Glycyrrhetic acid-modified chitosan/poly(ethylene glycol) nanoparticles for liver-targeted delivery. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4748–4756.
79. Zhu, K.; Zhou, L.; Zou, M.; Ning, S.; Liu, S.; Zhou, Y.; Du, K.; Zhang, X.; Xia, X. 18-GA-Suc modified liposome loading cantharidin for augmenting hepatic specificity: Preparation, characterization, anti-Tumor effects and liver-targeting efficiency. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 2038–2047.
80. Mao, S.J.; Bi, Y.Q.; Jin, H.; Wei, D.P.; He, R.; Hou, S.X. Preparation, characterization and uptake by primary cultured rat hepatocytes of liposomes surface-modified with glycyrrhetic acid. *Pharmazie* **2007**, *62*, 614–619.
81. Lin, A.; Liu, Y.; Huang, Y.; Sun, J.; Wu, Z.; Zhang, X.; Ping, Q. Glycyrrhizin surface-modified chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery. *Int. J. Pharm.* **2008**, *359*, 247–253.
82. Lin, A.; Chen, J.; Liu, Y.; Deng, S.; Wu, Z.; Huang, Y.; Ping, Q. Preparation and evaluation of N-caproyl chitosan nanoparticles surface modified with glycyrrhizin for hepatocyte targeting. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 1348–1355.
83. Shi, L.; Tang, C.; Yin, C. Glycyrrhizin-modified O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as drug vehicles targeting hepatocellular carcinoma. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7594–7604.

84. El-Marakby, E.M.; Hathout, R.M.; Taha, I.; Mansour, S.; Mortada, N.D. A novel serum-stable liver targeted cytotoxic system using valerate-conjugated chitosan nanoparticles surface decorated with glycyrrhizin. *Int. J. Pharm.* **2017**, *525*, 123–138.
85. Wu, M.; Lia, B.; Deng, Y.; Feng, Z.; Zhong, C.; Wu, W.; Huang, Y.; Wang, L.; Zu, C.; Zhao, X. Resveratrol-loaded glycyrrhizic acid-conjugated human serum albumin nanoparticles wrapping resveratrol nanoparticles: Preparation, characterization, and targeting effect on liver tumors. *J. Biomater. Appl.* **2017**, *32*, 191–205.
86. Cheng, M.; Gao, X.; Wang, Y.; Chen, H.; He, B.; Xu, H.; Li, Y.; Han, J.; Zhang, Z. Synthesis of glycyrrhizic acid-modified chitosan 5-fluorouracil nanoparticles and its inhibition of liver cancer characteristics in vitro and in vivo. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3517–3536.
87. Hefnawy, A.; Khalil, I.H.; Arafa, K.; Emara, M.; El-Sherbiny, I.M. Dual-ligand functionalized core-shell chitosan-based nanocarrier for hepatocellular carcinoma-targeted drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 821–837.
88. Cao, M.; Gao, Y.; Zhan, M.; Qiu, N.; Piao, Y.; Zhou, Z.; Shen, Y. Glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid modified polyethyleneimine for targeted DNA delivery to hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5074.
89. Chen, G.; Li, J.; Cai, Y.; Zhan, J.; Gao, J.; Song, M.; Shi, Y.; Yang, Z. A glycyrrhetic acid-modified curcumin supramolecular hydrogel for liver tumor targeting therapy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44210.
90. Chen, J.; Jiang, H.; Wu, Y.; Li, Y.; Gao, Y. A novel glycyrrhetic acid-modified oxaliplatin liposome for liver-targeting and in vitro/vivo evaluation. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 2265–2275.
91. Zhou, L.; Zou, M.; Zhu, K.; Ning, S.; Xia, X. Development of 11-DGA-3-O-Gal-modified cantharidin liposomes for treatment of hepatocellular carcinoma. *Molecules* **2019**, *24*, 3080.
92. Sun, Y.; Lu, J.; Yan, D.; Shen, L.; Hu, H.; Chen, D. Cellular uptake mechanism and clearance kinetics of fluorescence-labeled glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid-modified liposome in hepatocellular carcinoma cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *53*, 46–56.
93. Zhang, C.; Wang, W.; Liu, T.; Wu, Y.; Guo, H.; Wang, P.; Tian, Q.; Wang, Y.; Yuan, Z. Doxorubicin-loaded glycyrrhetic acid-modified alginate nanoparticles for liver tumor chemotherapy. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2187–2196.
94. Chen, H.; Li, M.; Wan, T.; Zheng, Q.; Cheng, M.; Huang, S.; Wang, Y. Design and synthesis of dual-ligand modified chitosan as a liver targeting vector. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 431–441.
95. Yan, T.; Li, D.; Li, J.; Cheng, F.; Cheng, J.; Huang, Y.; He, J. Effective co-delivery of doxorubicin and curcumin using a glycyrrhetic acid-modified chitosan-cystamine-poly(ϵ -caprolactone) copolymer micelle for combination cancer chemotherapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *145*, 526–538.
96. Wang, X.; Gu, X.; Wang, H.; Sun, Y.; Wu, H.; Mao, S. Synthesis, characterization and liver targeting evaluation of self-assembled hyaluronic acid nanoparticles functionalized with glycyrrhetic acid. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *96*, 255–262.
97. Tian, G.; Sun, X.; Bai, J.; Dong, J.; Zhang, B.; Gao, Z.; Wu, J. Doxorubicin-loaded dual-functional hyaluronic acid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor efficacy in vitro and in vivo. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 133–142.
98. Chopdey, P.K.; Tekade, R.K.; Mehra, N.K.; Mody, N.; Jain, N.K. Glycyrrhizic acid conjugated dendrimer and multi-walled carbon nanotubes for liver specific delivery of doxorubicin. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 1088–1100.
99. Zu, Y.; Meng, L.; Zhao, X.; Ge, Y.; Yu, X.; Zhang, Y.; Deng, Y. Preparation of 10-hydroxycamptothecin-loaded glycyrrhizic acid-conjugated bovine serum albumin nanoparticles for hepatocellular carcinoma-targeted drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 1207–1222.
100. Tian, Q.; Wang, X.; Wang, W.; Zhang, C.; Yuan, Z.; Chen, X. Understanding the role of the C3-hydroxyl group in glycyrrhetic acid on liver targeting. *J. Control. Release* **2011**, *152*, 192–269.
101. Wu, J.L.; Tian, G.X.; Yu, W.J.; Jia, G.T.; Sun, T.Y.; Gao, Z.Q. pH-responsive hyaluronic acid-based mixed micelles for the hepatoma-targeting delivery of doxorubicin. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 364.
102. Tian, G.; Pan, R.; Zhang, B.; Qu, M.; Lian, B.; Jiang, H.; Gao, Z.; Wu, J. Liver-targeted combination therapy basing on glycyrrhizic acid-modified DSPE-PEG-PEI nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1–13.
103. Yang, T.; Lan, Y.; Cao, M.; Ma, X.; Cao, A.; Sun, Y.; Yang, J.; Li, L.; Liu, Y. Glycyrrhetic acid-conjugated polymeric prodrug micelles co-delivered with doxorubicin as combination therapy treatment for liver cancer. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 106–115.
104. Ossama, M.; Hathout, R.M.; Attia, D.A.; Mortada, N.D. Enhanced allicin cytotoxicity on HEPG-2 cells using glycyrrhetic acid surface-decorated gelatin nanoparticles. *ACS Omega* **2019**, *4*, 11293–11300.
105. Negishi, M.; Irie, A.; Nagata, N.; Ichikawa, A. Specific binding of glycyrrhetic acid to the rat liver membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1066*, 77–82.
106. Mao, S.J.; Hou, S.X.; He, R.; Zhang, L.K.; Wei, D.P.; Bi, Y.Q.; Jin, H. Uptake of albumin nanoparticle surface modified with glycyrrhizin by primary cultured rat hepatocytes. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *28*, 3075–3079.
107. Wang, Q.S.; Gao, L.N.; Zhu, X.N.; Zhang, Y.; Zhang, C.N.; Xu, D.; Cui, Y.L. Co-delivery of glycyrrhizin and doxorubicin by alginate nanogel particles attenuates the activation of macrophage and enhances the therapeutic efficacy for hepatocellular carcinoma. *Theranostics* **2019**, *9*, 6239–6255.
108. Zhang, J.; Zhang, M.; Ji, J.; Fang, X.; Pan, X.; Wang, Y.; Wu, C.; Chen, M. Glycyrrhetic acid-mediated polymeric drug delivery targeting the acidic microenvironment of hepatocellular carcinoma. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 3376–3390.
109. Abdelmoneem, M.A.; Elnaggar, M.A.; Hammady, R.S.; Kamel, S.M.; Helmy, M.W.; Abdulkader, M.A.; Zaky, A.; Fang, J.Y.; Elkhodairy, A.; Elzoghby, A.O. Dual-targeted lactoferrin shell-oily core nanocapsules for synergistic targeted/herbal therapy of hepatocellular carcinoma. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 26731–26744.

110. Tian, J.; Wang, L.; Wang, L.; Ke, X. A wogonin-loaded glycyrrhetic acid-modified liposome for hepatic targeting with anti-tumor effects. *Drug Deliv.* **2014**, *21*, 553–559.
111. Qi, W.W.; Yu, H.Y.; Guo, H.; Lou, J.; Wang, Z.M.; Liu, P.; Sapin-Minet, A.; Maicent, P.; Hong, X.C.; Hu, X.M.; et al. Doxorubicin-loaded glycyrrhetic acid modified recombinant human serum albumin nanoparticles for targeting liver tumor chemotherapy. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 675–683.
112. Wang, X.; Niu, D.; Hu, C.; Li, P. Polyethyleneimine-based nanocarriers for gene delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 6140–6156.
113. Du, H.; Liu, M.; Yang, X.; Zhai, G. The role of glycyrrhetic acid modification on preparation and evaluation of quercetin-loaded chitosan-based self-aggregates. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *460*, 87–96.
114. Zhang, L.; Yao, J.; Wang, T.; Zhang, Q. Glycyrrhetic acid-graft-hyaluronic acid conjugated as a carrier for synergistic targeted delivery of antitumor drugs. *Int. J. Pharm.* **2013**, *30*, 654–664.
115. Mezghrani, O.; Tang, Y.; Ke, X.; Chen, Y.; Hu, D.; Tu, J.; Zhao, L.; Bourkaib, N. Hepatocellular carcinoma dually-targeted nanoparticles for reduction triggered intracellular delivery of doxorubicin. *Int. J. Pharm.* **2015**, *478*, 553–568.
116. Wang, W.; Lei, Y.; Sui, H.; Zhang, W.; Zhu, R.; Feng, J.; Wang, H. Fabrication and evaluation of nanoparticle-assembled BSA microparticles for enhanced liver delivery of glycyrrhetic acid. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2017**, *4*, 740–747.
117. Wang, X.; Gu, X.; Huimin, W.; Yang, J.; Mao, S. Enhanced delivery of doxorubicin to the liver through self-assembled nanoparticles formed via conjugation of glycyrrhetic acid to the hydroxyl group of hyaluronic acid. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *195*, 170–179.
118. Li, J.; Chen, T.; Deng, F.; Wan, J.; Tang, Y.; Yuan, P.; Zhang, L. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of curcumin-loaded albumin nanoparticles surface-functionalized with glycyrrhetic acid. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 5475–5487.
119. Guo, H.; Lai, Q.; Wang, W.; Wu, Y.; Zhang, C.; Liu, Y.; Yuan, Z. Functional alginate nanoparticles for efficient intracellular release of doxorubicin and hepatoma carcinoma cell targeting therapy. *Int. J. Pharm.* **2013**, *451*, 1–11.
120. Wu, F.; Li, X.; Jiang, B.; Yan, J.; Zhang, Z.; Qin, J.; Yu, W.; Gao, Z. Glycyrrhetic acid functionalized nanoparticles for drug delivery to liver cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2018**, *14*, 1837–1852.
121. Du, H.; Yang, X.; Pang, X.; Zhai, G. The synthesis, self-assembling, and biocompatibility of a novel O-carboxymethyl chitosan cholate decorated with glycyrrhetic acid. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 753–761.
122. Chu, Y.; Li, D.; Luo, Y.F.; He, X.J.; Jiang, M.Y. Preparation and in vitro evaluation of glycyrrhetic acid-modified curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. *Molecules* **2014**, *19*, 2445–2457.
123. Jiang, H.; Li, Z.P.; Tian, G.X.; Pan, R.Y.; Xu, C.M.; Zhang, B.; Wu, J.L. Liver-targeted liposomes for codelivery of curcumin and combretastatin A4 phosphate: Preparation, characterization, and antitumor effects. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 1789–1804.
124. He, Z.Y.; Zheng, X.; Wu, X.H.; Song, X.R.; He, G.; Wu, W.F.; Yu, S.; Mao, S.J.; Wei, Y.Q. Development of glycyrrhetic acid-modified stealth cationic liposomes for gene delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *397*, 147–154.
125. Marinez-Edo, G.; Fornaguera, C.; Borros, S.; Sanchez-Garcia, D. Glycyrrhetic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for the co-delivery of DOX/CPT-PEG for targeting HepG2 cells. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1048.