

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

**Silici mesostrutturate per il
rilascio di curcumina**



Relatore

Prof.ssa Barbara Onida

Correlatori:

Prof.ssa Silvia Maria Ronchetti

Dott.ssa Marta Gallo

Candidato

Fabio GIUDICE

matricola: 244096

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Indice

Elenco delle tabelle	V
Elenco delle figure	VI
Acronimi	VIII
Introduzione	IX
1 Silici mesostrutturate	1
1.1 Introduzione	1
1.2 Processo Sol-Gel	3
1.2.1 Reazioni chimiche	4
1.2.2 Catalisi basica	5
1.3 Meccanismo di formazione delle MCM-41	6
1.3.1 Ruolo del surfattante	7
1.4 Silici mesoporose come sistemi per il rilascio di farmaco	9
1.4.1 Dimensione delle particelle	9
1.4.2 Taglia dei pori e Connettività	9
1.4.3 Area superficiale	10
1.4.4 Volume poroso	11
1.4.5 Funzionalizzazione dei pori	11
2 Curcumina	13
2.1 Introduzione	13
2.2 Struttura chimica della curcumina	14
2.3 Reattività della molecola di curcumina	17
2.3.1 Attività antiossidante	17
2.3.2 Degradazione in vivo	18
2.4 Sistemi nanotecnologici per la somministrazione di curcumina	19
2.4.1 Liposomi	19
2.4.2 Micelle	20
2.4.3 Nanoparticelle lipidiche	21
2.4.4 Nanoparticelle polimeriche	21
2.4.5 Silici mesoporose	22

3	Materiali e metodi	23
3.1	Materiali	23
3.2	Sintesi	24
3.2.1	Lavaggi	24
3.2.2	Calcinazione	24
3.3	Tecniche di caratterizzazione	24
3.3.1	Diffrazione a raggi X	24
3.3.2	Analisi di adsorbimento di azoto	26
3.3.3	Analisi termogravimetrica	29
3.3.4	Spettroscopia FTIR	29
3.3.5	Spettroscopia UV/Visibile	30
3.3.6	Spettroscopia UV/Visibile su solido	31
3.3.7	Microscopia elettronica FESEM e Spettroscopia EDS	31
3.4	Retta di taratura e rilasci	32
4	Silici mesostrutturate senza curcumina	35
4.1	Sintesi	35
4.2	Caratterizzazione	38
4.2.1	Diffrazione a raggi X	38
4.2.2	Analisi termogravimetrica	39
4.2.3	Spettroscopia FTIR	41
4.2.4	Spettroscopia UV/Visibile sui filtrati	42
4.2.5	Microscopia elettronica e Spettroscopia EDS	42
4.3	Calcinazione della silice mesostrutturata	45
4.3.1	Analisi di adsorbimento di azoto	45
4.3.2	Diffrazione a raggi X	46
4.3.3	Spettroscopia FTIR	47
5	Silici mesostrutturate contenenti curcumina	49
5.1	Sintesi	49
5.2	Caratterizzazione	50
5.2.1	Diffrazione a raggi X	50
5.2.2	Analisi termogravimetrica	53
5.2.3	Spettroscopia FTIR	55
5.2.4	Spettroscopia UV/Vis su solido	55
5.2.5	Microscopia elettronica FESEM	56
5.3	Lavaggio del campione MESO_SiO ₂ _Cur1	56
5.3.1	Lavaggi	58
5.3.2	Diffrazione a raggi X	59
5.3.3	Spettroscopia UV/Vis su solido	60
5.4	Estrazione in etanolo	60
6	Rilascio di curcumina dalle silici mesostrutturate	65
6.1	Rilascio in PBS	66
6.1.1	Test in PBS	67
6.2	Rilascio in sudore artificiale	68

6.2.1	Test in AS	69
6.3	Rilascio in ambiente gastrico	71
6.3.1	Test in soluzione di HCl	72
7	Conclusioni e sviluppi futuri	75
A	Confronti	79
	Bibliografia	83

Elenco delle tabelle

2.1	pKa - Curcumina	16
4.1	Miscela di sintesi - Senza curcumina	36
4.2	Parametri di cella - MESO_SiO ₂	39
4.3	EDS - Percentuali in peso MESO_SiO ₂	45
4.4	Parametri superficiali - Sintesi calcinata	47
4.5	Parametri di cella - MESO_SiO ₂ pre/ post calcinazione	48
5.1	Miscela di sintesi - Contenente curcumina	49
5.2	Perdita di peso percentuale - Confronti	54
5.3	Taratura della curcumina in EtOH	61
6.1	Taratura della curcumina in PBS	66
6.2	Composizione sudore artificiale	68
6.3	Taratura della curcumina in sudore artificiale	69
6.4	Taratura curcumina in soluzione di HCl	71

Elenco delle figure

1.1	Disposizione MCM-41, MCM-48, MCM-50	2
1.2	Passaggio dalla mesostruttura ai mesopori	2
1.3	Rappresentazione delle reazioni del processo di Stöber	3
1.4	Schema generale delle reazioni sol-gel	4
1.5	Reazioni di idrolisi e condensazione in ambiente basico	5
1.6	Meccanismo di <i>self-assembly</i> nelle MCM-41	7
1.7	Cambiamento di fase del surfattante in funzione della concentrazione	8
1.8	Interazione SiO^- - Surfattante cationico	8
1.9	Esempio di funzionalizzazione superficiale	11
2.1	Tautomeria cheto-enolica	15
2.2	Azione anti-ossidante della curcumina	18
2.3	Liposomi	20
2.4	Interazione CTAB - Curcumina	21
3.1	Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg	25
3.2	Isoterme di adsorbimento	27
3.3	Cicli di isteresi.	28
3.4	Sistema per il test di rilascio	33
4.1	Modello di silici mesostrutturate senza curcumina	35
4.2	Slurry senza curcumina	36
4.3	Aggregati - Tentativo II	37
4.4	Schema della sintesi senza curcumina	38
4.5	Spettro XRD a bassi angoli - MESO_ SiO_2	39
4.6	Spettro XRD ad alti angoli - MESO_ SiO_2	40
4.7	Profilo TGA - MESO_ SiO_2	40
4.8	Spettro FTIR - MESO_ SiO_2	41
4.9	Spettro FTIR in vuoto - MESO_ SiO_2	42
4.10	Spettro UV/Vis - Filtrato puro/diluito	43
4.11	Spettro UV/Vis - Soluzione NaOH+CTAB pura/diluita	43
4.12	FESEM - MESO_ SiO_2	44
4.13	EDS - MESO_ SiO_2	45
4.14	Isoterme di adsorbimento/deadsorbimento - MESO_ SiO_2 calcinata	46
4.15	Distribuzione porosimetrica - MESO_ SiO_2 calcinata	46
4.16	Spettro XRD a bassi angoli - MESO_ SiO_2 pre/post calcinazione	47
4.17	Spettro FTIR - MESO_ SiO_2 pre/ post calcinazione	48
5.1	Schema della sintesi contenente curcumina	50

5.2	Slurry contenente curcumina	50
5.3	Spettro XRD ad alti angoli - Curcumina	51
5.4	Spettro XRD a bassi angoli - Confronto sui tre campioni	52
5.5	Spettro XRD a bassi angoli - Confronto su curcumina	52
5.6	Spettro XRD ad alti angoli - Confronto su curcumina	53
5.7	Profilo TGA - Curcumina in polvere	53
5.8	Profilo TGA - Confronto sui tre campioni	54
5.9	Spettro FTIR - MESO_SiO ₂ _Cur2 pre/post trattamento termico	55
5.10	Spettro UV/Vis su solido - Confronto su curcumina	56
5.11	FESEM - MESO_SiO ₂ _Cur1 (a,c), MESO_SiO ₂ _Cur2 (b,d)	57
5.12	Aliquote per il lavaggio in acqua	58
5.13	Precipitato MESO_SiO ₂ _Cur2 post lavaggio in etanolo	59
5.14	Spettro XRD a bassi angoli - EtOH/H ₂ O	59
5.15	Spettro UV/Vis solido - MESO_SiO ₂ _Cur1 in H ₂ O	60
5.16	Retta di taratura - EtOH	61
5.17	Estrazione in EtOH - MESO_SiO ₂ _2	62
5.18	Spettro UV/Vis sul filtrato - MESO_SiO ₂ _Cur2	62
5.19	Modello di silici mesostrutturate contenenti curcumina	63
6.1	Retta di taratura - PBS	67
6.2	Rilascio - PBS	68
6.3	Retta di taratura - Sudore artificiale	69
6.4	Rilascio - Sudore artificiale	70
6.5	Rilascio - Confronto Cur+CTAB in AS	71
6.6	Retta di taratura - Soluzione di HCl	72
6.7	Rilascio - Soluzione di HCl	72
6.8	Rilascio in soluzione di HCl - Precipitato finale	73
A.1	Profili di rilascio - PBS,AS,HCl	79

Acronimi

AS	<i>Artificial sweat;</i>
CMC	Concentrazione micellare critica;
Cur	Curcumina;
EtOH	Etanolo;
FDA	<i>Food and Drug Administration;</i>
FESEM	<i>Field Emission Scanning Electron Microscopy;</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy;</i>
HCl	Acido cloridrico;
MESO_SiO₂	Silici mesostrutturate;
MESO_SiO₂_Cur1	Silici mesostrutturate contenenti curcumina;
MESO_SiO₂_Cur2	Silici mesostrutturate contenenti doppia curcumina;
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy;</i>
PBS	Soluzione tampone salina;
PLGA	acido poli(lattico-co-glicolico);
ROS	<i>Reactive oxygen species;</i>
SDS	Scheda di sicurezza;
SLN	Nanoparticelle solide lipidiche;
TGA	Analisi termogravimetrica;
UV/Vis	Spettroscopia Ultravioletto/Visibile;
SDS	Scheda di sicurezza;
XRD	<i>X-ray diffraction;</i>

Introduzione

Uno dei campi di ricerca di maggiore interesse per le nanotecnologie nel settore biomedicale riguarda la realizzazione di sistemi per il rilascio di farmaco basati su micro e nanoparticelle. Grazie a questi sistemi il farmaco viene veicolato al sito di interesse e successivamente rilasciato con la cinetica opportuna, tale da mantenere il livello del principio attivo nel range terapeutico per il tempo necessario, permettendo di ridurre il quantitativo di farmaco somministrato e limitando gli effetti indesiderati.

I materiali mesoporosi (con pori tra 2 e 50 nm) sono un chiaro esempio di come un sistema nanotecnologico, sviluppato inizialmente per usi industriali, abbia trovato ampio utilizzo anche in campo biomedicale. Le silici a porosità ordinata, la cui prima applicazione come vettori per il rilascio di farmaco risale al 2001, sono ritenute dei potenziali *carrier*¹ grazie alla loro elevata superficie specifica, porosità ordinata, possibilità di funzionalizzazione e biocompatibilità.

La finalità di questa tesi è presentare un processo di sintesi per la realizzazione di un sistema per il rilascio di curcumina sfruttando come *carrier* una silice mesostrutturata. La curcumina è un polifenolo naturale estratto dal rizoma della "Curcuma longa". Grazie alla sua struttura chimica, questa molecola può essere applicata in diversi settori: spezia nell'industria alimentare, pigmento nell'industria tessile e come farmaco nell'industria farmaceutica. È stato dimostrato che la curcumina possiede proprietà antinfiammatorie e antiossidanti e, più in generale, agisce su un ampio spettro di bersagli molecolari. Per queste ragioni, negli ultimi anni, c'è stato un crescente interesse per i trattamenti a base di curcumina per il trattamento di disturbi di diversa natura. Tuttavia, la limitata solubilità in soluzioni acquose e la rapida degradazione nei fluidi corporei riduce la sua biodisponibilità, limitando le applicazioni terapeutiche di questo farmaco.

I sistemi di somministrazione basati su microparticelle possono essere utilizzati per superare i limiti applicativi della curcumina, aumentandone la durata di circolazione, la solubilità in ambiente acquoso e la sua biodisponibilità. Gli approcci tradizionali per incorporare il farmaco all'interno delle silici mesoporose utilizzano tecniche come l'adsorbimento da soluzione, l'Incipient wetness impregnation o la CO₂ supercritica ma le proprietà chimico-fisiche della curcumina rendono queste tecniche scarsamente efficaci. Per superare queste criticità si è scelto di seguire un approccio di tipo "bottom-up", realizzando un sistema ibrido mesostrutturato in cui le molecole di surfattante, auto-assemblandosi in micelle,

¹Con il termine inglese *drug carrier* si intende un qualsiasi substrato utilizzato nella somministrazione del farmaco al fine di aumentarne la selettività, l'efficacia e/o la sicurezza.

guidano la deposizione della silice e allo stesso tempo permettono di solubilizzare la curcumina all'interno del loro *core* idrofobico. Grazie alla combinazione di micelle di surfattante e matrice di silice amorfa, la curcumina viene incorporata in forma amorfa all'interno del *carrier* già durante la fase di sintesi.

Il primo capitolo di questo elaborato di tesi verte sulle silici mesostrutturate, descrivendo le reazioni e i meccanismi che portano all'ottenimento di questo materiale ed elencandone le proprietà utilizzate per la realizzazione di sistemi per il rilascio di farmaco. Nel secondo capitolo sarà presa in esame la curcumina e la sua azione come anti-ossidante, soffermandosi sulle problematiche legate alla sua scarsa solubilità in acqua e la limitata biodisponibilità e presentando alcune strategie proposte per superare questo problema descritte in letteratura.

Il terzo e quarto capitolo tratteranno rispettivamente le silici mesostrutturate non contenenti e contenenti curcumina, realizzate ambedue durante l'attività di laboratorio e mostrate con i relativi risultati derivati dalle tecniche di caratterizzazione. Il sistema è stato caratterizzato tramite diffrattometria a raggi X, analisi termogravimetrica, spettroscopia FTIR e UV/Visibile, microscopia elettronica e spettroscopia EDS .

Infine, nel quinto e ultimo capitolo, vengono mostrati i test di rilascio di curcumina dalle silici mesostrutturate in tre soluzioni: tampone fosfato salino, in ambiente gastrico simulato ed infine in una soluzione che ricrea il sudore della pelle nell'ottica di un'applicazione topica.

Capitolo 1

Silici mesostrutturate

1.1 Introduzione

I materiali microporosi più comuni e conosciuti sono le zeoliti, che sono fondamentalmente allumino-silicati naturali o sintetici con struttura cristallina tridimensionale aperta. Le zeoliti trovano applicazioni in diversi settori dell'industria e sono utilizzate, ad esempio, come materiali adsorbenti, nei processi di catalisi e come setacci molecolari. Quest'ultima applicazione sfrutta la stretta distribuzione porosimetrica delle zeoliti (diametro dei pori < 2 nm) per separare le molecole sulla base della loro dimensione. La ridotta dimensione dei pori è, tuttavia, anche una delle principali limitazioni al loro utilizzo [1].

Nel 1992, un gruppo di ricerca della Mobil Research and Development Corporation annunciò la sintesi di una nuova famiglia (nota con il nome M41S) di solidi mesoporosi¹ a base silice [2]. Seguendo il loro procedimento di sintesi si potevano produrre materiali porosi altamente ordinati con porosità di dimensione > 2 nm e con aree superficiali $>$ di 1000 m². I materiali appartenenti alla famiglia M41S sono denominati MCM (Mobil Composite of Matter) [3].

Il meccanismo proposto per la sintesi di questo nuovo tipo di materiali prevede la presenza, tra i reagenti, di molecole di surfattante allo stato micellare con funzione di *templating agent*. Secondo i ricercatori della Mobil le molecole del precursore della silice reagiscono inizialmente tra di loro, depositandosi infine come silice amorfa sulle micelle di surfattante [3]. La silice, o diossido di silicio (SiO₂), può presentarsi sia in forma cristallina sia amorfa a seconda del fatto che il tetraedro caratteristico SiO₄ si ripeta ordinatamente o meno nello spazio. Nei materiali mesoporosi invece, l'ordine a lungo raggio non è causato dalla silice in sé, che rimane amorfa, ma piuttosto dalla ripetizione ordinata dei pori, ottenuti dopo la rimozione del surfattante.

La scoperta di questi materiali ha rappresentato un punto di svolta nell'ingegneria dei materiali, superando prima di tutto le limitazioni dei principali materiali microporosi. Dalla loro scoperta nel 1992, sono stati sviluppati dei nuovi solidi mesoporosi basati su un simile meccanismo di formazione. Generalmente, le MCM-41 hanno morfologia dei pori esagonale

¹Il prefisso greco *Meso* è stato adottato dalla IUPAC per definire i materiali porosi con pori della dimensione compresa tra i 2 e i 50 nm

e con un diametro compreso tra 2.5 e 6 nm quando viene utilizzato un surfattante cationico. Variando le condizioni di sintesi si possono influenzare a fondo sia la dimensione dei pori sia la loro disposizione spaziale. Le MCM-48, a tal proposito, hanno una disposizione cubica mentre le MCM-50 una lamellare (figura 1.1).

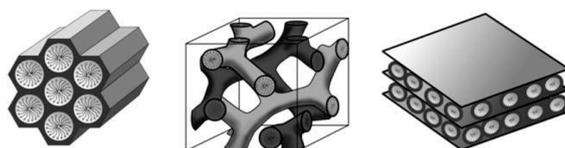


Figura 1.1: Disposizione MCM-41, MCM-48, MCM-50

A seconda delle condizioni di sintesi e della sorgente di silice o del tipo di surfattante utilizzato, possono essere sintetizzati molti altri tipi di materiali mesoporosi da parte di altri istituti di ricerca e/o aziende. Nel 1998, ad esempio, con l'acronimo SBA-(Santa Barbara University) furono sintetizzate un nuovo tipo di silici mesoporose utilizzando un surfattante non ionico; a differenza delle MCM-41, le SBA-15 possiedono pori fino a 30 nm ed una matrice di silice tra un poro e l'altro più spessa, mentre mantengono la disposizione esagonale dei pori.

Le strategie di sintesi proposte per l'ottenimento di materiali mesoporosi a base silice producono inizialmente un materiale mesostrutturato, consistente in un "ibrido" silice-surfattante e nei quali i pori della silice sono occupati dalle micelle. Per poter sfruttare totalmente la porosità è necessario rimuovere il surfattante per rendere accessibili i pori della mesostruttura (figura 1.2). Tale processo si esegue generalmente sottoponendo il materiale ad un trattamento termico a temperature uguali o superiori ai 500 °C che prende il nome di calcinazione. La rimozione del surfattante tramite calcinazione può influenzare l'area superficiale, la dimensione ed il volume dei pori. E' possibile rimuovere le molecole di surfattante utilizzando anche un solvente ed in questo caso le modifiche ai parametri superficiali sono inferiori.

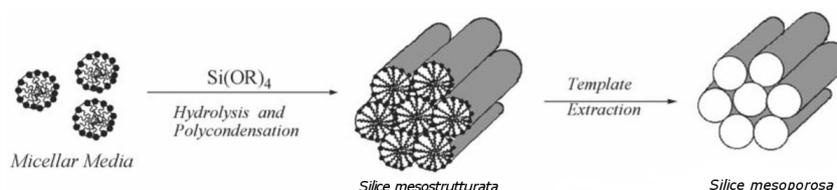


Figura 1.2: Passaggio dalla mesostruttura ai mesopori

Le silici mesoporose, sotto forma di micro e nanoparticelle, attirano da alcuni anni molto interesse nel campo biomedicale, sia per scopi diagnostici sia terapeutici. Di queste, le MCM-41, MCM-48, SBA-15, SBA-16 sono ampiamente impiegate per il rilascio di farmaci; Le MCM-50, SBA-11 e SBA-12 sono state invece segnalate per avere eccellenti capacità come assorbenti e in processi di catalisi [2].

Nelle successive sezioni saranno presentate brevemente le reazioni sol-gel alla base della formazione della matrice di silice amorfa e l'azione del surfattante come *templating agent*

nell'ottenimento della mesostruttura. Successivamente saranno elencate e descritte le caratteristiche principali delle silici mesoporose che le rendono delle ottime candidate per la realizzazione di sistemi per il rilascio di farmaco.

1.2 Processo Sol-Gel

I materiali ibridi organici/inorganici possono essere preparati tramite un approccio *sol-gel*: una serie di reazioni che comportano la trasformazione di un sol in un gel. Un sol può essere definito come una soluzione colloidale di piccole particelle disperse nel liquido. Un gel, al contrario, è generalmente una sostanza non fluida costituita da una rete continua che comprende all'interno una fase liquida. Generalmente le reazioni sol-gel sono quelle in cui una soluzione acquosa contenente alcossidi metallici della forma $[Me^+(OR)_n]$ viene convertita in un *network* solido di materiale inorganico. Il metodo sol-gel è anche in grado di produrre vetri inorganici omogenei e di elevata purezza a temperatura ambiente, molto inferiore alle alte temperature richieste dal processo di produzione del vetro convenzionale. Ad esempio, la silice può essere ottenuta dalla fusione del vetro, ma il metodo sol-gel è più efficace per la produzione di silice amorfa. Sostituendo gli alcossidi metallici con gli alcossilani (alcossidi di silicio), è possibile ottenere una struttura costituita da silice amorfa [4]. Gli alcossilani più comunemente usati sono il tetraetossisilano (TMEOS) ed il tetraetossisilano (TEOS).

Werner Stöber, considerato un pioniere nel campo della produzione di silici, pubblicò nel 1968 insieme al suo gruppo di ricerca uno studio riguardante la possibilità di sintetizzare particelle di sferiche di silice amorfa con dimensioni micrometriche e monodisperse attraverso un sistema di reazioni chimiche di tipo *sol-gel* (figura 1.3).

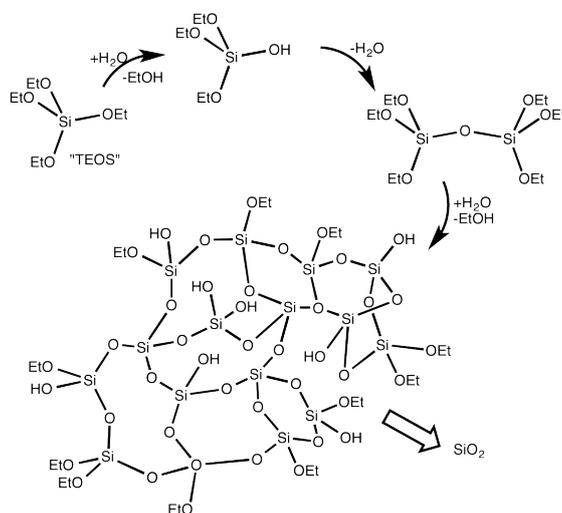


Figura 1.3: Rappresentazione delle reazioni del processo di Stöber

Nel processo definito da Stöber un precursore della silice, il tetraetossisilano (TEOS²)

²Il TEOS è comunemente noto anche come *tetraetilortosilicato*.

viene idrolizzato in una soluzione di acqua e alcol ed in presenza di ammoniaca come catalizzatore basico. La reazione produce inizialmente una miscela di etossisilanoli e acido ortosilicico. Dopo ulteriori reazioni idrolisi, la reazione si conclude con la condensazione dei silanoli, realizzando un crosslinking tra le varie molecole di silice ed ottenendo così un *framework* sufficientemente stabile ma privo ancora di una porosità ordinata [5]. Il lavoro svolto da Stöber ottenne due importanti risultati: la possibilità di controllare la dimensione e la forma delle particelle variando le condizioni di sintesi³ e la capacità di ottenere silice amorfa anche a temperatura ambiente. Tale procedimento fu un punto di partenza per lo studio della crescita delle micro e nanoparticelle di silice.

Una delle criticità riscontrate nel procedimento di sintesi proposto dai ricercatori della MOBIL (Beck *et al.* [6]) era la formazione di agglomerati costituiti da un'ampia distribuzione granulometrica. Gli agglomerati sono composti da particelle primarie di dimensione micro e sub-micrometrica. Inoltre, l'eventuale macinazione per il ridimensionamento delle particelle modificava anche la morfologia. Nell'ottica di controllare maggiormente la dimensione e la morfologia delle particelle di silice mesoporosa, nel 1997 Grün modificò il processo di Stöber introducendo, tra i reagenti, un surfattante con funzione di *templating agent* ottenendo materiali mesoporosi ma in forma di micro e nano particelle e con un range dimensionale molto più stretto [7].

1.2.1 Reazioni chimiche

Le reazioni chimiche che subisce il TEOS in presenza di acqua sono elencate di seguito e riportate nello schema 1.4:

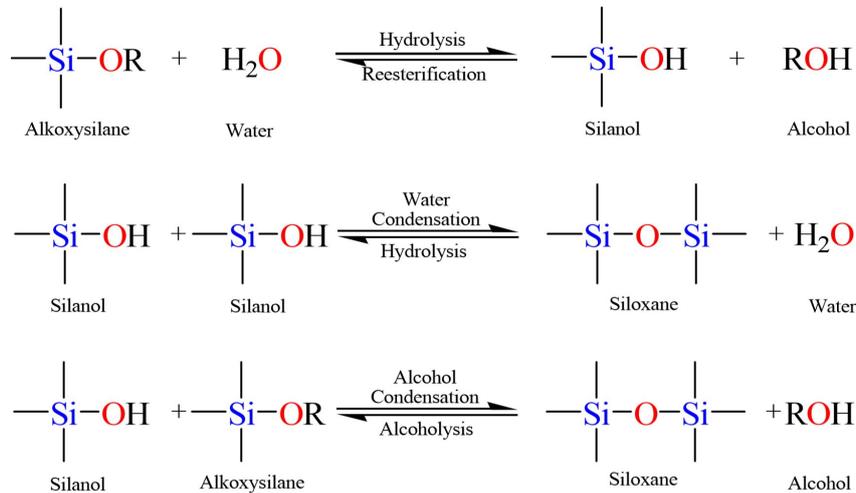


Figura 1.4: Schema generale delle reazioni sol-gel

³La dimensione delle particelle è influenzata dalla tipologia di alcossido utilizzato, dal rapporto tra i vari reagenti e dalla tipologia di alcol impiegato come solvente

1. Idrolisi di una molecola di alcossilano in presenza di acqua e formazione di una molecola di silanolo e una di alcol.
2. Condensazione tra due molecole di silanolo, con formazione di un ponte silossano (Si-O-Si) e di una molecola d'acqua.
3. Condensazione tra una molecola di silanolo e una di alcossilano, con formazione di un ponte silossano e di una molecola di alcol.

I ponti silossano sono legami forti e all'aumentarne di numero le particelle di silice possono raggrupparsi tra loro formando degli aggregati di silicato. La condensazione di questi ultimi porta alla formazione di un gel che "intrappola" l'acqua e i sottoprodotti dell'alcol. La rimozione di queste molecole dalla rete del gel è possibile mediante trattamento termico o tramite lavaggi in acqua e/o solventi. Le reazioni di idrolisi di fatto continuano contemporaneamente, cosicché l'idrolisi completa del tetraetossisilano non si verifica prima dell'inizio delle reazioni di condensazione [4].

1.2.2 Catalisi basica

Le reazioni di idrolisi e condensazione possono avvenire in condizioni neutre, acide o basiche. Tuttavia, la velocità delle reazioni è fortemente influenzata dal tipo di catalizzatore (e quindi dal pH), dal rapporto molare tra l'acqua ed il TEOS e dal solvente impiegato. Nella figura 1.5 vengono riportate solamente le reazioni catalizzate in ambiente basico, essendo questa una delle condizioni di sintesi seguite durante il lavoro di tesi.

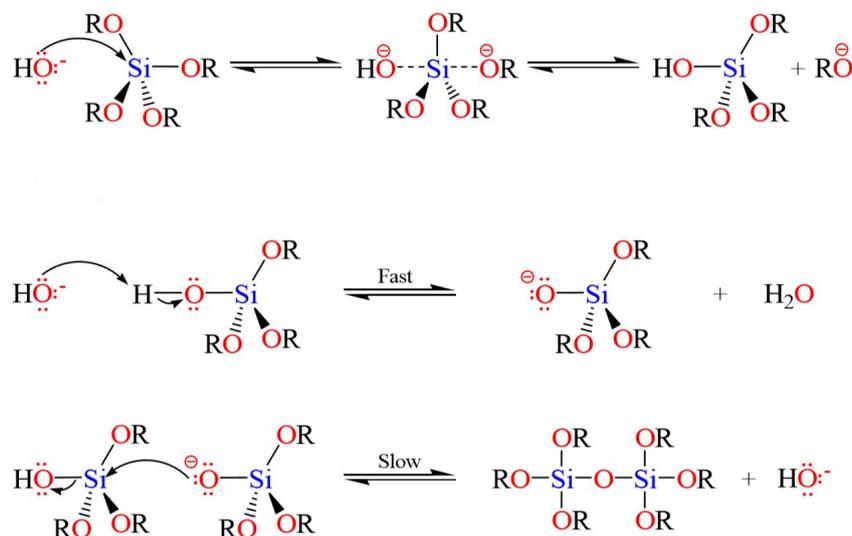


Figura 1.5: Reazioni di idrolisi e condensazione in ambiente basico

Il catalizzatore basico (in questo caso lo ione ossidrile) si comporta da nucleofilo e attacca l'atomo di silicio del TEOS, parzialmente carico positivamente a causa dei quattro ossigeni laterali a cui è legato. Il risultato dell'attacco nucleofilo è la formazione di un silanolo e di uno ione alcossido RO^- . La successiva rimozione del protone del silanolo da

parte dello ione idrossido porta alla formazione dello ione silicio e di acqua. L'attacco dello ione silicio sul silicio centrale di un'altra molecola di silanolo forma un legame silossanico e si ha la rigenerazione del catalizzatore ione idrossido. Mentre l'attacco nucleofilo è rapido, la reazione di condensazione è uno stadio lento e determina complessivamente la velocità di reazione.

La scelta del catalizzatore influenza sia le velocità di reazione sia il pH della soluzione di sintesi: mentre a pH neutro le velocità relative di idrolisi e condensazione hanno un andamento inverso, a pH basico l'andamento delle due reazioni tende a coincidere. Questo influenza anche altri aspetti della silice come morfologia e dimensione delle particelle. Per esempio, nello studio condotto da Cai *et al.* con diversi catalizzatori e vari livelli di pH, è stato possibile ottenere silici mesoporose altamente ordinate solo in uno stretto range di pH, avvalorando l'importanza del pH nel processo di sintesi [8].

1.3 Meccanismo di formazione delle MCM-41

Comprendere quale sia il corretto meccanismo di formazione delle porosità nelle silici è essenziale per poter ottenere particelle con le caratteristiche morfologiche e strutturali per le applicazioni finali desiderate. Inizialmente, i ricercatori della Mobil suggerirono che le MCM-41 si formassero attraverso un meccanismo in cui una mesofase di cristalli liquidi agiva da *templating agent* direzionando la deposizione della silice [3]. In quest'ottica il *templating* è definito come il processo per cui una specie organica funge da struttura centrale attorno al quale le molecole di ossido si organizzano, cosicché rimuovendo la struttura del templante, le sue caratteristiche geometriche vengono replicate dal nuovo materiale. Altri meccanismi di formazione propongono che siano invece le stesse molecole di TEOS parzialmente idrolizzato a guidare la disposizione del surfattante in micelle ordinate. Un altro meccanismo ancora, noto con il nome di *swelling-shrinking mechanism*, si basa sulla possibilità che le molecole di TEOS essendo lipofile possano posizionarsi inizialmente all'interno delle micelle rigonfiandole (*swelling*) e solo in seguito alle reazioni di idrolisi, in cui diventano molecole negative e idrofile, si spostino nell'ambiente acquoso adsorbendosi sulla superficie delle micelle e contraendole (*shrinkage*) [9]. Sebbene i primi due meccanismi siano quelli che vengono maggiormente riportati nei documenti scientifici, il terzo potrebbe introdurre delle criticità quando all'interno delle micelle si trovano altre molecole, ad esempio quelle di un farmaco: vi è infatti la possibilità che nelle fasi iniziali il TEOS trovandosi nello stesso ambiente del farmaco possa interagire con esso.

Indipendentemente dal meccanismo suggerito, nel caso dei materiali mesostrutturati le specie organiche servono a generare lo spazio di quelli che saranno i futuri pori (una volta rimosso il surfattante) su cui l'ossido cristallizza, come rappresentato in figura 1.6.

Nelle silici mesoporose, oltre al ruolo di riempitivo per i pori, esiste un'interazione tra la forma finale assunta dal reticolo di ossido e quella della specie organica. Così, il reticolo finale può riflettere la geometria della struttura micellare iniziale. Pertanto, la stessa molecola organica può essere utilizzata per sintetizzare una varietà di strutture e pori diverse. Generalmente, questo tipo di approccio si basa sul *self-assembly* o *auto-assemblaggio*, un processo in cui un sistema disordinato di componenti preesistenti forma una struttura organizzata come conseguenza di specifiche interazioni locali tra i componenti

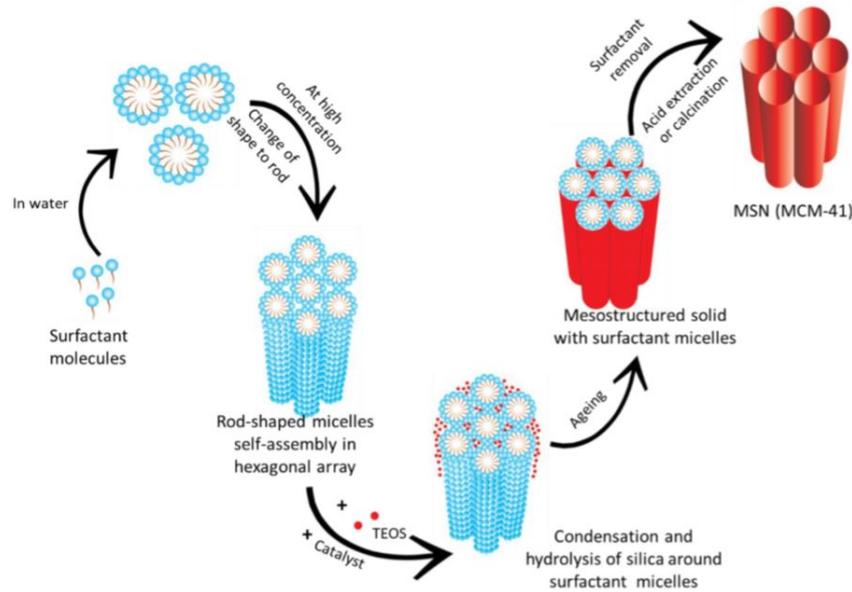


Figura 1.6: Meccanismo di *self-assembly* nelle MCM-41

stessi, senza l'influenza di azioni esterne. Quando i componenti costitutivi sono molecole, il processo è chiamato auto-assemblaggio molecolare.

1.3.1 Ruolo del surfattante

I materiali mesoporosi sono stati sintetizzati utilizzando surfattanti (o tensioattivi) anionici, cationici, neutri. I surfattanti sono composti chimici anfifilici che a concentrazioni molto basse sono presenti in soluzione principalmente come molecole isolate. Al di sopra di una certa concentrazione, detta *Concentrazione Critica Micellare* (CMC), le singole molecole si combinano insieme a formare delle micelle isotropiche. La micellizzazione è un processo termodinamico: l'abbassamento di entropia dovuto alla formazione delle micelle è compensato da un aumento complessivo di entropia dovuto alla liberazione di molecole di acqua "intrappolate" tra le catene idrofobiche che acquistano maggiore libertà di movimento [10].

Aumentando ulteriormente la concentrazione del surfattante è possibile indurre la formazione di altre mesofasi ovvero strutture simili alle micelle ma disposte in forme diverse, come possibile vedere in figura 1.7.

Il passaggio alla fase micellare è un processo influenzato, oltre dalla CMC, da altri numerosi fattori come la temperatura, il pH, la natura del solvente, la forza ionica della soluzione e la presenza di altre molecole. La stessa formazione di una particolare mesofase ad una determinata concentrazione è condizionata dalla natura del surfattante stesso, dipendendo dalla lunghezza della catena alchilica e dalla carica del gruppo di testa e dalla forza del controione nel caso di surfattanti ionici. La formazione di una mesofase nelle silici mesoporose è la diretta conseguenza dell'interazione tra le molecole di surfattante e quelle delle specie inorganiche ed è governato principalmente da diverse forze come le interazioni deboli non covalenti (forze di Van der Waals, legami a idrogeno, interazioni elettrostatiche) tra il tensioattivo o le loro strutture supramolecolari e le molecole del precursore. A

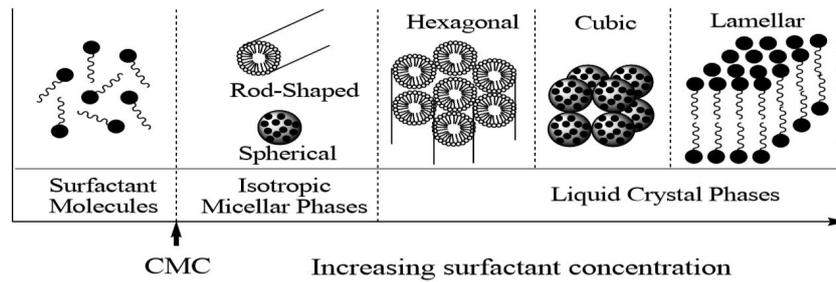


Figura 1.7: Cambiamento di fase del surfattante in funzione della concentrazione

pH basico l'interazione è tra la silice negativa (essendosi deprotonato l'ossidrilico a O^-) e la testa cationica del surfattante (figura 1.8) ed il meccanismo di *templating-agent* può essere riassunto nei seguenti punti:

1. All'interno della soluzione le molecole di surfattante si dispongono in micelle e, a seconda della concentrazione assumono, forma sferica o a bastoncino (*rod-like*). Le micelle formano degli aggregati esagonali ma la carica superficiale impedisce elettrostaticamente che questi aggregati condensino tra di loro.
2. Il TEOS subisce le prime reazioni di idrolisi e condensazione; piccoli oligomeri di silice negativi si adsorbono sulle micelle positive del surfattante riducendone la carica superficiale e avvicinando le micelle.
3. Al termine delle reazioni di condensazione e di consolidamento (ageing) si ottiene una struttura solida mesostrutturata formata da silice e micelle di surfattante.
4. Attraverso un'estrazione tramite solvente o tramite un processo termico (calcinazione) è possibile rimuovere il surfattante ottenendo esclusivamente una silice mesoporosa inorganica.

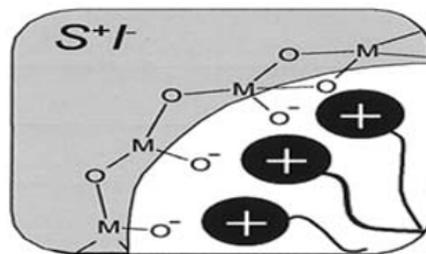


Figura 1.8: Interazione SiO^- - Surfattante cationico

1.4 Silici mesoporose come sistemi per il rilascio di farmaco

Le micro e nanoparticelle di silice mesostrutturata, dopo la rimozione del surfattante, sono note per essere dei potenziali *carrier* per il rilascio di farmaco grazie alle seguenti caratteristiche:

- Porosità ordinata e omogenea nelle dimensioni: è possibile controllarla variando le condizioni di sintesi. Ha notevole influenza nel caricamento del farmaco e nel suo successivo rilascio;
- Volume poroso elevato: in grado di ospitare al suo interno un quantitativo di farmaco.
- Area superficiale elevata: maggiori possibilità di adsorbimento del farmaco.
- Silanoli che possono essere funzionalizzati per permettere un migliore controllo del caricamento del farmaco e del suo rilascio [11].

In questa sezione verranno descritti i principali fattori che hanno un ruolo nel processo di caricamento e di rilascio del farmaco da una silice mesoporosa.

1.4.1 Dimensione delle particelle

La dimensione delle particelle riveste un ruolo molto importante nelle applicazioni in campo biomedicale, si pensi ad esempio al ruolo che ricopre la dimensione della particella nel regolare la possibilità o meno di attraversare una barriera biologica. Tutti i fattori che possono influenzare le cinetiche di reazione dell'idrolisi e della condensazione, come il pH della soluzione o la presenza di sali disciolti in soluzione, hanno conseguenza sulla dimensione delle particelle. In particolare l'accelerare l'idrolisi e la condensazione permette di ottenere particelle di dimensione più piccola [2].

La fase di caricamento del farmaco è una fase cruciale nella preparazione della particella. Il fisioadsorbimento è il fenomeno fisico più semplice, ma non per questo meno efficace, e si basa sull'adsorbimento di molecole sulla superficie della silice. Le molecole di silice sulla superficie del materiale vengono idratate facilmente ottenendo dei silanoli. A seconda della concentrazione superficiale di silanoli la superficie della silice (interna ed esterna) diventa più o meno idrofilica, un aspetto sicuramente da valutare nel tentativo di incorporare farmaci idrofobici. I silanoli possono essere sfruttati anche per successive funzionalizzazioni, utili per aumentare le interazioni con le molecole del farmaco.

1.4.2 Taglia dei pori e Connettività

La dimensione dei pori è uno dei principali parametri che determina la possibilità di incorporare un farmaco agendo da ostacolo fisico; il diametro dei pori agisce come un setaccio molecolare determinando se un farmaco può penetrare all'interno dei pori [12]. Sebbene un diametro dei pori poco più grande della molecola risulti teoricamente sufficiente per l'incorporazione [11], questo non garantisce che possa effettivamente avvenire, perchè esistono altri fattori che influenzano l'effettivo passaggio attraverso le porosità. La molecola possiede infatti un suo ingombro sterico che tiene conto dei fenomeni di repulsione elettrostatica

tra nubi elettroniche. Queste repulsioni possono avvenire tra la molecola del farmaco e la silice o con eventuali altre molecole già presenti all'interno dei canali del materiale, impedendone di fatto il passaggio.

La taglia dei pori può essere modificata variando il tipo di surfattante usato durante sintesi secondo il principio che, mantenendo gli altri parametri di sintesi costanti, maggiore è la lunghezza della catena del surfattante utilizzato e maggiore sarà la dimensione dei pori [13]. Scegliendo l'opportuno surfattante è possibile far variare la dimensione dei pori da pochi nanometri fino a decine di nanometri [2].

Quando i materiali mesoporosi sono utilizzati come sistemi per il rilascio di farmaco, la dimensione dei pori è un fattore fondamentale non solo per la fase di caricamento ma anche per quanto riguarda il suo rilascio, sia per le strutture bidimensionali (MCM-41) sia per quelle tridimensionali (MCM-48). Gli studi condotti dalla Prof.ssa Vallet-Regí e dal suo team di ricerca hanno dimostrato che a parità di farmaco caricato (nei casi in esame l'ibuprofene), le silici con pori più grandi hanno permesso un rilascio maggiore di farmaco [11].

Nella diffusione del farmaco attraverso una matrice porosa, tra i fattori da considerare in aggiunta alla dimensione dei pori vi sono la loro connettività e la disposizione dei canali. Per quanto riguarda il secondo aspetto, la "tortuosità" dei canali non sembra influenzare in modo molto evidente la velocità di rilascio del farmaco [14]. Al contrario, la connettività dei pori sembra rivestire un'importanza maggiore: le strutture che contengono dei pori disposti come "cage-like" (in gabbie) sembrano essere delle ottime matrici per un rilascio prolungato del farmaco.

1.4.3 Area superficiale

La superficie è il luogo in cui le interazioni tra i gruppi funzionali superficiali del materiale e le molecole del farmaco permettono l'effettivo adsorbimento del farmaco, confinandolo all'interno dei pori. Il processo di caricamento del farmaco si basa principalmente sulle proprietà adsorbenti dei materiali mesoporosi. Sia i carichi idrofili che quelli idrofobici possono essere incorporati nei pori [2].

La quantità di farmaco caricato può essere modificata seguendo due approcci diversi:

- aumentare/diminuire l'area superficiale;
- modificare l'affinità superficie-farmaco.

Il primo approccio comporta un aumento di superficie disponibile per le molecole del farmaco. Di conseguenza, così come la dimensione dei pori influenza la possibilità di incorporare o meno il farmaco, una maggiore superficie a disposizione permette di adsorbire un quantitativo più ingente di farmaco [11]. Nel secondo approccio, aumentare l'intensità delle interazioni superficie-farmaco influenz anche il successivo profilo di rilascio. Le molecole sono confinate all'interno dei pori tramite interazioni attrattive con le pareti interne dei pori. Diversi esperimenti hanno dimostrato che, a parità di *carrier* e farmaco, quando l'area superficiale è molto grande si ha una maggiore ritenzione del farmaco a causa delle molteplici interazioni possibili che si instaurano [12].

1.4.4 Volume poroso

Il volume di pori determina in prima battuta il quantitativo massimo di farmaco che il materiale può incorporare. Dopo l'iniziale fenomeno dell'adsorbimento che coinvolge solo la superficie, è possibile che un'aggiunta ulteriore di farmaco porti al riempimento dei pori del materiale. In questo caso, il volume dei pori diventa un fattore chiave nel determinare il quantitativo massimo di farmaco incorporabile [11].

A causa del loro ampio volume dei pori, le particelle micro e nanoporose possiedono intrinsecamente una maggiore capacità di caricamento rispetto ad altri vettori. Tuttavia, è stato svolto un ampio lavoro per migliorare ulteriormente il caricamento dei farmaci; la sintesi di nanoparticelle di silice mesoporosa cave (HMSN) ne è un esempio. Per ottenere la cavità, un *templating agent* viene usato per formare il core della particella attorno al quale si forma lo shell di silice; successivi trattamenti permettono di rimuovere il core ottenendo la particella cava. Il loro grande volume cavo è in grado di contenere un'elevata quantità di farmaco rispetto alle sue controparti non cave. L'aumento di volume disponibile delle HMSN ha permesso in alcuni casi di incorporare fino al 100% in più di farmaco rispetto alle silici mesoporose tradizionali [2].

1.4.5 Funzionalizzazione dei pori

Una tecnica utile per modificare le proprietà fisiche e chimiche delle silici mesoporose è l'incorporazione di specie organiche e inorganiche sia sulla superficie del silicato sia all'interno del *bulk*. La superficie della silice è caratterizzata da un'elevata presenza di silanoli. Il gruppo ossidrilico è chimicamente sia un donatore sia un accettore di legami a idrogeno verso altri atomi (azoto e ossigeno) e può essere facilmente fatto reagire con altri gruppi funzionali. I gruppi funzionali possono essere incorporati nel materiale tramite *grafting* (reazioni chimiche post sintesi) o per co-condensazione durante la sintesi. Questa tecnica, che prende il nome di funzionalizzazione, permette di regolare le proprietà superficiali come l'idrofilicità, acidità o più in generale la reattività del materiale.

Le sfide nell'utilizzare le particelle di silice mesoporose come *carrier* per i farmaci includono come raggiungere un rilascio controllato in vivo e come migliorare l'efficacia del *carrier*.

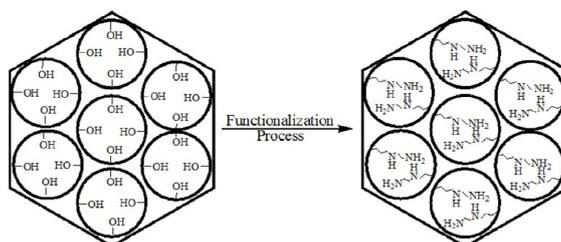


Figura 1.9: Esempio di funzionalizzazione superficiale

In ambito farmacologico la funzionalizzazione interessa sia la fase di caricamento del farmaco sia il suo rilascio [15]. In particolare, il profilo di rilascio dei farmaci dipende principalmente dalla capacità di diffondere attraverso i pori. Il fattore decisivo nel controllare il rilascio è il tipo di interazione che si instaura tra la molecola del farmaco e i gruppi

superficiali del materiale. Le interazioni di van der Waals o i legami a idrogeno avranno, ad esempio, una capacità di ritenzione del farmaco minore rispetto ai legami covalenti. La funzionalizzazione agisce principalmente su tre aspetti:

- essendo le dimensioni e la tortuosità dei pori associati alla struttura interna della matrice, se modificati, si influenza la diffusione delle molecole all'interno dei pori stessi. La funzionalizzazione comporta una diminuzione del diametro e del volume dei pori e se non è eseguita in maniera corretta è possibile che i pori si chiudano del tutto, impedendo il caricamento e/o rilascio del carico [14] e di conseguenza anche la cinetica di rilascio del farmaco viene rallentata [12];
- l'idrofilicità della silice può diminuire fino a convertirsi in una matrice idrofobica, se si introduce un numero sufficiente di gruppi funzionali idrofobici, o viceversa può essere aumentata se si includono nuovi gruppi idrofilici;
- i gruppi funzionali introdotti possono essere utilizzati per legare la molecola del farmaco alla matrice tramite legami ionici o attraverso legame estere [11].

Capitolo 2

Curcumina

2.1 Introduzione

La curcumina è un metabolita secondario, costituente della spezia asiatica chiamata curcuma. È il principale pigmento¹ naturale estratto dal rizoma della pianta della *Curcuma Longa* che viene macinato per ottenere la caratteristica polvere di colore giallo-arancio. Isolata per la prima volta nel 1815, la sua struttura chimica è stata confermata solo un secolo più tardi con le prime sintesi di successo [16]. Appartiene ad un gruppo di sostanze meglio note come "curcuminoidi" (tutte presenti nel rizoma), di cui fanno parte la dime-tossicurcumina, la bi-dimetossicurcumina e la curcumina ciclica; la curcumina è comunque la sostanza presente in percentuale maggiore (65%-85% in massa).

È una sostanza comunemente usata come spezia, conservante alimentare e colorante (Giallo naturale 3, E100) ma è soprattutto nota per essere presente da millenni nelle medicine alternative orientali dove viene proposta per il trattamento di numerosi disturbi come stati infiammatori, problemi alimentari e, più in generale, per il trattamento di malattie croniche. Fino agli anni '70 sono stati pubblicati pochi documenti scientifici sulla chimica della curcumina e dei curcuminoidi, sebbene se ne evidenziassero già i possibili usi come antiossidante [17]. Nel 1995 il lavoro di Aggarwal *et al.* mostrò per la prima volta i potenziali usi della sola curcumina come agente anticancerogeno [18], aumentando notevolmente l'interesse della comunità scientifica verso questa sostanza (al 2014 si contavano più di 14000 pubblicazioni a riguardo) [19]. A differenza di altri prodotti naturali presenti nelle medicine etniche, la curcumina continua ad alimentare un forte interesse.

Per ottenere la curcumina è necessario lavorare (dopo averlo bollito e fatto essiccare) il rizoma macinato, separando la sostanza di interesse dalle altre (principalmente i curcuminoidi). La domanda crescente di curcumina, motivata sia dall'uso che ricopre nella dieta di molti paesi orientali sia per il crescente interesse nel campo medico, stimola la ricerca di metodi di estrazione sempre più efficienti. Dal momento che la curcumina è scarsamente solubile in acqua e poco solubile in solventi organici (ad eccezione dell'acetone, dell'acido acetico, dell'acetonitrile e di alcoli leggeri come l'etanolo), l'estrazione tramite solvente e la

¹Un pigmento è un materiale che cambia il colore della luce riflessa o trasmessa come conseguenza di un assorbimento selettivo di una lunghezza d'onda.

successiva separazione con cromatografia in colonna rimangono tra le tecniche più utilizzate per separare la curcumina dalle restanti sostanze. I solventi clorurati, anch'essi in grado di solubilizzare molto bene la curcumina, sono poco tollerati dall'industria alimentare [19]. Altre tecniche utili per l'estrazione della sostanza, ritenute "tecniche green", riguardano l'uso della CO₂ supercritica, i solventi autorizzati per uso alimentare o, come riportato in alcuni lavori di ricerca, l'utilizzo di enzimi (α -amilasi e glucoamilasi), sebbene quest'ultima tecnica sia molto più costosa e commercialmente non disponibile [20] [21] [22].

Negli ultimi anni il settore che ha tratto più beneficio dall'introduzione della curcumina è sicuramente quello alimentare, in cui le proprietà antiossidanti di questa sostanza vengono sfruttate nei costituenti alimentari e negli integratori della dieta. Sebbene diversi studi abbiano mostrato l'azione della curcumina su una moltitudine di bersagli molecolari differenti, è anche riconosciuto il fatto che spesso le interazioni con le singole molecole non si traducono in chiari benefici per la salute a livello sistemico. Per i futuri e promettenti utilizzi, la curcumina è spesso chiamata con il termine *golden spice* ma la sua scarsa solubilità in acqua e la farmacocinetica non favorevole sono ben note per essere le sue più grandi limitazioni all'uso in campo medico. Per questo motivo l'interesse scientifico si sta spostando verso il miglioramento della farmacocinetica della curcumina e dei sistemi per rilascio all'interno dell'organismo [23] [24].

2.2 Struttura chimica della curcumina

Le proprietà chimico-fisiche della curcumina sono da ricercarsi nella particolare struttura della sua molecola. La ricerca sulla curcumina non è confinata al solo mondo biologico ma si allarga anche ad altri campi di applicazione. Ad esempio, i chimici utilizzano le sue capacità di chelazione dei metalli per formare nuove entità strutturali con attività biochimiche modificate mentre le proprietà spettroscopiche (assorbimento e fluorescenza) possono essere utilizzate per studiare le sue interazioni con altre molecole, organiche o inorganiche. Altri studi riguardano la sua reattività chimica con le specie reattive dell'ossigeno (ROS), le reazioni di addizione, degradazione e la formazione di nanoconiugati e nanoformulazioni [19].

A causa della vasta gamma di attività biologiche osservate per la curcumina, non vi è dubbio di quanto sia importante conoscerne la struttura chimica intrinseca al fine di comprenderne le proprietà e le interazioni possibili con le altre molecole. Il nome chimico della molecola definito dalla IUPAC è: (1E,6E)-1,7-bi(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione ma è nota più semplicemente come *diferuloilmetano*². La sua formula chimica è C₂₁H₂₀O₆, ha un peso molecolare di 368.38 g mol⁻¹ ed una temperatura di fusione di ≈ 180 °C.

All'interno della molecola si individuano due gruppi funzionali (figura 2.1):

- due gruppi arile sostituiti con un gruppo metossi in posizione *para* ed uno ossidrilico in posizione *orto*. La presenza del gruppo ossidrilico legato all'anello aromatico fa rientrare la curcumina nel gruppo dei polifenoli;

²in questo caso il carbonio metilene centrale viene numerato come C-1

- un gruppo α - β -dichetone;

uniti tra loro da un ponte α,β -insaturo di sette atomi di carbonio. Il nome comune (difereuloilmetano) sottolinea la simmetria formale della molecola e le caratteristiche fenoliche tipiche del composto.

Il nome IUPAC non identifica tuttavia una caratteristica della molecola della curcumina: l'equilibrio tra l'isomero chetonico e quello enolico. Le molecole che contengono il gruppo dichetone sono soggette infatti alla tautomeria cheto-enolica: una rapida conversione dalla forma chetonica a quella enolica (figura 2.1), caratteristica di tutte le specie carboniliche che abbiano almeno un atomo di idrogeno legato al carbonio in posizione α rispetto al gruppo funzionale. La forma chetonica è solitamente quella presente in percentuale maggiore ma nel caso degli α - β -dichetone la percentuale della forma enolica aumenta [25].

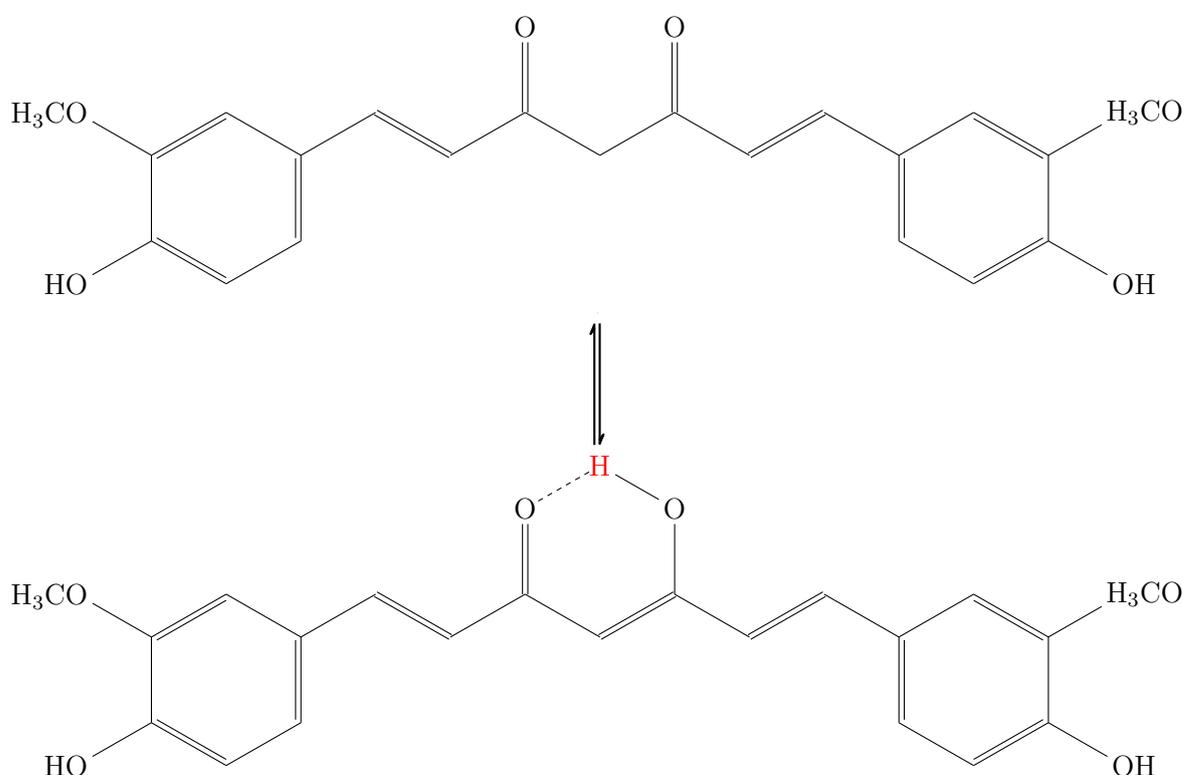


Figura 2.1: Tautomeria cheto-enolica

Studi approfonditi di risonanza magnetica nucleare (NMR) in soluzione hanno confermato che nella maggior parte dei solventi organici non polari o debolmente polari la curcumina si presenta prevalentemente sotto forma di tautomero enolico (con una differenza di circa 5-8 kcal/mol) mentre in solventi polari, specie se protici, ma anche a pH acidi l'esistenza della forma chetonica torna prevalente [26]. Allo stato solido la forma enolica è pressochè l'unica presente [27]. La prevalenza della forma enolica nella curcumina allo

stato solido³ è imputabile a due fattori:

1. La forma enolica è fortemente stabilizzata dalla possibilità di instaurare un legame idrogeno intramolecolare tra l'ossigeno carbonilico e l'idrogeno enolico. In quest'ottica, nei solventi polari protici la possibilità di instaurare legami a idrogeno interferisce con il legame intramolecolare destabilizzando la forma enolica.
2. Il tautomero enolico è disposto planarmente e in questa conformazione la nube elettronica si distribuisce lungo tutta la molecola (risonanza elettronica), interessando anche i due anelli aromatici. La forma chetonica è invece piegata e l'interruzione della risonanza rende più instabile l'isomero [28].

Dal punto di vista chimico la curcumina può essere considerata un acido debole di Brønsted: sia i gruppi fenolici che i gruppi enolici hanno infatti protoni che all'aumentare del pH della soluzione diventano ionizzabili. Sulla base di studi sperimentali e teorici nella determinazione delle costanti di acidità diversi autori hanno riportato valori differenti, soprattutto per quanto riguarda i due gruppi fenolici che resituiscono valori molto simili (tabella 2.1); un risultato comune a tutti i lavori è sicuramente quello di aver individuato nell'idrogeno enolico quello più acido⁴ e con il pKa più basso.

Tabella 2.1: pKa - Curcumina

	pKa
Cur ⁻	7.7-8.5
Cur ²⁻	8.5-10.4
Cur ³⁻	9.5-10.7

Gli anelli aromatici rendono la molecola della curcumina idrofobica ($\text{Log}P \approx 3$)⁵ con una solubilità in acqua (a pH neutro o acido) pressoché nulla mentre in soluzioni acquose basiche la solubilità della molecola aumenta [23].

La curcumina, essendo un pigmento, ha un forte assorbimento nella regione della luce visibile con un massimo situato tra i 410 nm e i 430 nm ($\epsilon = 55\,000 \text{ dm}^3/\text{mol}/\text{cm}$ in metanolo), dovuto al sistema di doppi legami coniugati, ma presenta un assorbimento notevole anche nella regione dell'ultravioletto associato all'unità ferulica, intorno ai 265 nm [29]. In seguito alla deprotonazione, la forma Cur^{3-} subisce un effetto batocromo con spostamento delle bande di assorbimento verso lunghezze d'onda maggiore ($\approx 467 \text{ nm}$), assumendo un intenso colore rosso scuro [19]. L'effetto batocromo è reversibile e il ritorno al tradizionale

³La maggiore presenza di una o dell'altra forma è comunque influenzata molto dall'ambiente in cui si trova la molecola

⁴Per l'equazione di Henderson-Hasselbalch a $\text{pH} < \text{pKa}$ la molecola sarà protonata, per $\text{pH} > \text{pKa}$ sarà deprotonata [25].

⁵Il coefficiente di partizione rappresenta il rapporto tra le concentrazioni di un composto all'interno delle due fasi di una miscela di due liquidi immiscibili all'equilibrio. I valori assunti da $\text{Log}(P)$ sono tipicamente negativi per sostanze ad alto carattere idrofilo, mentre sono positivi e via via crescenti all'aumentare del carattere idrofobo

colore giallo-arancio può essere assunto come prova dell'effettiva riprotonazione della molecola. In letteratura è anche stato dimostrato che il contributo all'assorbimento dei prodotti di degradazione della curcumina è minimo rispetto all'assorbimento dovuto alla molecola integra e la diminuzione dell'intensità del picco principale di assorbimento nel tempo è indicativo della degradazione della molecola [30]. Le spiccate proprietà spettroscopiche possono essere usate non solo per quantificare la concentrazione della curcumina, ma anche valutarne lo stato (protonata/deprotonata, integra/degradata). Di solito, infatti, gli UV permettono di quantificare una sostanza, ma solo in alcuni casi specifici (come per la curcumina) permettono anche di dedurre informazioni sullo stato della molecola.

2.3 Reattività della molecola di curcumina

La molecola della curcumina ha tre gruppi funzionali reattivi: il gruppo dicitone e i due gruppi fenolici. Le reazioni chimiche che coinvolgono la molecola in attività biologiche sono reazioni di donazione dell'ossigeno che portano all'ossidazione della curcumina, l'addizione nucleofila reversibile e irreversibile (Reazione di Michael), l'idrolisi e le reazioni enzimatiche.

Nelle sezioni seguenti saranno presi in considerazione due esempi di particolare interesse: l'azione antiossidante ed il processo degradativo *in vivo*.

2.3.1 Attività antiossidante

Uno dei requisiti fondamentali di un antiossidante è quello di convertire efficacemente le specie reattive dell'ossigeno (ROS), in specie meno reattive. I ROS consistono sia in radicali liberi sia in molecole ossidanti; i primi sono coinvolti in reazioni di rimozione di idrogeno e in reazioni di trasferimento di elettroni. Lo squilibrio tra le specie ossidanti e quelle antiossidanti è ritenuto tra le cause dello *stress ossidativo*.

Studiando la reattività della curcumina è stata osservata la sua eccellente capacità di agire come "spazzino" per la maggior parte dei ROS. Per questo motivo la curcumina è classificata come un polifenolo naturale. Tutte e tre i gruppi funzionali della molecola, infatti, possono subire ossidazione da parte dei ROS; in particolare l'idrogeno più facilmente rimuovibile è quello presente nei due gruppi fenolici.

Una tipica reazione di ossidazione è la perossidazione lipidica portata avanti dai radicali perossili. A concentrazioni fisiologiche, i radicali agiscono contro gli agenti patogeni quali germi o batteri, danneggiando la loro membrana cellulare. Tuttavia, in caso di squilibrio l'azione dei radicali si ritorce contro le cellule dell'organismo danneggiandole. La proprietà antiossidante della curcumina si manifesta dal momento che i radicali fenossilici risultanti prodotti dalla reazione di ossidazione sono meno reattivi dei ROS grazie alla possibilità di distribuire la carica elettrica lungo tutta la molecola mediante risonanza elettronica (figura 2.2). La maggiore stabilità dei radicali fenossilici, prodotti dalla reazione di ossidazione, rallenta il processo ossidativo [19].

I radicali fenossilici possono essere successivamente rigenerati da altri antiossidanti come l'acido ascorbico e la vitamina E, ripristinando la molecola della curcumina e reimmettendola in un circolo virtuoso. Studi sull'attività antiossidante hanno evidenziato che i derivati della curcumina (curcuminoidi o sintetici) non aventi proprietà fenoliche non mostrano attività antiossidante e quindi la componente fenolica è essenziale per l'attività antiossidante

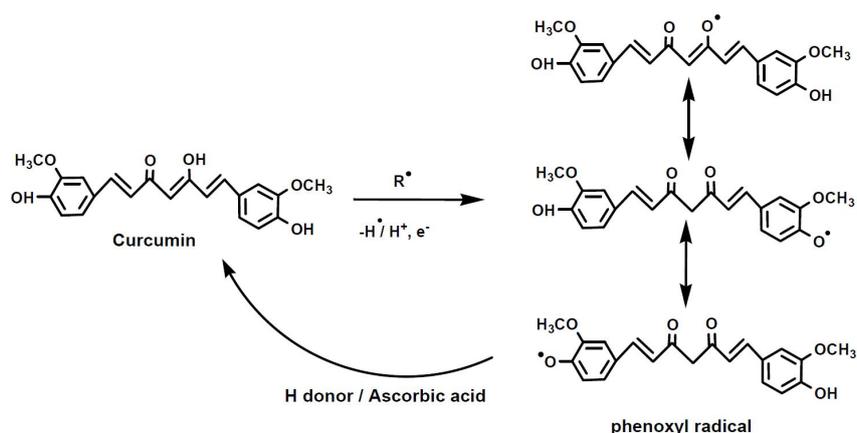


Figura 2.2: Azione anti-ossidante della curcumina

complessiva della curcumina, dimostrazione del corretto inserimento della sostanza tra i polifenoli naturali.

2.3.2 Degradazione in vivo

Diversi studi hanno valutato il metabolismo della curcumina negli animali e negli esseri umani. Una volta assorbita nei tessuti, la curcumina è soggetta principalmente a reazioni di coniugazioni come la solfatazione e la glucuronazione. Gli organi principali responsabili del metabolismo della molecola sono il fegato e i reni. I prodotti di degradazione cambiano a seconda della modalità di assunzione della curcumina:

- Via orale: la curcumina può subire glucuronazione con il conseguente aumento della solubilità in acqua della molecola coniugata (curcumina glucuronide) che favorisce l'espulsione dall'organismo o può subire solfatazione, favorendo anche in questo caso l'espulsione.
- Via endovenosa/intraperitoneale: la molecola subisce una serie di reazioni di riduzione fino ad ottenere prodotti a più basso peso molecolare come l'acido ferulico o la vanillina.

Sulla possibilità che i metaboliti della curcumina preservino ancora le attività della molecola iniziale vi sono pareri discordanti: alcuni ricercatori hanno evidenziato che la coniugazione della curcumina o la riduzione in molecole più piccole può diminuire alcune proprietà farmacologiche ed accentuarne di altre. La scarsa biodisponibilità dei metaboliti della curcumina per tempi prolungati contribuisce a rendere poco chiare le possibili proprietà benefiche di queste molecole [27].

2.4 Sistemi nanotecnologici per la somministrazione di curcumina

La curcumina viene utilizzata in tutto il mondo in molte forme diverse e per molteplici e potenziali benefici per la salute. I test clinici (fase I, 2007) hanno dimostrato che la curcumina è sicura anche ad elevate dosi (fino 12 g al giorno) nella maggioranza dei partecipanti. Alcuni di essi hanno tuttavia segnalato alcuni effetti collaterali come diarrea, cefalea, eruzione cutanea e feci gialle. La *US Food and Drug Administration* (FDA) definisce i curcuminoidi come "Generally Recognized As Safe" mentre il JEFCA⁶ e l'EFSA⁷ limitano la dose massima sicura a 3 mg kg^{-1} di peso corporeo.

Ingerire la curcumina di per sé non porta a benefici per la salute a causa della sua scarsa biodisponibilità, che sembra essere principalmente dovuta allo scarso assorbimento, al metabolismo rapido e alla conseguente rapida eliminazione. Tutti questi impedimenti ne limitano le applicazioni mediche ma hanno spinto al contempo i ricercatori a sviluppare nuove strategie di somministrazione. Alcune di queste si basano sull'aggiunta nei preparati di adiuvanti in grado di bloccare le vie metaboliche della curcumina. L'assunzione contemporanea di piperina, ad esempio, è in grado di aumentare del 2000% la biodisponibilità della sostanza inibendo il processo di glucuronazione a livello epatico e intestinale. Un altro esempio di adiuvante è l'albumina (la proteina presente maggiormente nel plasma sanguigno) che è in grado di formare dei complessi con i farmaci come la curcumina ed è una strategia per aumentarne la solubilità e la biodisponibilità [27].

Le altre strategie di somministrazione sono più sofisticate e prevedono l'utilizzo di *nano-carrier*. Nei successivi paragrafi saranno portati ad esempio alcuni di questi sistemi presenti in letteratura.

2.4.1 Liposomi

I liposomi sono delle piccole vescicole artificiali di forma sferica ottenibili da fosfolipidi non tossici. È stato dimostrato che i fosfolipidi, a causa della loro natura anfifilica, si autoassemblano in strutture chiuse nel momento in cui si trovano in ambiente acquoso. La caratteristica strutturale dei liposomi è la disposizione dei fosfolipidi a formare una membrana a doppio strato: le teste idrofiliche sono rivolte verso gli ambienti acquosi, le catene formano invece un compartimento idrofobico. Questo permette ai liposomi di incapsulare sia molecole idrofiliche nell'ambiente interno in cui è presente la soluzione acquosa sia molecole idrofobiche nel doppio strato fosfolipidico (figura 2.3). Le dimensioni dei liposomi variano di molto a seconda delle condizioni di sintesi e dei materiali scelti e sono comprese tra pochi nanometri fino ad alcuni micrometri, influenzandone il comportamento *in vivo*.

Li *et al.* hanno valutato *in vitro* e *in vivo* la possibilità di utilizzare i liposomi per trasportare la curcumina nel trattamento del carcinoma al pancreas. Comparando gli effetti tra la curcumina pura e quella caricata sui liposomi è stato confermato un aumento della

⁶Comitato misto di esperti delle Nazioni Unite e dell'Organizzazione mondiale della sanità sugli additivi alimentari.

⁷Autorità europea per la sicurezza alimentare.

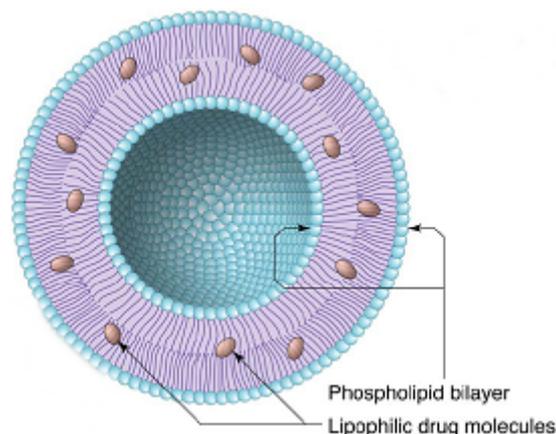


Figura 2.3: Liposomi

biodisponibilità del principio attivo. L'incapsulamento della curcumina all'interno dei liposomi ne permette la somministrazione anche per via intravenosa, bypassando ulteriormente la via metabolica gastro-intestinale [31].

Nello studio di Kunwar *et al.* è stata confrontata la somministrazione in vitro della curcumina tramite l'utilizzo di liposomi o attraverso un complesso con l'albumina, studiando anche l'*uptake cellulare*. I cambiamenti nello spettro della curcumina sono stati utilizzati per determinare le costanti di ripartizione del principio attivo tra i liposomi e l'albumina, confermando che i primi erano in grado di trasportare un maggior quantitativo di curcumina all'interno delle cellule [32].

2.4.2 Micelle

Le molecole anfifiliche (i surfattanti) a concentrazioni superiori alla CMC si aggregano formando le micelle. Una delle proprietà di questi sistemi è la capacità di solubilizzare tra le code del surfattante i farmaci idrofobici altrimenti insolubili in acqua. L'interazione della curcumina con le micelle è stata ampiamente studiata nel caso del bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB) utilizzato come surfattante. Studi di termodinamica hanno mostrato infatti come il passaggio dalla fase acquosa a quella idrofobica è un processo termodinamicamente favorevole [33] mentre studi di spettroscopia hanno suggerito il tipo di interazione tra surfattante e curcumina (figura 2.4) ed evidenziato la capacità di diminuire drasticamente la degradazione della curcumina in ambiente basico [29] [30].

Micelle formate da co-polimeri di ossido di polietilene e policaprolattone sono state proposte per il rilascio controllato di curcumina in un test su topi affetti da melanoma. Lo studio ha dimostrato che questa nanoformulazione ha mantenuto la citotossicità della curcumina verso le cellule cancerogene ma ha ridotto l'assunzione da parte del fegato e dei reni, diminuendo l'azione metabolica dell'organismo e aumentando di conseguenza la biodisponibilità [23].

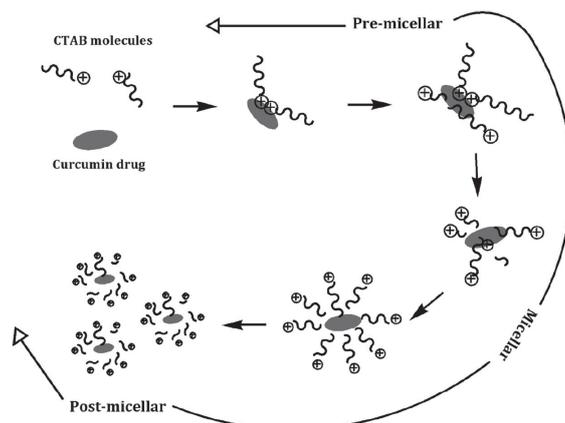


Figura 2.4: Interazione CTAB - Curcumina

2.4.3 Nanoparticelle lipidiche

Per definizione, le nanoparticelle lipidiche solide (SLN) sono costituite da lipidi solidi (a temperatura ambiente), tensioattivi e acqua. Una SLN solida è tipicamente sferica e possiede una matrice solida nel nucleo lipidico che può solubilizzare molecole lipofile. Il nucleo lipidico è stabilizzato a sua volta dal surfattante. Il termine lipidi comprende i trigliceridi, i gliceridi parziali, gli acidi grassi, gli steroidi e le cere. Un potenziale vantaggio dell'SLN è la possibilità di usare lipidi fisiologici che hanno una bassa citotossicità e quindi un minor pericolo di tossicità acuta e cronica [34].

Un'applicazione topica di curcumina basata sul rilascio da SLN è stata proposta da Tiyaboonchai *et al.*: le nanoparticelle lipidiche (dimensione media di 450 nm), hanno dimostrato di essere sufficientemente stabili se conservate a temperatura ambiente fino a 6 mesi, garantendo inoltre un profilo di rilascio prolungato (fino a 12 ore) [35].

2.4.4 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono sistemi formati dall'aggregazione di polimeri biocompatibili e biodegradabili. Questi sistemi si possono presentare sotto forma di sfere nanometriche, nanocapsule o in micelle. I farmaci possono essere incapsulati al loro interno oppure agganciati alla particella.

Un utilizzo di nanoparticelle di acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) contenenti curcumina è stato presentato nel 2017 da Sun *et al.* per il trattamento topico della psoriasi. La psoriasi è una malattia infiammatoria autoimmune che causa nei soggetti colpiti da tale patologia frequente desquamazione, prurito, dolore e la formazione di placche e lesioni cutanee. La curcumina ha dimostrato bioattività nel trattamento della psoriasi mentre il PLGA è un copolimero biodegradabile e biocompatibile utilizzato per fabbricare nanoparticelle per rilascio di farmaco. Testando le nanoparticelle PLGA-curcumina su modelli murini affetti da psoriasi, gli autori dello studio hanno dimostrato un aumento di bioattività della curcumina. La maggior efficacia del trattamento è stata giustificata dall'aumento

di disponibilità del farmaco, dovuto principalmente alla possibilità delle nanoparticelle polimeriche di attraversare la cute danneggiata e rilasciare in modo continuato la curcumina nella zona da trattare [36].

2.4.5 Silici mesoporose

Le silici mesoporose sono proposte per la realizzazione di sistemi di rilascio di curcumina per le loro interessanti proprietà: diametro dei pori regolabile e uniforme, elevata superficie specifica e facilità di funzionalizzazione. Inoltre, nelle applicazioni biomedicali la loro stabilità in ambiente fisiologico e la bassa citotossicità ne avvalorano l'utilizzo.

In un lavoro del 2015 sono state utilizzate delle silici mesoporose di vario tipo (MCM-41, KIT-6 e MSU-2) per veicolare la curcumina verso cellule cancerogene in studi condotti *in vitro*. Dopo la rimozione del surfattante, le silici mesoporose ottenute sono state funzionalizzate con amminosilani. I gruppi amminici superficiali sono stati sfruttati per legare tramite legami a idrogeno le molecole di curcumina, ottenendo percentuali di farmaco caricato maggiori rispetto a silici mesoporose non funzionalizzate. Dai test condotti è risultato un profilo di rilascio lento ma continuo della curcumina dal materiale e un maggiore *uptake* cellulare delle silici mesoporose rispetto alla curcumina libera. A conclusione dello studio è stata rilevata un'azione citotossica verso le cellule cancerogene da parte del sistema silice-curcumina dimostrando le potenzialità di usare questo sistema di rilascio per trattare anche le patologie tumorali [37].

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Materiali

Per la sintesi e le analisi spettroscopiche sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- acqua demineralizzata di grado 3 tramite sistema RO CUBIC 30/d;
- acqua demineralizzata LiChrosolv® per cromatografia, Merck®;
- idrossido di sodio (NaOH), BioXtra, $\geq 98\%$, pellet anidro, Sigma-Aldrich®;
- esadeciltrimetilammonio bromuro ("CTAB", $C_{19}H_{42}BrN$), BioXtra, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich®;
- curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), $\geq 65\%$, in polvere da Curcuma Longa, Sigma-Aldrich®;
- tetraetossisilano ("TEOS", $SiC_8H_{20}O_4$), $\geq 99.995\%$, Sigma-Aldrich®;
- etanolo (C_2H_5OH), Fluka®.

Per la preparazione delle soluzioni tampone per i rilasci sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- etanolo, anidro, Carlo Erba®;
- tampone fosfato salino (PBS), pastiglie, Sigma-Aldrich®;
- cloruro di calcio ($CaCl$), $\geq 99.9\%$, anidro, Merck®;
- cloruro di sodio ($NaCl$), $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich®;
- idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4);
- solfato di magnesio ($MgSO_4$), Redi-Dri™, ReagentPlus®, $\geq 99.5\%$, anidro, Sigma-Aldrich®

3.2 Sintesi

Le particelle di silice mesoporosa ottenute in questo lavoro di tesi sono state sintetizzate seguendo i lavori precedenti di Cai *et al.* e Onida *et al.* [8] [38].

La sintesi non prevede trattamenti termici o di rimozione del surfattante. Le calcinazioni o i lavaggi in solvente organico sono limitati esclusivamente alla preparazione del campione per le successive caratterizzazioni. Le condizioni di sintesi sono quindi blande in quanto si lavora in ambiente acquoso e a temperatura ambiente.

Sono state eseguite un totale di otto sintesi: le prime quattro hanno riguardato il valutare l'effettiva possibilità di ottenere silici mesostrutturati stabili senza processi di consolidazione termica. In questi primi tentativi sono stati modificati solo parametri di sintesi come la velocità di agitazione della soluzione, i tempi di attesa e la modalità di somministrazione dei reagenti. Le ultime quattro sintesi hanno visto l'introduzione della curcumina tra i reagenti, valutando la capacità di caricamento del farmaco all'interno del carrier. La spiegazione in dettaglio dei procedimenti è riportato nei capitoli 4 e 5.

3.2.1 Lavaggi

Tutte le sintesi realizzate hanno previsto, durante la fase di filtraggio della soluzione, un'operazione di lavaggio del precipitato con un volume di acqua pari a quello della soluzione di partenza. In alcuni casi, al fine di caratterizzare il materiale, sono state apportate modifiche ai volumi di acqua utilizzati o al tipo di solvente. Nei capitoli 4 e 5 è riportato con maggior dettaglio questo procedimento.

3.2.2 Calcinazione

La calcinazione è un processo in grado di rimuovere la componente organica (in questo caso il CTAB) in seguito al riscaldamento ad alte temperature del materiale. Nel caso delle silici la calcinazione favorisce inoltre la condensazione dei silanoli. La calcinazione avviene in una muffola Vulcan 3-550 riscaldando il campione fino a 500 °C con una rampa di riscaldamento di 3 °C/min. Dopo un *dwell time* di 2h a 500 °C, la temperatura diminuisce con una rampa di raffreddamento di 40 °C/min fino a 50 °C.

3.3 Tecniche di caratterizzazione

Le indagini svolte durante questa tesi hanno riguardato la caratterizzazione strutturale, morfologica e chimica del sistema realizzato. Di seguito sono descritte le procedure e gli strumenti utilizzati, soffermandosi su alcuni con maggiore enfasi vista l'importanza che hanno ricoperto nella caratterizzazione del materiale.

3.3.1 Diffrattometria a raggi X

Storicamente, la gran parte delle conoscenze sulla disposizione degli atomi e delle molecole nei solidi è il risultato di analisi ai raggi X. Tale analisi permette infatti di determinare le distanze interatomiche e le strutture cristalline dei materiali. La tecnica si basa sul fenomeno della diffrazione: un'onda monocromatica che incontra una serie di ostacoli regolarmente

disposti viene diffusa (diffusione elastica) se la distanza tra gli ostacoli è comparabile con la lunghezza dell'onda incidente. La scelta dei raggi X è motivata dal fatto che sono una forma di radiazione elettromagnetica ad alta energia e con lunghezza d'onda comparabile alla distanza tra gli atomi di un solido [39].

In conseguenza di specifiche relazioni che si stabiliscono tra due o più onde diffuse, è possibile calcolare la distanza tra piani atomici paralleli del cristallo attraverso la Legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta) \quad (3.1)$$

dove (100) è l'indice di Miller per un piano ortogonale all'asse h , d la distanza tra i piani atomici, λ la lunghezza d'onda del raggio incidente, n l'ordine di diffrazione e θ è l'angolo con cui il raggio incide sul materiale. Affinchè la Legge di Bragg sia valida è necessario che tra le onde diffuse, la differenza di percorso ottico in seguito alla diffrazione sia un multiplo intero della lunghezza d'onda ovvero si abbia interferenza costruttiva, come rappresentato in figura 3.1.

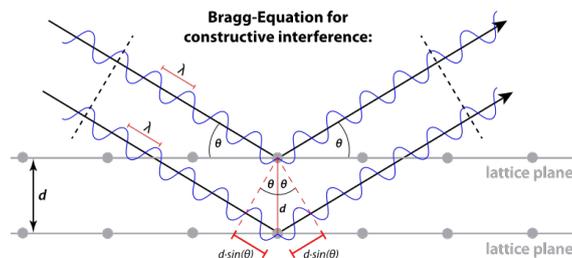


Figura 3.1: Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg

Nei sistemi cristallini esagonali, la distanza tra due piani paralleli può essere ricavata tramite l'equazione:

$$a_0 = \frac{2d_{100}}{\sqrt{3}} \quad (3.2)$$

dove a_0 è il diametro interno dei pori più lo spessore della parete (≈ 1 nm). [40]

Strumento e procedure di laboratorio

Lo strumento utilizzato è il diffrattometro X'PERT3 Panalytical. L'emissione di raggi X avviene da anodo in rame con lunghezza d'onda $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$.

Lo strumento è impostato per operare ad una tensione di 40 kV e ad una corrente di 40 mA. Il campione viene macinato preventivamente mediante un pestello per ottenere una polvere fine e omogenea. Per l'analisi di materiali mesoporosi vengono effettuate due scansioni in range angolari diversi: l'analisi a bassi angoli permette di verificare la presenza di un ordine strutturale a lungo raggio dovuto ai mesopori mentre l'analisi ad alti angoli verifica che la matrice del materiale sia amorfa o cristallina. Nei campioni caricati con la curcumina, l'analisi ad alti angoli viene utilizzata anche per verificare che il farmaco non abbia assunto forma cristallina.

- *Analisi a bassi angoli*
 - range angolare $2\theta=0.7^\circ-10^\circ$;
 - step angolare= 0.0131° ;
 - durata di acquisizione = 75 min;
 - filtro anti-divergenza = 1/32;
 - filtro antiscatter= 1/32.
- *Analisi ad alti angoli*
 - range angolare $2\theta = 5^\circ-60^\circ$;
 - step angolare = 0.0131°;
 - durata di acquisizione = 3 min;
 - filtro anti-divergenza = 1/2;
 - filtro antiscatter= 1/4.

3.3.2 Analisi di adsorbimento di azoto

L'analisi di adsorbimento di azoto è una tecnica che misura la quantità di gas adsorbito su una superficie solida in funzione della temperatura e della pressione parziale dell'adsorbato. Essendo l'adsorbimento un fenomeno superficiale, questa tecnica consente di ricavare parametri del materiale come la superficie specifica, il diametro medio dei pori ed il volume poroso. I dati di adsorbimento ottenuti a temperatura costante vengono rappresentati in curve dette isoterme di adsorbimento.

La IUPAC classifica i materiali porosi basandosi su sei isoterme principali (figura 3.2) [41].

Tipo I

E' l'isoterma utilizzata per descrivere i materiali microporosi. La curva è concava rispetto alle ascisse (favorevole termodinamicamente) e cresce rapidamente per bassi valori di pressione parziale. Questo tipo di isoterma fu teorizzata dall'equazione di Langmuir per descrivere la formazione di un monostrato di adsorbato sulla superficie del materiale. E' presente un "ginocchio" oltre il quale l'andamento della curva raggiunge un plateau ad indicare di fatto che il materiale, formato il monostrato, non è più in grado di adsorbire ulteriore adsorbato.

Tipo II

E' l'isoterma utilizzata per descrivere i materiali macroporosi o non porosi. In questi tipi di materiale è possibile la formazione di multistrati di adsorbato all'interno delle porosità. La curva presenta un punto di flesso in corrispondenza della completa formazione del monostrato ma, a differenza dell'isoterma di tipo I, continua a crescere all'aumentare della pressione fino a divergere per pressioni uguali alla pressione di vapore saturo.

Tipo III e V Sono isoterme poco comuni, utilizzate solitamente per descrivere situazioni in cui le interazioni tra materiale adsorbente e adsorbato sono deboli. Sono curve

entrambe convesse rispetto all'asse delle ascisse (sfavorevoli termodinamicamente). L'isoterma V presenta rispetto alla III un coppia di isteresi associato al meccanismo di riempimento e svuotamento dei pori.

Tipo IV E' l'isoterma utilizzata per descrivere i materiali mesoporosi. La curva ha un andamento simile a quella di tipo II per pressioni basse mentre non diverge per valori di pressione prossimi alla pressione di vapore saturo. La caratteristica più importante di questa curva è la presenza di un coppia di isteresi più o meno accentuato dovuto a fenomeni di condensazione capillare. La condensazione capillare è il fenomeno per cui durante la fase di adsorbimento il gas si dispone in multistrati che, a pressioni di vapore inferiori a quella di vapore saturo, condensano in forma liquida. Nella fase di deadsorbimento il materiale rilascia l'adsorbato a pressione relative più basse (rispetto alla fase di adsorbimento) e questo provoca la forma di un coppia di isteresi.

Tipo VI è l'isoterma utilizzata per descrivere i materiali che presentano uniformità morfologica ed energetica ma non possiedono porosità. La caratteristica di questa curva è l'andamento a "scalini", ad indicare il riempimento di singoli monostato.

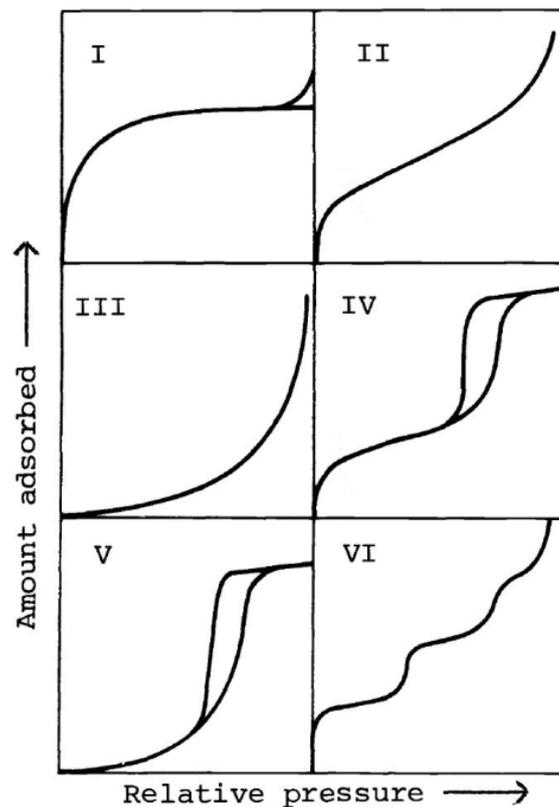


Figura 3.2: Isotherme di adsorbimento

In presenza di condensazione capillare nei materiali porosi, è possibile classificare ulteriormente la struttura dei pori basandosi sulla forma che assume il ciclo di isteresi (figura 3.3). Nella pratica, la tipologia H1, che ha le due braccia del coppia di isteresi pressochè

verticali e parallele tra loro, è spesso associata a materiali con una distribuzione stretta e regolare dei pori. La curva H2 non è riconducibile ad una distribuzione ordinata quanto piuttosto a pori interconnessi di diversa forma e dimensione. La forma H3, che non presenta alcun limite di assorbimento per valori di P/P_0 che tendono all'unità, è attribuita alla presenza di pori in posizione interstiziale dovuti ad aggregati di particelle disposti in foglietti. Infine, la tipologia H4 viene riferita alla condensazione capillare in pori a fessura stretta [41].

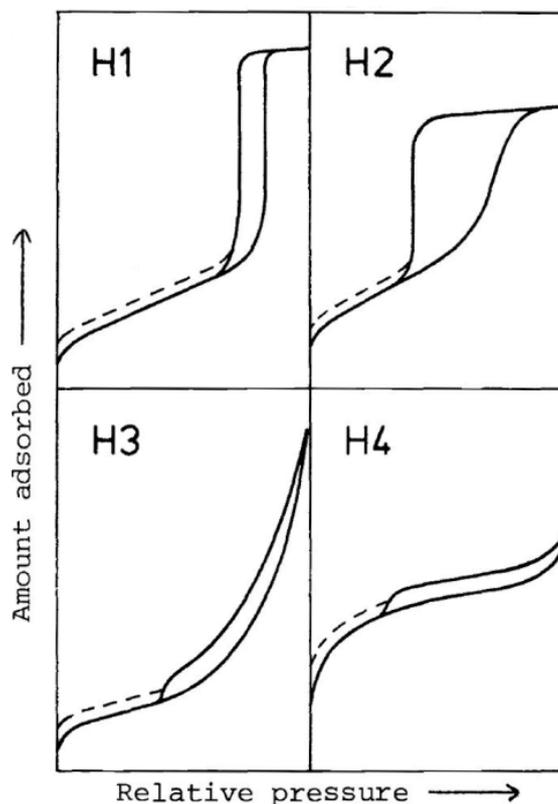


Figura 3.3: Cicli di isteresi.

Strumento e procedure di laboratorio

L'analisi è stata eseguita utilizzando lo strumento ASAP 2020 Plus Micrometrics. Per ricavare il valore dell'area superficiale specifica viene utilizzata l'equazione della curva BET (Brunauer-Emmett-Teller) mentre per determinare la dimensione dei pori viene utilizzata l'equazione DFT (Density Functional Theory).

Per procedere all'analisi è necessario pretrattare il campione: un quantitativo di materiale di ≈ 50 mg viene inserito in una buretta ermetica e subisce una fase di degasaggio a 70°C per 3 ore con l'obiettivo di eliminare i contaminanti o le specie chimiche già adsorbite sulla superficie. A degasaggio avvenuto, viene eseguita l'analisi vera e propria con il ciclo di adsorbimento/deadsorbimento. Utilizzando l'azoto come adsorbato, il ciclo viene effettuato alla temperatura di liquefazione del gas (77 K).

3.3.3 Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica è una tecnica di analisi termica che permette di misurare la variazione di massa di un campione in funzione della temperatura e/o del tempo. È possibile, quando le temperature di decomposizione sono sufficientemente separate tra di loro, associare le variazioni di peso alle singole sostanze presenti nel campione.

La variazione di peso percentuale è calcolata con la seguente equazione:

$$\Delta m = \frac{m_{iniziale} - m_{finale}}{m_{iniziale}} 100 \quad (3.3)$$

Strumento e procedure di laboratorio

Lo strumento utilizzato è DSC/TGA 92-16.18 Setaram.

All'interno di un crogiolo in allumina vengono posti 10-20 mg di campione. Viene impostata una rampa di riscaldamento di 10 °C/min fino al raggiungimento di 800 °C. L'esperimento avviene in atmosfera controllata insufflando nello strumento una miscela di argon e ossigeno utile ad allontanare i prodotti di degradazione volatili.

3.3.4 Spettroscopia FTIR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è una tecnica spettroscopica che permette di ricavare informazioni sulla natura e il tipo di legame chimico presenti in un campione, analizzando l'interazione della radiazione infrarossa con il campione stesso. I legami chimici covalenti tra due o più atomi sono idealmente rappresentati come legami rigidi con una precisa lunghezza di legame. Nella realtà un legame chimico covalente è più assimilabile ad un oscillatore armonico che vibra attorno ad una posizione di equilibrio e ad una certa frequenza caratteristica.¹

La radiazione IR ha un intervallo di frequenze (espresse in numeri d'onda) che si estende dai 4000 cm⁻¹ ai 600 cm⁻¹. All'interno di questo intervallo sono presenti le frequenze caratteristiche delle vibrazioni di *stretching* e di *bending* dei legami covalenti presenti nelle molecole. Di conseguenza, quando una molecola è colpita dalla radiazione elettromagnetica ad una frequenza che coincide con la frequenza di vibrazione di uno dei legami covalenti presenti, si ha un assorbimento di energia. Determinando sperimentalmente a quale frequenza avviene l'assorbimento della radiazione IR è possibile identificare i tipi di legame presenti.

Uno spettro IR tradizionale è suddiviso in due intervalli di frequenze o numeri d'onda:

Regione dei gruppi funzionali compresa tra 4000 cm⁻¹ e 1400 cm⁻¹, contiene le frequenze caratteristiche di gruppi funzionali noti. Osservando questa regione è possibile ottenere delle informazioni qualitative sulla presenza o meno di certi gruppi funzionali.

¹In una molecola, comunque, oltre alla vibrazione degli atomi vi è anche il movimento della molecola nel suo complesso.

Regione delle impronte digitali compresa tra 1400 cm^{-1} e 600 cm^{-1} , è caratteristica per ogni composto e permette di identificarlo totalmente.

Aumentando il numero di atomi nella molecola o il numero di sostanze diverse presenti nel campione, l'interpretazione di tutti i possibili moti vibrazionali può diventare molto complessa. In questa tesi gli spettri FTIR sono stati interpretati, quando possibile, per "sottrazione" escludendo i picchi riconducibili a sostanze note.

Strumento e procedure di laboratorio

La spettroscopia FTIR è stata condotta utilizzando lo spettrofotometro **Equinox 55 Bruker**. Gli spettri risultanti sono riportati in valori di assorbanza in funzione del numero d'onda.

Per procedere all'analisi, il campione viene macinato mediante un pestello e collocato in una pressa idraulica per ottenere delle pastiglie molto sottili del peso di poche decine di mg. Le pastiglie vengono prima inserite in un portacampione forato realizzato in lamine d'oro e il tutto viene disposto successivamente in una cella trasparente alla radiazione infrarossa. La cella è inoltre collegata ad una linea ad alto vuoto grazie alla quale è possibile degasare il campione. Nel caso in cui il segnale saturi ovvero l'assorbanza del campione sia troppo elevata, è possibile e consigliato aggiungere alcuni mg di KBr durante la fase di macinazione. Il KBr, essendo un composto ionico, è trasparente allo spettro IR e permette di diluire il campione diminuendone l'assorbanza senza spostare la posizione dei picchi.

3.3.5 Spettroscopia UV/Visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica spettroscopia che fornisce informazioni sui composti che possiedono doppi legami coniugati².

Una molecola allo stato fondamentale possiede una configurazione elettronica in cui tutti gli elettroni occupano gli orbitali molecolari a più bassa energia. La radiazione UV (180 nm-400 nm) e quella visibile (400 nm-780 nm) hanno sufficiente energia per indurre una transizione elettronica nella molecola, promuovendo un elettrone da un orbitale molecolare ad un altro a più alta energia.

Le transizioni elettroniche possibili sono:

- $n \rightarrow \pi^*$: promozione di un elettrone n di non legame ad un orbitale molecolare di antilegame π^* ;
- $\pi \rightarrow \pi^*$: promozione di un elettrone da un orbitale molecolare di legame ad uno di antilegame.

Da queste considerazioni si deduce che le molecole che presentano legami coniugati e/o doppietti elettronici solitari e rispettano le regole di selezione possono assorbire energia nell'intervallo UV/Vis.

La spettroscopia UV/Vis è utilizzata soprattutto per determinare la concentrazione di una specie assorbente all'interno di una soluzione. In soluzioni diluite infatti, la relazione

²I doppi legami si definiscono coniugati se sono intervallati da un legame singolo.

tra l'assorbanza, la concentrazione della soluzione e la lunghezza del cammino ottico è nota come Legge di Lambert-Beer, indicata nella seguente equazione:

$$A = \epsilon cl \quad (3.4)$$

dove A corrisponde all'assorbanza (adimensionale), ϵ al coefficiente di estinzione molare ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c alla concentrazione della soluzione (mol L^{-1}) e l al cammino ottico (cm).

Strumento e procedure di laboratorio

Lo strumento utilizzato è lo spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer

Per utilizzare lo spettrofotometro è necessario riempire due cuvette con all'interno il solvente puro, utilizzate per impostare il "bianco". Successivamente viene inserita in un'altra cuvetta la soluzione campione e lo spettrofotometro confronta l'assorbanza con quella di riferimento (il bianco), restituendo lo spettro di assorbimento UV/Vis delle specie chimiche presenti nella soluzione campione. Tutte le cuvette utilizzate sono in quarzo e con un percorso ottico di 1 cm.

Lo strumento è stato utilizzato per analisi qualitative per valutare la presenza di specie chimiche assorbenti nei filtrati ottenuti durante la sintesi e per analisi quantitative per costruire le rette di taratura necessarie per studiare il rilascio del principio attivo.

3.3.6 Spettroscopia UV/Visibile su solido

La spettroscopia UV/Visibile su solido è una variante della spettroscopia tradizionale su liquido e permette di analizzare anche campioni solidi come le polveri. Lo spettrofotometro viene dotato di una *sfera di riflettanza* che raccoglie la riflessione diffusa dal materiale. La riflessione diffusa della luce da parte di una superficie è una diffusione non speculare, in cui un raggio di luce incidente sulla superficie non viene rimandato indietro ad un angolo determinato, ma viene diffuso in molte direzioni casuali.

Strumento e procedure di laboratorio

Lo spettrofotometro utilizzato è il Varian Cary 5000.

Per eseguire l'analisi viene montata sullo spettrofotometro la sfera di riflettanza e si esegue il "bianco" con un portacampione di riferimento per ottenere una baseline corrispondente al 100% della riflettanza. Il campione viene macinato molto finemente e disposto in un portacampione ottenendo uno spessore di materiale di circa 2 mm. Lo strumento viene impostato per acquisire il segnale nell'intervallo tra 190 nm e 600 nm, riportando lo spettro di assorbanza tramite la funzione Kubelka-Munk. Il modello di Kubelka-Munk permette infatti di derivare lo spettro di assorbanza a partire dallo spettro di riflettanza.

3.3.7 Microscopia elettronica FESEM e Spettroscopia EDS

La microscopia FESEM (*Field emission scanning electron microscopy*) è una tecnica microscopica che viene utilizzata per valutare la morfologia del materiale. La spettroscopia EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*) è invece una tecnica spettroscopica che restituisce informazioni sulla natura degli elementi presenti nel campione.

Strumento e procedure di laboratorio

Lo strumento utilizzato è il ZEISS MERLIN ed è predisposto a svolgere sia la microscopia elettronica sia l'EDS. I campioni devono essere preventivamente metallizzati con uno strato di platino dello spessore di circa 5 nm. L'analisi viene condotta impostando lo strumento per lavorare ad una tensione di 3 kV.

3.4 Retta di taratura e rilasci

Nella fase finale dell'attività sperimentale viene quantificato il farmaco rilasciato dalla silice. Prima di procedere ai test di rilascio è necessario costruire delle rette di taratura in grado di associare l'assorbimento UV/Vis di una soluzione ad una concentrazione nota del farmaco.

Di seguito è elencato il procedimento:

1. Viene preparata una soluzione madre di curcumina nel solvente scelto per il rilascio. La concentrazione della soluzione deve essere sufficientemente elevata, rimanendo sempre nei limiti di solubilità del principio attivo. La concentrazione viene espressa in *ppm* ("parti per milione"), secondo l'equazione:

$$[\text{curcumina}] = \frac{mg_{\text{curcumina}}}{kg_{\text{soluzione}}} \quad (3.5)$$

2. Si preparano le soluzioni figlie prelevando delle aliquote dalla soluzione madre e portando a volume. Per calcolare i ml di soluzione madre da prelevare è stata usata la seguente equazione:

$$V_{\text{madre}} = \frac{[\text{curcumina}]_{\text{figlia}} V_{\text{figlia}}}{[\text{curcumina}]_{\text{madre}}} \quad (3.6)$$

Le concentrazioni delle soluzioni figlie sono scelte tenendo conto di ragionevoli valori di curcumina all'interno del *carrier*, ricavabili dalle caratterizzazioni svolte sul materiale in precedenza.

3. Per ogni soluzione figlia vengono eseguite tre spettroscopie UV/Vis e delle tre misurazioni viene fatta una media. Il risultato della media corrisponde ad un punto in un grafico "assorbanza vs concentrazione".
4. Utilizzando un foglio di calcolo elettronico, i punti ottenuti dalla spettroscopia vengono interpolati linearmente imponendo l'intercetta nulla. La bontà dell'interpolazione è valutata mediante il quadrato del coefficiente di correlazione.

Strumento e procedure di laboratorio

Il test di rilascio richiede l'utilizzo di un dissolutore apposito dotato di: serbatoio, agitatore meccanico e termometro (figura 3.4). Il serbatoio, in particolare, è immerso in un bagno di acqua termostata ed è facilmente accessibile per aggiungere la soluzione e il campione per il rilascio. Per eseguire il test si collega il serbatoio del dissolutore ad un tradizionale spettrofotometro (Lambda 25 Perkin Elmer) tramite un sistema di tubicini in silicone

a circuito chiuso. Una pompa peristaltica permette di aspirare la soluzione, farla passare all'interno dello spettrofotometro ed infine reimmerla nel serbatoio. Il tubo di aspirazione è dotato di una maglia filtrante per evitare che residui solidi entrino nella cuvetta. Ad intervalli regolari di tempo viene eseguita automaticamente una spettroscopia alla lunghezza d'onda di maggior assorbimento della curcumina per quel particolare solvente.

I parametri comuni a tutti i test di rilascio sono :

- temperatura: 37°C;
- velocità di rotazione agitatore: 100 rpm;
- velocità di rotazione pompa peristaltica: 30 rpm;
- intervallo temporale di acquisizione: 10 secondi;
- durata esperimento: 20 ore.

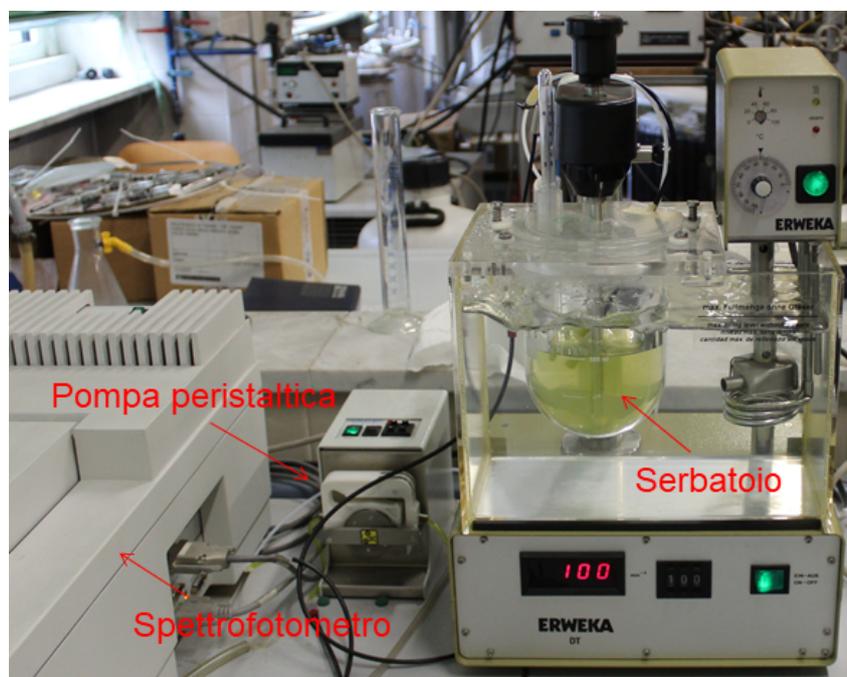


Figura 3.4: Sistema per il test di rilascio

Capitolo 4

Silici mesostrutturate senza curcumina

Premessa

Nei successivi paragrafi vengono mostrati il procedimento di sintesi di silici mesostrutturate e la relativa caratterizzazione. E' opportuno ricordare in questa premessa che cosa si intende per silice mesostrutturata: un materiale ibrido costituito da una matrice di silice amorfa al cui interno sono organizzate micelle di surfattante in un sistema ordinato. Nell'immagine seguente (figura 4.1) viene rappresentato questo tipo materiale.

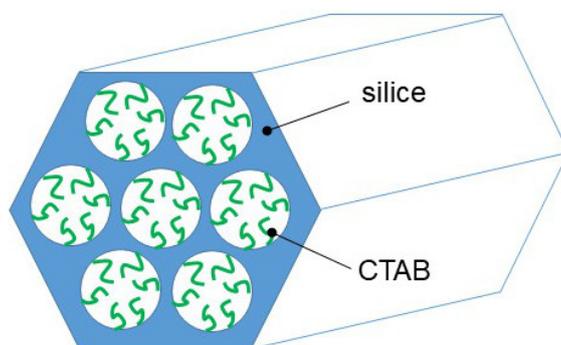


Figura 4.1: Modello di silici mesostrutturate senza curcumina

4.1 Sintesi

La soluzione di sintesi viene preparata introducendo 0.193 g di idrossido di sodio (in forma di granuli) all'interno di un matraccio. Successivamente sono aggiunti 95 ml di acqua distillata ottenendo una soluzione acquosa di NaOH 0.05 M. Il matraccio viene mantenuto in agitazione manuale per 10 minuti, fino a completa solubilizzazione dell'idrossido di sodio.

Il pHmetro restituisce un valore di circa 12, in linea con il pH teorico calcolato tenendo conto che l'idrossido di sodio è una base forte. La soluzione viene quindi trasferita in un beaker e mantenuta in agitazione tramite agitatore magnetico alla velocità di 150 rpm.

Alla soluzione vengono aggiunti 0.400 g di CTAB (in polvere). Inizialmente torbida a causa del surfattante, la soluzione torna trasparente in un tempo compreso tra i 30 e i 50 minuti.

A questo punto si somministrano 2 ml di TEOS alla soluzione molto lentamente, goccia a goccia. La soluzione diventa dopo pochi minuti opalescente fino a formare uno *slurry*¹ omogeneo di colore bianco (figura 4.2). Il cambiamento di colore nella soluzione avviene in seguito alle reazioni di condensazione [5].



Figura 4.2: Slurry senza curcumina

Trascorse 3 ore di tempo dall'aggiunta del precursore della silice, l'agitazione viene fermata e si procede alla fase di filtraggio. L'operazione avviene utilizzando un sistema di filtraggio con pompa a vuoto ad acqua e filtro di 25 μm . E' possibile notare come nei primi ml del filtrato² siano presenti delle bolle, riconducibili al surfattante non coinvolto nella sintesi. Terminato il primo filtraggio, il precipitato viene lavato con un volume d'acqua distillata pari a quello di sintesi e nuovamente filtrato.

In conclusione, il precipitato viene fatto asciugare in stufa a 40 °C per circa 17 ore e conservato in essiccatore con gel di silice a temperatura ambiente. Nella tabella 4.1 è riportata la composizione della miscela di sintesi espressa in termini di rapporti molari dei reagenti.

Tabella 4.1: Miscela di sintesi - Senza curcumina

TEOS	CTABr	NaOH	H ₂ O
1	0.122	0.536	589

¹Per slurry si intende una sospensione di particelle fini disperse nella soluzione.

²Al termine di una fase di filtraggio, la parte liquida prende il nome di *filtrato* mentre la parte solida di *precipitato*.

Ottimizzazione

Il procedimento descritto in precedenza si riferisce a quello definitivo per le silici senza curcumina. Come già indicato nella sezione 3.2 sono state apportate alcune modifiche tra i vari tentativi (riguardanti i parametri di sintesi e la strumentazione utilizzata) per ottimizzare il processo. Le motivazioni che hanno portato a tali modifiche sono descritte di seguito:

Sintesi I

Nel primo tentativo non si è atteso il tempo necessario alla solubilizzazione del CTAB (la soluzione era ancora torbida) e si è aggiunto il TEOS rapidamente. Sebbene la diffrattometria a raggi X abbia confermato la presenza di un ordine a lungo raggio, il FESEM ha mostrato tuttavia particelle dalla forma irregolare. Da questo primo tentativo si è scelto di aumentare i tempi di attesa, in particolare quelli di solubilizzazione del CTAB, prima di somministrare i vari reagenti.

Sintesi II

Nel secondo tentativo sono stati fatti trascorrere 120 minuti tra l'aggiunta del CTAB e quella del TEOS, sempre somministrato rapidamente. Dopo aver osservato quello che inizialmente sembrava essere uno slurry opalescente, al termine delle ulteriori 2 ore di attesa la soluzione è tornata trasparente e sono emersi aggregati in sospensione di 1-2 mm (figura 4.3). Per diminuire la possibilità che si formino questi aggregati si decide di aumentare la velocità di rotazione dell'agitatore a 150 rpm.



Figura 4.3: Aggregati - Tentativo II

Sintesi III

Nel terzo tentativo si è osservato che già dopo 50 minuti il CTAB si è solubilizzato; il TEOS viene quindi somministrato (sempre rapidamente) dopo tale tempo di attesa. Non si è osservata la formazione di aggregati bensì di uno slurry bianco e omogeneo come riportato in letteratura. A partire da questa sintesi viene inoltre introdotto il sistema di filtraggio con pompa a vuoto ad acqua che permette di filtrare più rapidamente la sospensione, riducendo i tempi complessivi di sintesi.

Sintesi IV

Nel quarto tentativo è stata cambiata la modalità di somministrazione del TEOS

alla soluzione, passando da un'aggiunta rapida ad una lenta, goccia a goccia, come riportato in letteratura [40].

Nella figura 4.4 è schematizzato il procedimento ottimizzato descritto in precedenza.

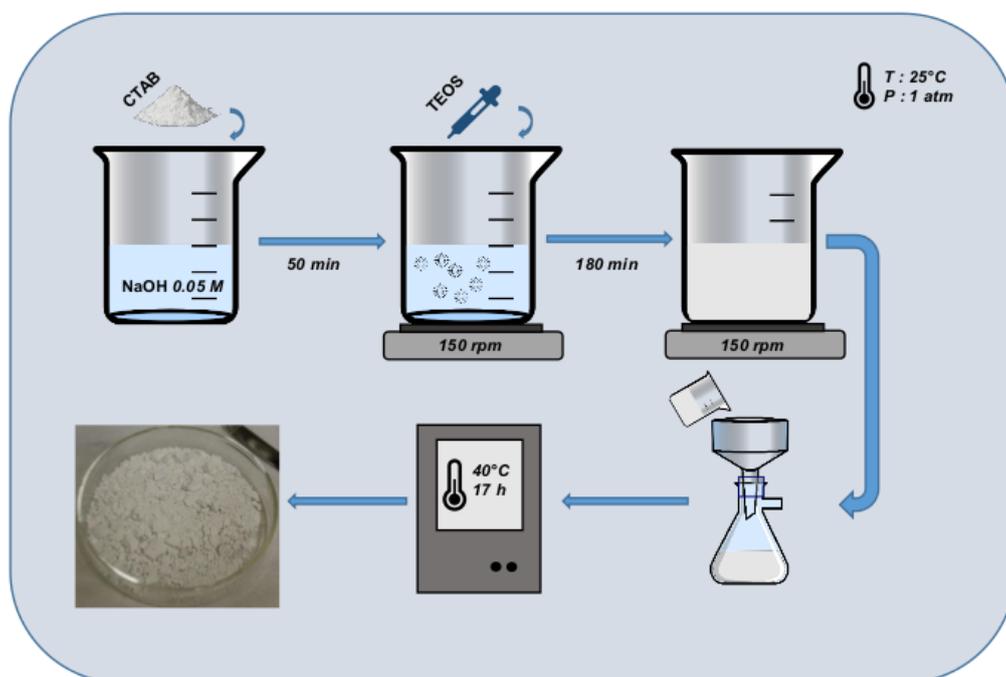


Figura 4.4: Schema della sintesi senza curcumina

4.2 Caratterizzazione

La caratterizzazione è stata eseguita su tutti i tentativi di sintesi valutando le varie modifiche apportate al procedimento. Dal momento che il procedimento ottimizzato è risultato essere il numero quattro, di seguito viene riportata la caratterizzazione del solo campione numero quattro a cui si assegna il nome *MESO_SiO₂*.

4.2.1 Diffrazione a raggi X

Un tipico spettro XRD di una silice MCM-41 calcinata mostra la simmetria esagonale dovuta all'ordine dei pori (gruppo spaziale: $p6m$). Lo spettro contiene generalmente quattro picchi di diffrazione principali ben visibili per angoli bassi ($2\theta < 10^\circ$), corrispondenti alle direzioni $d_{(100)}$, $d_{(110)}$, $d_{(200)}$ e $d_{(210)}$. Poiché l'MCM-41 è costituita da silice amorfa, non presenta cristallinità a livello atomico e pertanto non si possono osservare picchi di diffrazione ad angoli alti ($2\theta > 10^\circ$) [1]. Per validare il processo di sintesi è necessario verificare la presenza dei picchi di diffrazione caratteristici anche sulla silice mesostrutturata.

Nella figura 4.5 è riportato lo spettro XRD ottenuto per angoli bassi. E' possibile notare dal grafico la comparsa dei quattro picchi di diffrazione caratteristici delle MCM-41 con

l'indicazione degli indici di Miller corrispondenti che confermano la presenza di un ordine strutturale dovuto alla disposizione ordinata dei pori. Tramite le equazioni 3.1 e 3.2 è possibile ricavare i parametri di cella, riportati nella tabella 4.2. Sebbene i valori siano leggermente più grandi di quelli riportati in letteratura, i parametri di cella del materiale sono dell'ordine di quelli presentati in letteratura per le silici MCM-41 calcinate [3] [8]. La maggiore dimensione è riconducibile alla presenza del surfattante all'interno della cella.

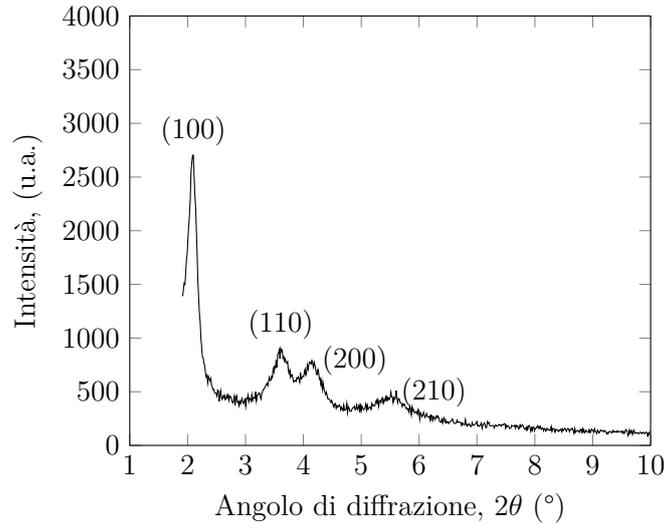


Figura 4.5: Spettro XRD a bassi angoli - MESO_SiO₂

Tabella 4.2: Parametri di cella - MESO_SiO₂

(hkl)	d	a ₀
–	(nm)	(nm)
(100)	4.21	4.86
(110)	2.45	-
(200)	2.13	-
(210)	1.60	-

In figura 4.6 è invece mostrato lo spettro XRD ottenuto per alti angoli. La mancanza di picchi di diffrazione nello spettro XRD ad alti angoli comprova il fatto che la matrice del materiale è costituita da silice amorfa.

4.2.2 Analisi termogravimetrica

In figura 4.7 viene riportata la curva termogravimetrica del materiale. Nelle silici mesoporese le perdite di peso durante la TGA sono riconducibili all'evaporazione dell'acqua fisioadsorbita e alla deidrossilazione dei silanoli. Nei materiali ibridi, in aggiunta, si deve tenere conto anche della degradazione del surfattante e di altre eventuali molecole organiche. In letteratura vengono riportati alcuni valori di temperatura "notevoli". Ad esempio, alla

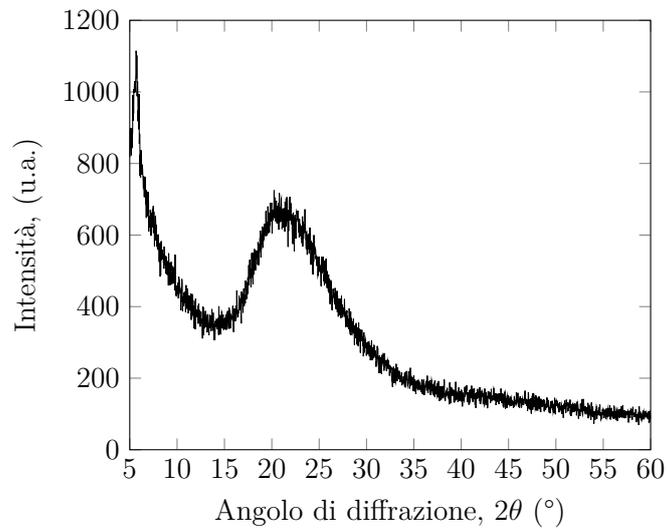


Figura 4.6: Spettro XRD ad alti angoli - MESO_SiO₂

temperatura di 150 °C la maggior parte dell'acqua fisioadsorbita viene rimossa, ma solo raggiungendo i 190 °C la superficie è completamente deidratata. Per quanto riguarda il surfattante, i prodotti di degradazione in silici MCM-41 si iniziano a formare a partire dai 150 °C fino ai 300 °C [42] [43].

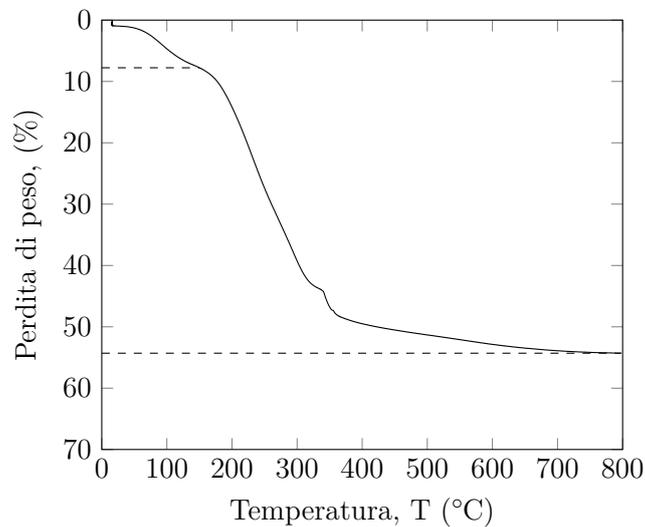


Figura 4.7: Profilo TGA - MESO_SiO₂

Considerando l'ampiezza di questi intervalli di temperatura, si sceglie di calcolare le perdite di peso a partire dai 150 °C, trascurando l'evaporazione dell'acqua fisioadsorbita. Utilizzando l'equazione 3.3 si ottiene una perdita del 46.53% (54.3% totale).

4.2.3 Spettroscopia FTIR

La spettroscopia FTIR eseguita sul campione è riportata in figura 4.8. In un sistema ibrido devono comparire i picchi relativi ai moti vibrazionali sia della componente inorganica (la silice) sia di quella organica (il surfattante). Come è possibile osservare dal grafico, compaiono almeno due picchi relativi alla silice:

- una banda intensa e molto larga compresa tra 3200 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} , indica i moti vibrazionali dell'acqua fisioadsorbita e di altre forme di legame a idrogeno;
- un picco poco intenso e stretto intorno a 3700 cm^{-1} , indica lo stretching del legame Si-OH nei silanoli isolati.

a cui si aggiunge il picco a $\approx 1650\text{ cm}^{-1}$ riconducibile alla vibrazione di bending nella molecola di acqua. Il picco relativo ai silanoli isolati è insolitamente basso per intensità rispetto a quelli riportati in letteratura [44]. La motivazione è da ricercare nell'interazione tra la superficie della silice e le teste cationiche del surfattante: a pH basico il gruppo ossidrilico deprotonato dei silanoli è "salificato" dalla testa cationica ed in questo modo il numero di silanoli isolati diminuisce.

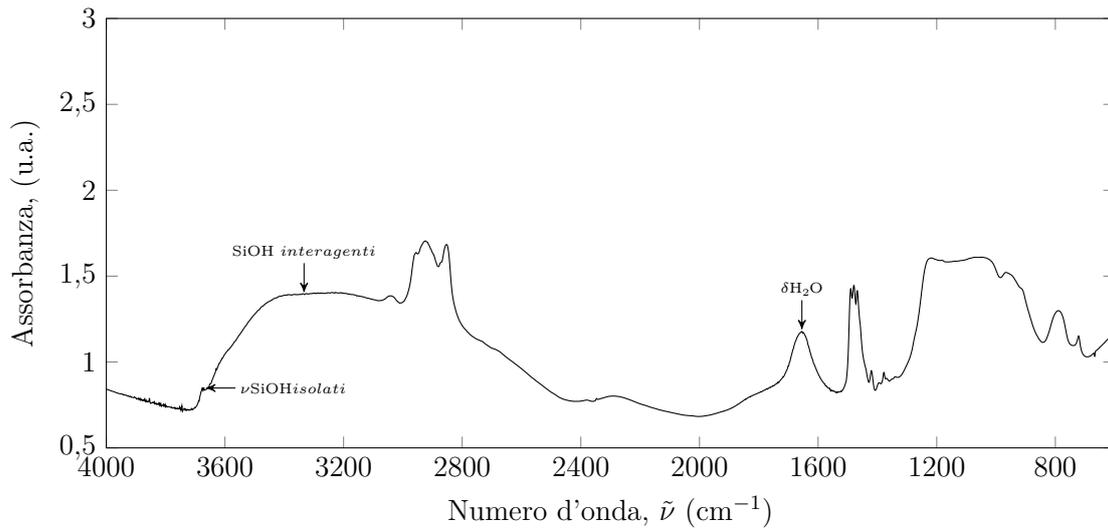


Figura 4.8: Spettro FTIR - MESO_SiO₂

Per analizzare meglio lo spettro del solo surfattante, il campione è stato degasato tramite una linea a vuoto, permettendo di rimuovere le componenti fisioadsorbite (principalmente H₂O). Osservando lo spettro in figura 4.9 si nota come venga meno tutta la banda associata all'acqua fisioadsorbita. Sono rappresentati tutti i moti vibrazionali principali (più intensi) del surfattante: i picchi compresi tra 2850 cm^{-1} e 2950 cm^{-1} sono associati alle vibrazioni di stretching dei carboni presenti nella catena carboniosa del surfattante, mentre per numeri d'onda più piccola si osservano anche i moti vibrazionali dei legame N-CH₃ e C-N presenti nella molecola del CTAB. La posizione dei picchi del surfattante è coerente con quelli riportati in letteratura, sebbene la posizione dei picchi possa comunque variare

di alcuni numeri d'onda in quanto il CTAB si trova in forma micellare e in interazione con la silice [45].

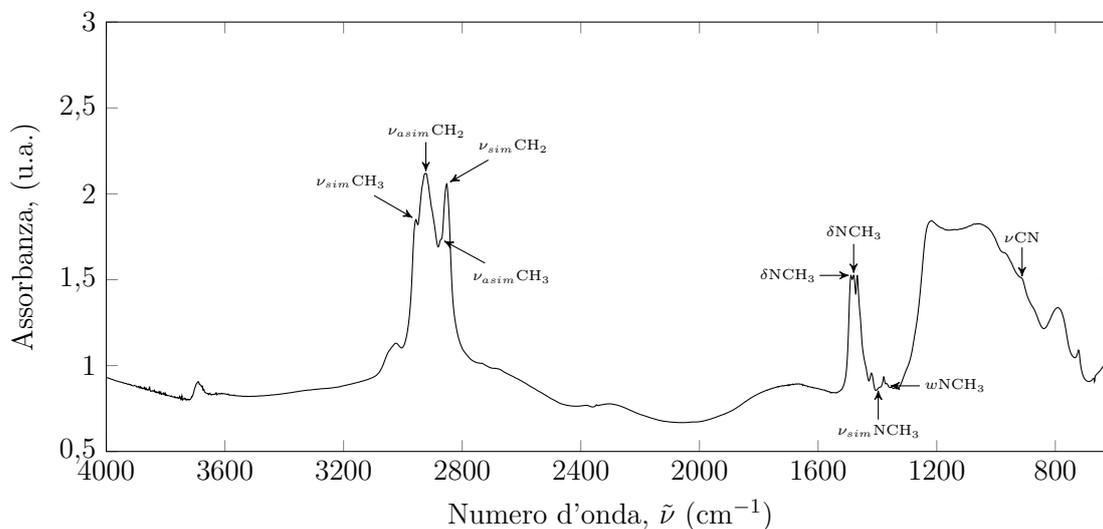


Figura 4.9: Spettro FTIR in vuoto - MESO_SiO₂

4.2.4 Spettroscopia UV/Visibile sui filtrati

Durante la fase di filtraggio sono stati prelevati alcuni ml di filtrato per poterli analizzare tramite spettroscopia UV/Vis. Ad una prima analisi è stata osservata la presenza di un picco stretto localizzato al limite inferiore della regione UV. Tenuto conto del fatto che il "bianco" è stato eseguito con una soluzione di NaOH alla stessa molarità della soluzione di sintesi, l'assorbanza nell'unico picco presente si suppone sia riconducibile alla silice e/o al surfattante. Una prova a favore di questa ipotesi è lo spettro della soluzione diluita, riportato in figura 4.10 che mostra come la diluizione della soluzione (e quindi della specie incognita) comporti anche una diminuzione dell'assorbimento.

Per identificare la specie responsabile dell'assorbimento, è stata eseguita un'ulteriore spettroscopia con una soluzione di NaOH 0.5 M in presenza di solo CTAB. Come nella precedente analisi è stato scelto di diluire la soluzione per verificare che fosse effettivamente il surfattante la causa dell'assorbimento. In figura 4.11 è riportato lo spettro. La diminuzione di assorbimento conferma che la specie responsabile del picco è il surfattante. Questa analisi conferma la supposizione che non tutto il CTAB viene coinvolto nel processo di sintesi e durante il lavaggio del precipitato con acqua distillata le molecole di surfattante in eccesso vengono rimosse.

4.2.5 Microscopia elettronica e Spettroscopia EDS

FESEM

La microscopia FESEM (figura 4.12) è stata eseguita per valutare la morfologia delle particelle. Osservando le immagini si nota subito come rispecchino la caratteristica forma

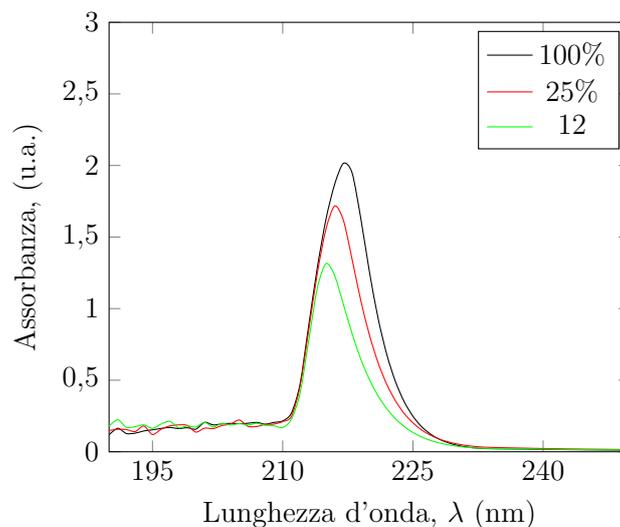


Figura 4.10: Spettro UV/Vis - Filtrato puro/diluito

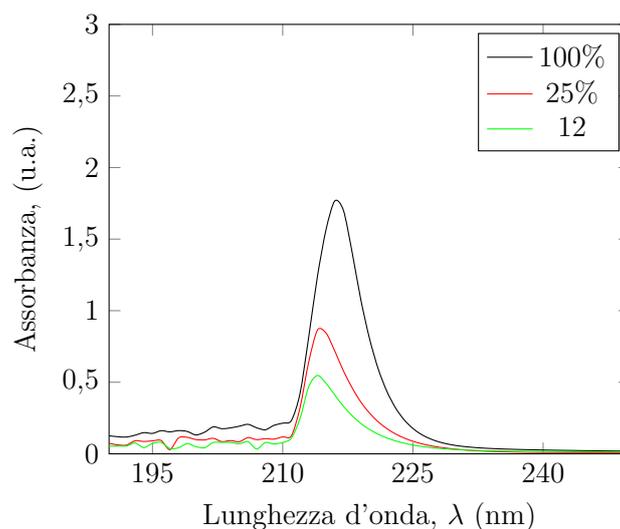


Figura 4.11: Spettro UV/Vis - Soluzione NaOH+CTAB pura/diluita

esagonale delle silici del tipo MCM-41 [8]; al contrario le particelle ottenute durante la prima sintesi (non mostrate tra le immagini) risultano più irregolari. La principale differenza tra i due campioni (capitolo 4) consiste nel diverso metodo di somministrazione del TEOS: nella prima sintesi è stato aggiunto alla soluzione rapidamente mentre nella seconda molto lentamente, goccia a goccia. Avendo mantenuto le altre condizioni di sintesi uguali in tutte e due le prove, la diversa morfologia delle particelle sembra essere causata proprio dal diverso metodo di aggiunta del precursore della silice.

In uno dei lavori da cui è stato preso spunto il procedimento di sintesi è stata valutata l'influenza della concentrazione del TEOS sulla morfologia finale delle particelle. Secondo

gli autori, nelle soluzioni diluite si hanno pochi centri di nucleazione che possono crescere prima di aggregarsi, ottenendo particelle di dimensioni maggiori ma con un profilo esagonale mentre nelle soluzioni concentrate si hanno fin da subito molti centri di nucleazione che si aggregano tra di loro, formando particelle più piccole e con una forma meno regolare [8]. Nel procedimento scelto in questo lavoro di tesi si usa una somministrazione lenta con la conseguenza che la concentrazione del TEOS è inizialmente molto bassa, permettendo alla silice di nucleare e aggregarsi in particelle regolari.

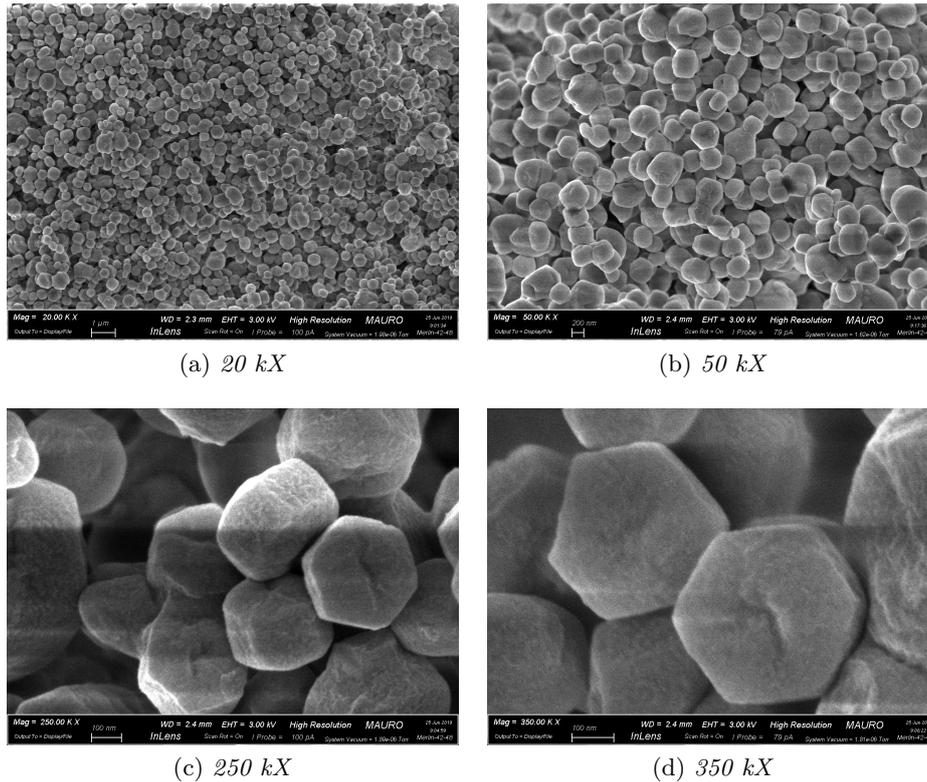
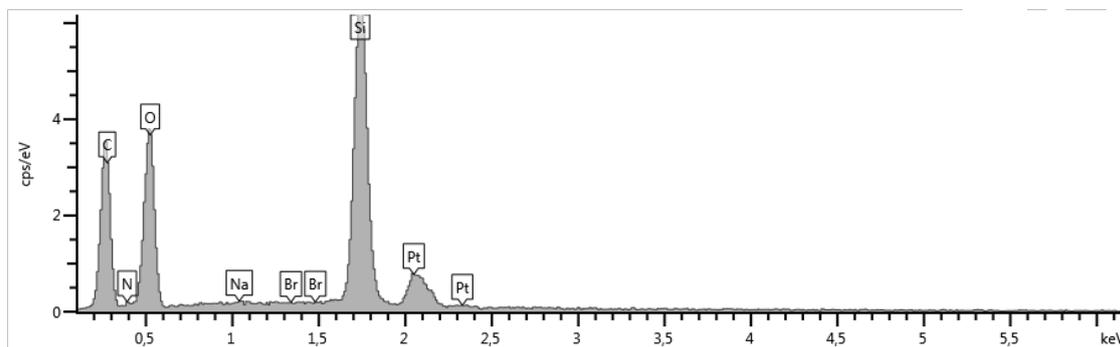


Figura 4.12: FESEM - MESO_SiO₂

EDS

La spettroscopia EDS, riportata in figura 4.13, mostra come siano presenti nel campione tutti gli elementi riconducibili ai reagenti utilizzati. La tabella 4.3 evidenzia tuttavia come gli elementi sodio e bromo siano presenti in percentuali in peso assolutamente trascurabili. Questi risultati possono essere giustificati tenendo conto che l'idrossido di sodio partecipa alle reazioni come catalizzatore e viene rimosso durante la fase di filtraggio. Lo ione bromuro inizialmente salifica la molecola del surfattante e la sua percentuale nulla alla fine della sintesi dimostra come l'interazione tra i silanoli deprotonati e le teste cationiche sia prevalente rispetto a quella tra ione bromuro e il surfattante.

Figura 4.13: EDS - MESO_SiO₂Tabella 4.3: EDS - Percentuali in peso MESO_SiO₂

Elemento	wt.%
C	47.01
N	4.71
O	44.30
Na	0.10
Si	3.89
Br	0.00

4.3 Calcinazione della silice mesostrutturata

Come già descritto nel capitolo 1, le silici mesostrutturate sono i precursori delle silici mesoporose. Dopo aver caratterizzato il materiale MESO_SiO₂ si è quindi scelto, per completezza, di caratterizzare il materiale in seguito ad un processo di calcinazione potendo così confrontarlo con quelli presenti in letteratura. La calcinazione (sezione 3.2.2) è un trattamento termico ad alta temperatura in grado di rimuovere le componenti organiche e le specie volatili e di modificare alcuni parametri superficiali. Ripetere la caratterizzazione su un materiale calcinato permette quindi di valutare se queste componenti (le micelle di surfattante) influenzano in qualche modo il materiale.

4.3.1 Analisi di adsorbimento di azoto

In figura 4.14 è riportata l'isoterma di adsorbimento di azoto del materiale calcinato. La curva è riconducibile all'isoterma di tipo IV che secondo la classificazione IUPAC descrive i materiali mesoporosi. Come generalmente osservato per le silici mesoporose del tipo MCM-41 non è presente un coppia di isteresi perchè i pori sono omogenei e hanno diametro inferiore a 4 nm.

In figura 4.15 è invece riportata la distribuzione dimensionale dei pori ricavata tramite DFT mentre nella tabella 4.4 sono riportati i valori dei parametri superficiali misurati tramite modello BET e DFT.

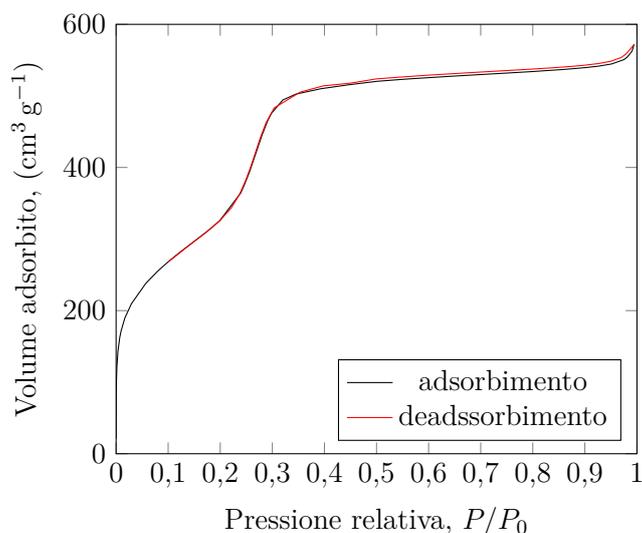


Figura 4.14: Isotherme di adsorbimento/deadsorbimento - MESO_SiO₂ calcinata

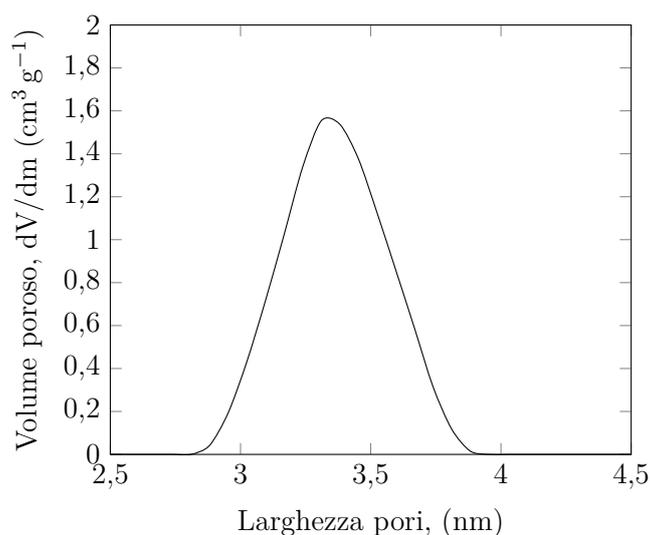


Figura 4.15: Distribuzione porosimetrica - MESO_SiO₂ calcinata

4.3.2 Diffrazione a raggi X

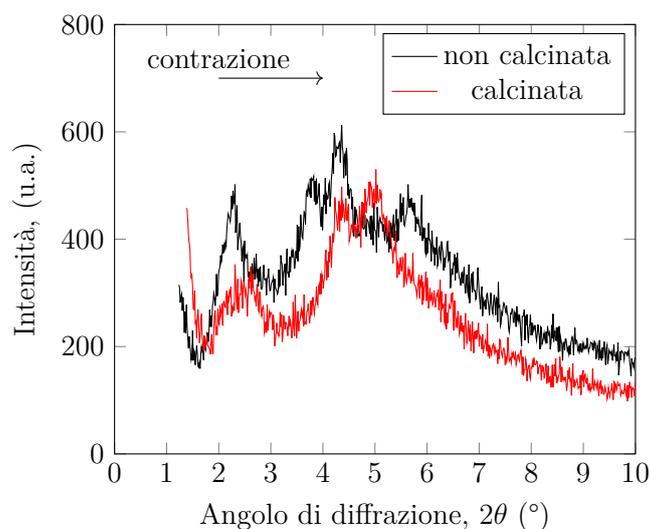
Il processo di calcinazione rimuove il surfattante e induce una contrazione del materiale. Per valutare la variazione nella dimensione del parametro di cella si è proceduto ad eseguire un'analisi XRD. In figura 4.16 vengono confrontati gli spettri XRD³ a bassi angoli pre e post calcinazione. Come è possibile notare dal grafico si ha uno spostamento dei picchi

³La diversa intensità dei picchi rispetto agli XRD precedenti è dovuta solamente all'utilizzo di un portacampione differente che non influenza tuttavia sulla posizione angolare dei picchi.

Tabella 4.4: Parametri superficiali - Sintesi calcinata

Area superficiale ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume pori ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Dimensione pori (nm)
1218	0.84	3.3

verso angoli maggiori che, secondo la Legge di Bragg 3.1, corrisponde ad una contrazione della cella. In tabella 4.5 sono riportati i parametri di cella pre e post calcinazione.

Figura 4.16: Spettro XRD a bassi angoli - MESO_SiO₂ pre/post calcinazione

4.3.3 Spettroscopia FTIR

La spettroscopia FTIR eseguita sul campione calcinato è riportata in figura 4.17, confrontata con MESO_SiO₂. La calcinazione libera i silanoli dall'interazione con le teste cationiche del surfattante. Il risultato è la comparsa del picco dei silanoli isolati intorno ai 3750 cm^{-1} . Inoltre, la rimozione del surfattante è verificata dalla scomparsa dei picchi di assorbimento riconducibili ai gruppi metilici CH₃ e metilenici CH₂ ($\approx 2850\text{-}2950 \text{ cm}^{-1}$).

Tabella 4.5: Parametri di cella - MESO_SiO₂ pre/ post calcinazione

(hkl)	d _{no calc} (nm)	d _{calc} (nm)	a _{0no calc} (nm)	a _{0calc} (nm)
—				
(100)	3.82	3.54	4.41	4.08
(110)	2.31	1.99	-	-
(200)	2.02	1.76	-	-
(210)	1.55	-	-	-

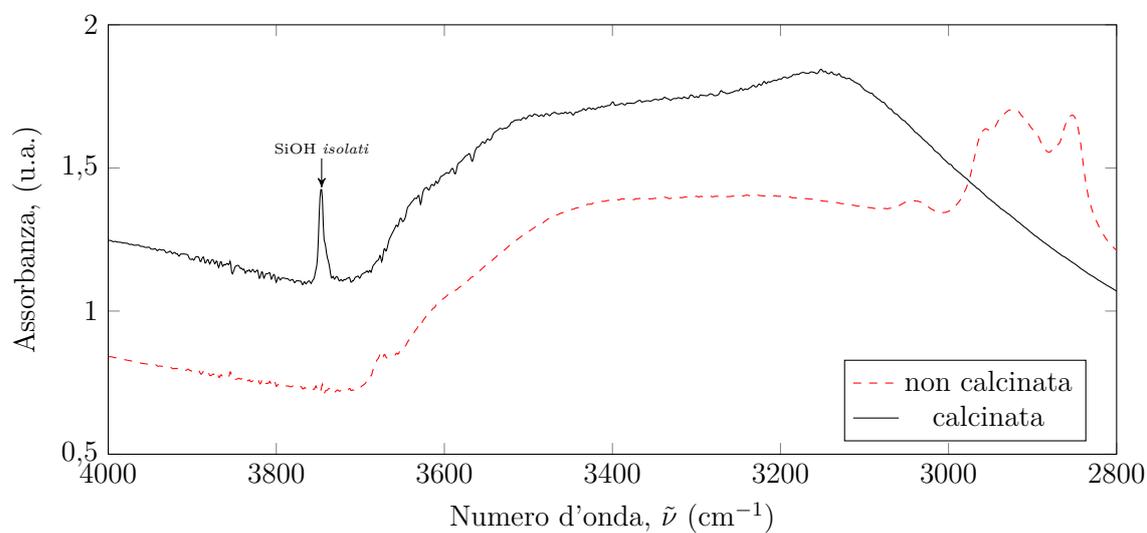


Figura 4.17: Spettro FTIR - MESO_SiO₂ pre/ post calcinazione

Capitolo 5

Silici mesostrutturate contenenti curcumina

5.1 Sintesi

La procedura di sintesi in presenza di curcumina riprende il procedimento descritto nel capitolo 4, con il requisito aggiuntivo di operare rapidamente durante l'aggiunta del principio attivo vista la sua sensibilità alla luce e alle condizioni della soluzione di sintesi (pH basico).

Vengono pesati 31.7 mg di curcumina e aggiunti alla soluzione una volta solubilizzato il CTAB. All'aggiunta della curcumina, il colore della soluzione vira inizialmente verso un colore giallo arancio, per poi spostarsi verso tonalità rosso scure dopo una decina di secondi. Il viraggio è dovuto ad uno spostamento delle bande di assorbimento della luce visibile in seguito alla deprotonazione della curcumina [46]. La tonalità molto scura assunta dalla soluzione (figura 5.2) impedisce di verificare l'effettiva solubilizzazione della curcumina e di conseguenza si sceglie un tempo arbitrario di 5 minuti, oltre il quale si procede a somministrare il TEOS. Aggiunto il precursore della silice il procedimento di sintesi (figura 5.1) riprende quello precedentemente descritto¹.

Le silici mesostrutturate contenenti curcumina sono state realizzate in due versioni, riportate in tabella 5.1, in cui è stato fatto variare il rapporto molare della curcumina. Alle due silici vengono assegnati rispettivamente i nomi di MESO_SiO₂_Cur1 e MESO_SiO₂_Cur2.

Tabella 5.1: Miscela di sintesi - Contenente curcumina

Campione	TEOS	CTABr	NaOH	Cur	H ₂ O
MESO_SiO ₂ _Cur1	1	0.122	0.536	0.01	589
MESO_SiO ₂ _Cur2	1	0.122	0.536	0.02	589

¹A causa della curcumina, il precipitato ottenuto non sarà di colore bianco ma rosso scuro.

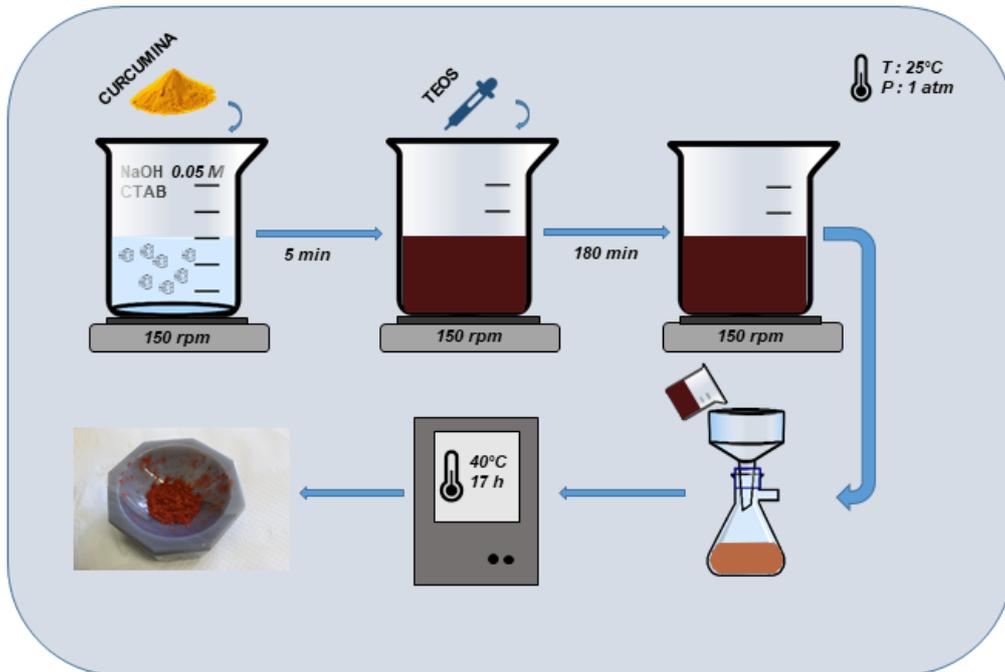


Figura 5.1: Schema della sintesi contenente curcumina



Figura 5.2: Slurry contenente curcumina

5.2 Caratterizzazione

Rispetto al capitolo 4, non è stata più eseguita l'analisi di adsorbimento di azoto mentre si è aggiunta la spettroscopia UV/Vis su solido.

5.2.1 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X permette di valutare se l'aggiunta della curcumina possa modificare la mesostruttura del materiale. L'interazione tra la molecola organica e la silice mesostrutturata è da valutare su tre aspetti:

1. Perdita dell'ordine strutturale a lungo raggio.
2. Modifica del parametro di cella a_0 .
3. Cristallizzazione del farmaco.

Per quanto riguarda il terzo punto, in figura 5.3 è riportato lo spettro di diffrazione della curcumina allo stato cristallino, che può essere confrontato con quelli eseguiti sul materiale per verificare il mantenimento dello stato amorfo della curcumina all'interno della silice.

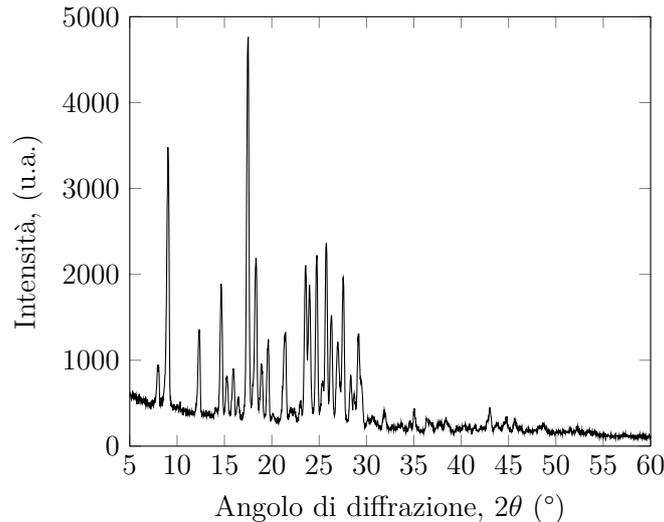


Figura 5.3: Spettro XRD ad alti angoli - Curcumina

In figura 5.4 sono confrontati gli spettri di diffrazione ad alti angoli dei tre campioni. Si può subito osservare come la presenza della curcumina non causi la perdita dell'ordine strutturale a lungo raggio (sono presenti tutti i picchi caratteristici delle MCM-41). Confrontando tuttavia le due silici contenenti curcumina (figura 5.5) si aggiungono informazioni sul ruolo che la curcumina ricopre nell'azione di *templating*. E' possibile infatti notare come sia presente uno spostamento dei picchi verso angoli minori (l'opposto di quello che succede con la calcinazione) all'aumentare della concentrazione di curcumina.

Da questi dati si possono ricavare due importanti risultati:

1. L'introduzione della curcumina non modifica l'ordine a lungo raggio.
2. La presenza della curcumina può influenzare l'azione di *templating* aumentando la dimensione della cella esagonale. Il cambiamento è visibile solo aumentando la concentrazione della molecola.

Per giustificare l'ultimo risultato è utile tenere conto del fatto che ricercatori della Mobil hanno dimostrato, nei loro primi lavori sulle MCM-41, come con una maggiore aggiunta di molecole organiche ausiliarie potesse effettivamente aumentare la dimensione delle celle all'aumentare della concentrazione delle molecole [6]. In quest'ottica si può giustificare l'aumento della dimensione della cella esagonale nel campione con una maggiore concentrazione di curcumina.

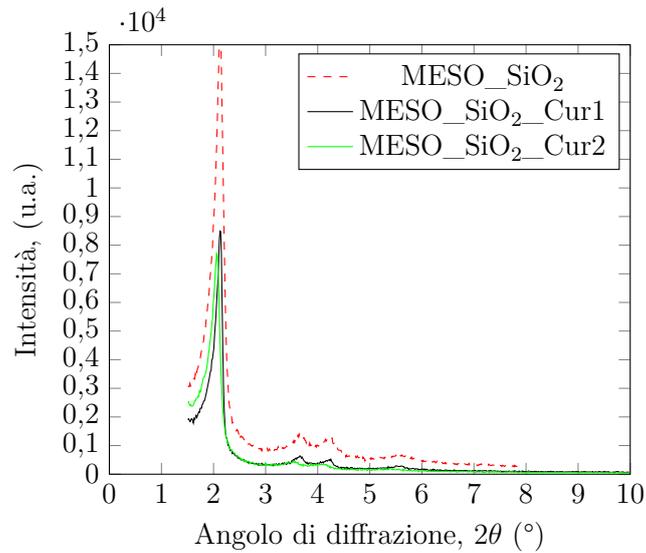


Figura 5.4: Spettro XRD a bassi angoli - Confronto sui tre campioni

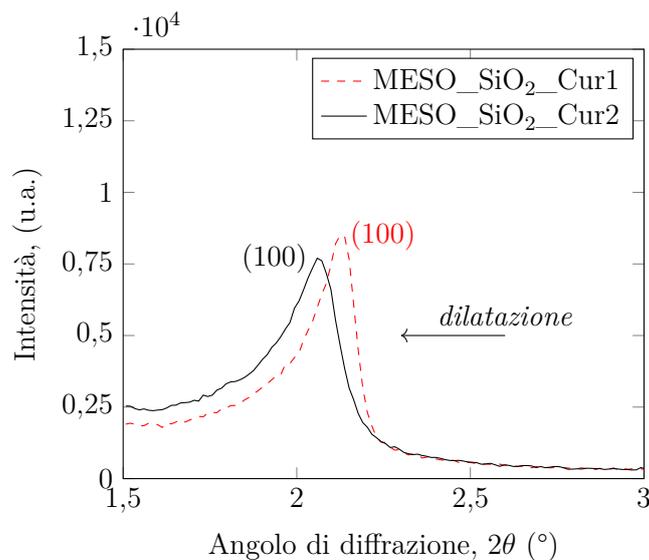


Figura 5.5: Spettro XRD a bassi angoli - Confronto su curcumina

In figura 5.6 sono invece rappresentati lo spettro XRD per angoli alti. Il tipico "alone" amorfo assicura che la presenza della curcumina non influenza la formazione di una silice amorfa, che avviene durante le fasi iniziali di idrolisi e condensazione. La mancanza dei picchi caratteristici della curcumina in forma cristallina è dovuta ad un mantenimento della forma amorfa da parte del farmaco.

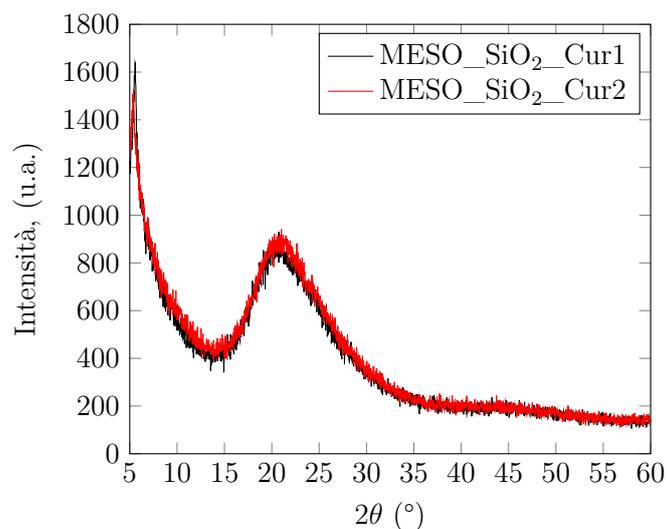


Figura 5.6: Spettro XRD ad alti angoli - Confronto su curcumina

5.2.2 Analisi termogravimetrica

La figura 5.7 rappresenta l'analisi termogravimetrica della sola curcumina (in polvere). La perdita di peso dovuta alla degradazione inizia ad essere misurabile a partire dai 180 °C ed è in linea con quanto dichiarato dal produttore nella scheda di sicurezza (SDS) della sostanza (175 °C).

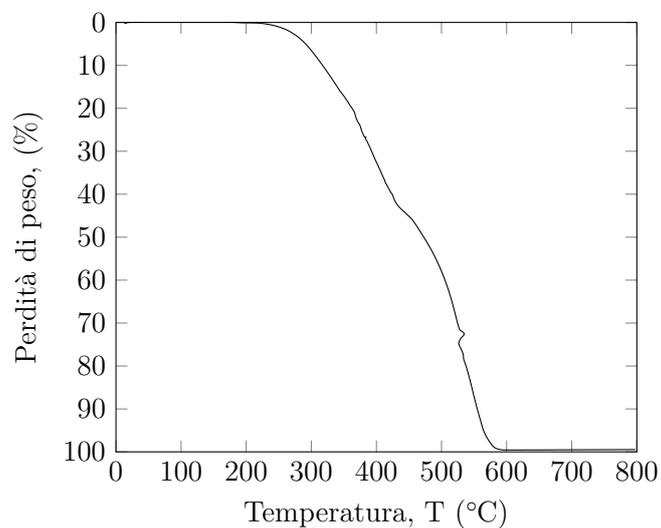


Figura 5.7: Profilo TGA - Curcumina in polvere

L'intervallo di temperatura in cui avviene la degradazione è molto ampio e si sovrappone a quello del surfattante, complicando la quantificazione delle due sostanze in modo separato. Bisogna inoltre tenere conto che alcuni prodotti di degradazione potrebbero non essere

facilmente rimuovibili dal materiale, come già dimostrato nel caso del CTAB in silici MCM-41 [43]. Per poter quantificare, seppur in modo approssimato, la percentuale in peso di curcumina presente nella silice si sceglie quindi di lavorare per "sottrazione", confrontando le perdite di peso delle silici contenenti curcumina rispetto alla sintesi MESO_SiO₂.

In figura 5.8 sono rappresentate le curve TGA dei tre campioni. Le curve, pur avendo andamento simile, mostrano almeno due comportamenti diversi:

1. Nell'intervallo associato alla perdita di acqua fisioadsorbita, la silice senza curcumina ha una perdita in peso maggiore.
2. Nell'ultimo tratto (in cui il CTAB è stato già eliminato) le silici senza curcumina hanno perdita di peso inferiore. In letteratura le perdite in questo range di temperatura sono associate alla condensazione dei silanoli vicinali con espulsione di molecole d'acqua [42]. Nei campioni contenenti curcumina la perdita di peso è maggiore a causa della degradazione prolungata della molecola fino ad elevate temperature (figura 5.7).

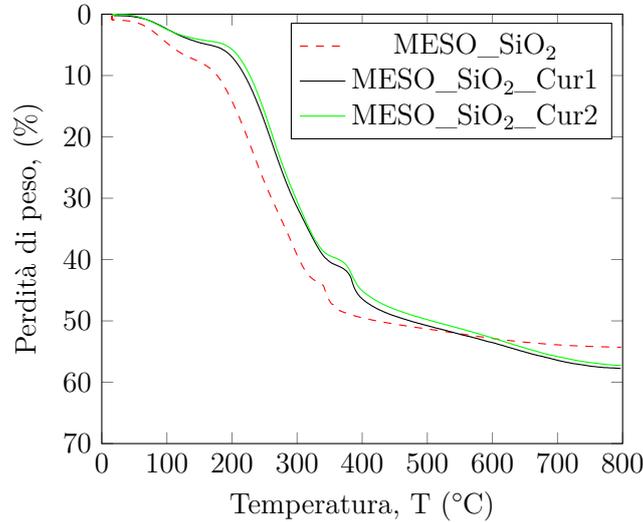


Figura 5.8: Profilo TGA - Confronto sui tre campioni

Nella tabella 5.2 sono riportate le perdite di peso percentuali nei tre campioni. Dalla TGA sui campioni contenenti curcumina sembra che il contenuto del farmaco sia circa il 7% in peso ma tenendo conto delle incertezze di misura intrinseche al test, i valori sono puramente indicativi e vanno confermati mediante altre tecniche di caratterizzazione.

Tabella 5.2: Perdita di peso percentuale - Confronti

Campione	% _{Totale}	% _{150°C}	% _{150-800°C}
MESO_SiO ₂	54.30	7.77	46.53
MESO_SiO ₂ _Cur1	57.30	4.70	53.08
MESO_SiO ₂ _Cur2	57.24	4.13	53.12

5.2.3 Spettroscopia FTIR

Ricavare i picchi caratteristici della sola curcumina è risultato difficile in quanto la molecola del farmaco condivide con il CTAB alcuni gruppi chimici come il CH_3 e il CH_2 con il risultato che i due spettri si sovrappongono. Si è provato quindi a diluire in KBr il campione (50% wt.) per abbassare l'intensità dei picchi di assorbimento nel tentativo di migliorare la risoluzione e far emergere i picchi di assorbimento degli altri gruppi chimici ma il risultato è stato insufficiente. E' stato quindi cambiato approccio e si è provato a leggere lo spettro verificando la presenza di picchi aggiuntivi rispetto a quelli del campione MESO_SiO_2 ed effettivamente è presente un picco principale e alcuni secondari nella regione compresa all'incirca tra 1530 e 1600 cm^{-1} e solitamente associata alle vibrazioni di *stretching* dell'anello aromatico. Per confermare la supposizione che questa serie di picchi appartenga alla curcumina, il campione $\text{MESO_SiO}_2\text{-Cur2}$ è stato riscaldato ad alte temperature per eliminare la componente organica e analizzato nuovamente allo spettrofotometro. I due spettri a confronto, centrati nella regione di interesse, sono riportati in figura 5.9. Effettivamente si può notare la perdita di un picco di assorbimento, potenzialmente riconducibile alla curcumina. Tuttavia, per confermare le ipotesi sono necessarie altre tecniche di caratterizzazione che comprovino la presenza della molecola di curcumina.

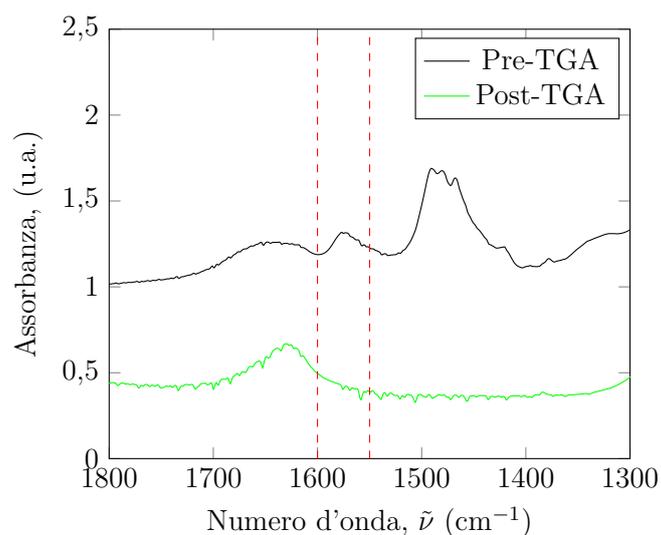


Figura 5.9: Spettro FTIR - $\text{MESO_SiO}_2\text{-Cur2}$ pre/post trattamento termico

5.2.4 Spettroscopia UV/Vis su solido

La spettroscopia UV/Vis su solido permette di verificare la presenza della curcumina all'interno del materiale e in che forma questa si presenta, soprattutto tenendo conto che il CTAB potrebbe assorbire ma solo nella regione del lontano UV non sovrapponendosi al picco principale della curcumina. Di seguito (5.10) sono riportati lo spettro di assorbimento per i campioni $\text{MESO_SiO}_2\text{-Cur1}$ e $\text{MESO_SiO}_2\text{-Cur2}$ dove si osserva in entrambi i casi un picco di assorbimento molto intenso a 476 nm , riconducibile alla curcumina. L'intensità

del picco di assorbimento è inoltre minore per il campione MESO_SiO₂_Cur1 confermando la minor concentrazione di farmaco all'interno del materiale. La posizione del picco è spostata di una decina di nanometri rispetto a quella indicata in letteratura in soluzione acquosa, tuttavia è da tenere conto delle diverse interazioni che possono avvenire tra le molecole di surfattante e le molecole della matrice allo stato solido rispetto a quelle che avvengono in soluzione.

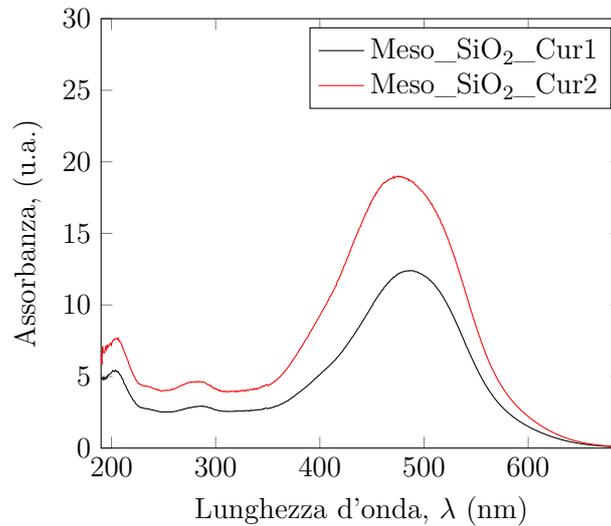


Figura 5.10: Spettro UV/Vis su solido - Confronto su curcumina

5.2.5 Microscopia elettronica FESEM

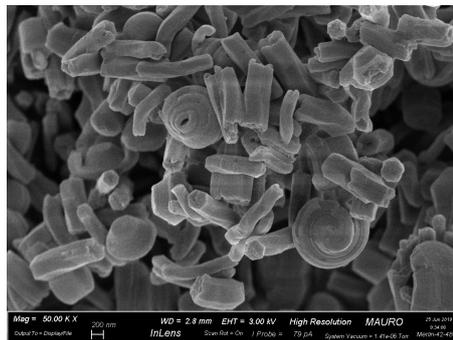
La microscopia elettronica FESEM è stata eseguita sui due campioni contenenti curcumina (figura 5.11). Osservando le immagini si nota immediatamente un cambio nella morfologia e nella dimensione delle particelle rispetto alle silici prive di curcumina (figura 4.12). Il campione a minore concentrazione è formato da particelle allungate del tipo *rod-like* (sottofigura c) pur mantenendo il profilo esagonale tipico delle MCM-41. Al contrario, nel campione con maggior concentrazione di curcumina si ottengono sempre particelle allungate ma con un profilo più irregolare (sottofigura d).

Confrontando questi risultati con il FESEM ottenuto su MESO_SiO₂ si può supporre che la curcumina interagisca con le micelle di surfattante fino ad influenzare il meccanismo di *templating*.

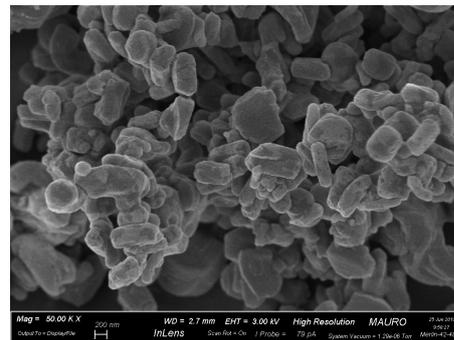
5.3 Lavaggio del campione MESO_SiO₂_Cur1

Premessa

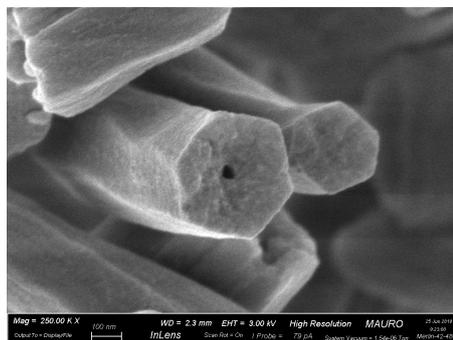
Quando si realizzano sistemi per il rilascio di farmaco è possibile che siano utilizzati, in fase di sintesi, solventi organici per solubilizzare farmaci idrofobici o per realizzare il carrier stesso. Questi solventi sono spesso tossici ed è necessario rimuoverli prima che il prodotto



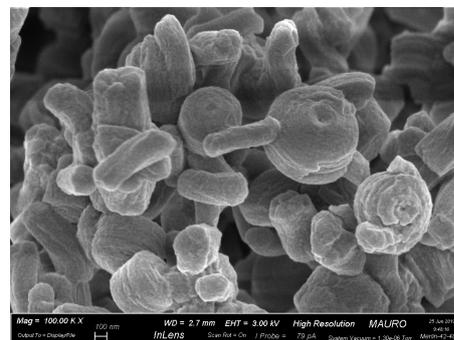
(a) 50 kX



(b) 50 kX



(c) 250 kX



(d) 100 kX

Figura 5.11: FESEM - MESO_SiO₂_Cur1 (a,c), MESO_SiO₂_Cur2 (b,d)

venga ultimato. Nel procedimento di sintesi adottato in questo lavoro di tesi non sono stati utilizzati solventi organici ma alcune condizioni di sintesi come il pH fortemente basico della soluzione o l'utilizzo di surfattanti possono presentare delle criticità. E' quindi opportuno rimuovere i reagenti in eccesso, ad esempio eseguendo dei lavaggi delle polveri ottenute. Nelle sezioni successive saranno descritte le procedure di lavaggio del precipitato e i risultati ottenuti dalle tecniche di caratterizzazione.

5.3.1 Lavaggi

Nel capitolo 2 è stata evidenziata più volte la scarsa solubilità della curcumina e la comune pratica di discioglierla in solventi organici. Da queste considerazioni si è voluto caratterizzare il materiale (MESO_SiO₂_Cur1) dopo averlo lavato in acqua e in etanolo, per comprendere se la curcumina all'interno della mesostruttura sia accessibile o meno ai solventi. L'osservazione visiva del filtrato non può restituire informazioni precise come le tecniche di caratterizzazione ma può comunque essere un primo strumento di valutazione, in particolare sulla ritenzione o meno della curcumina all'interno del materiale.

Si decide di valutare con un campione del tipo MESO_SiO₂_Cur1 il lavaggio del precipitato in acqua distillata. Per farlo, il precipitato viene suddiviso in quattro aliquote e ciascuna di essa è lavata con volumi d'acqua crescenti. Una breve descrizione del procedimento è riportata di seguito (si veda anche la figura 5.12).

- Lavaggio I: 1/4 precipitato ≈190 ml di H₂O.
- Lavaggio II: 1/3 precipitato ≈340 ml di H₂O.
- Lavaggio III: 1/2 precipitato ≈440 ml di H₂O.
- Lavaggio IV: 1/2 precipitato ≈490 ml di H₂O.

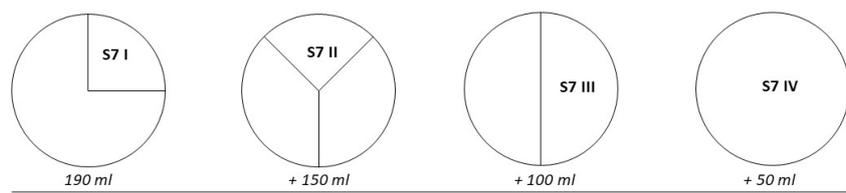


Figura 5.12: Aliquote per il lavaggio in acqua

Nell'elenco seguente viene descritto il lavaggio in etanolo, con annessa una breve descrizione del precipitato e del filtrato risultanti.

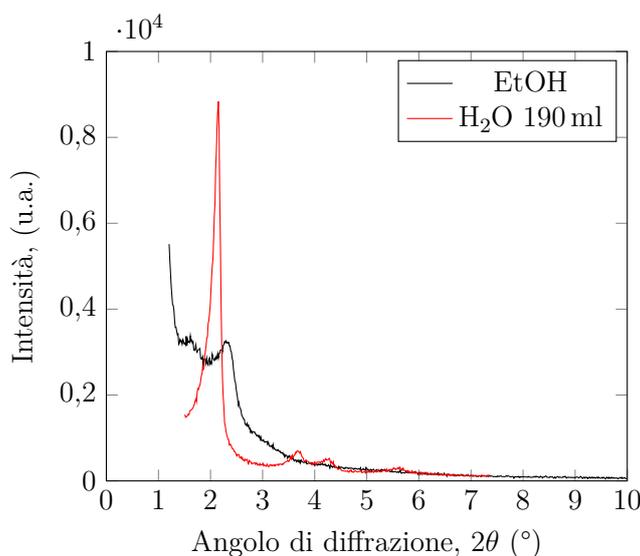
1. ≈100 ml di H₂O: filtrato di colore arancione ad indicare che la curcumina non rimane tutta all'interno delle micelle mentre il precipitato mantiene un colore rosso scuro.
2. ≈100 ml di H₂O: filtrato trasparente, non viene più rilasciata curcumina.
3. ≈100 ml di EtOH: il filtrato vira immediatamente verso il rosso scuro mentre il precipitato si schiarisce fino ad assumere un colore rosa tenue (figura 5.13); l'etanolo è quindi in grado di estrarre la curcumina dal sistema.

Figura 5.13: Precipitato MESO_SiO₂_Cur2 post lavaggio in etanolo

Dalle prime osservazioni è chiaro come la curcumina sia accessibile all'etanolo e di conseguenza la scelta di tale solvente non è auspicabile.

5.3.2 Diffrazione a raggi X

Gli spettri XRD ottenuti per bassi angoli dei campioni lavati in acqua e in etanolo sono mostrati in figura 5.14. Come è possibile notare, il lavaggio in acqua non modifica la mesostruttura. Al contrario, dopo il lavaggio in etanolo i picchi di diffrazione ottenuti non sono associabili ad una silice MCM-41 in quanto non sono ben definiti e sono più simili a quelli presenti in un materiale non ordinato (mancano inoltre tutti i picchi successivi al primo). Per provare a giustificare un cambiamento così evidente bisogna ricordare come il precipitato in seguito al lavaggio con solvente organico abbia perso la quasi totalità della curcumina (figure 5.13). Sebbene in questa fase non sia ancora chiaro il ruolo della curcumina nel meccanismo di *templating*, il lavaggio in etanolo rende sicuramente instabile la mesostruttura facendole perdere l'ordine strutturale a lungo raggio e porta quindi a pensare che la curcumina sia all'interno delle micelle di surfattante. Inoltre, l'etanolo molto probabilmente è in grado di rimuovere anche il tensioattivo.

Figura 5.14: Spettro XRD a bassi angoli - EtOH/H₂O

5.3.3 Spettroscopia UV/Vis su solido

Nell'immagine seguente sono rappresentati gli spettri di assorbimento UV/Vis su solido del campione lavato con acqua². Dalla posizione dei picchi principali si può affermare che è sicuramente presente curcumina all'interno del materiale allo stato deprotonato e l'intensità del picco varia a seconda della concentrazione della sostanza nella silice. Più precisamente, il lavaggio in acqua prolungato causa una leggera diminuzione dell'intensità del picco, dovuta probabilmente alla perdita di curcumina dal materiale; è una diminuzione comunque trascurabile e conferma la bontà della scelta di utilizzare solamente l'acqua per lavare il precipitato.

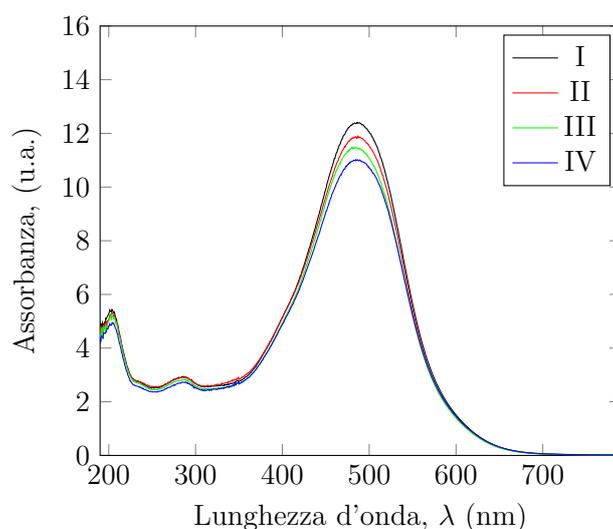


Figura 5.15: Spettro UV/Vis solido - MESO_SiO₂_Cur1 in H₂O

5.4 Estrazione in etanolo

Dopo aver dimostrato l'effettiva capacità da parte dell'etanolo di rimuovere la curcumina dal materiale, si procede ad un'estrazione nel medesimo solvente. La tecnica dell'*estrazione tramite solvente* sfrutta la maggior affinità della curcumina per il solvente organico nel tentativo di estrarre tutto il quantitativo della sostanza dal materiale. Seguendo il procedimento già descritto nella sezione 3.4, vengono realizzate la soluzione madre (605.4 ppm) e le soluzioni figlie in etanolo e si costruisce la retta di taratura. In seguito, si procede a rilasciare alcune decine di mg del campione MESO_SiO₂_Cur2 (18.3 mg) in un volume contenuto (99.3 ml) di etanolo. Ad ogni intervallo di tempo prefissato si prelevano³ alcuni ml di soluzione e si passano allo spettrofotometro per l'UV/Vis.

²Il lavaggio in etanolo, facendo perdere la mesostruttura, non viene più caratterizzato.

³E' stata utilizzata una siringa dotata di fitro per evitare che entrasse del precipitato solido nella cuvetta.

Di seguito sono riportate la suddivisione delle soluzioni figlie (tabella 5.3), la retta di taratura in etanolo (figura 5.16) e i valori di assorbanza in funzione del tempo della prova di estrazione (figura 5.17).

Tabella 5.3: Taratura della curcumina in EtOH

Volume madre (ml)	Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[Figlia] _{desiderata} (ppm)	[Figlia] _{reale} (ppm)
0.13	0.1093	50.1477	1	1.06
0.13	0.0933	25.0237	2	2.05
5.26	0.1950	25.0458	5	4.52
7.04	0.2964	25.0246	7	7.05
1.01	0.7644	25.0259	10	9.32

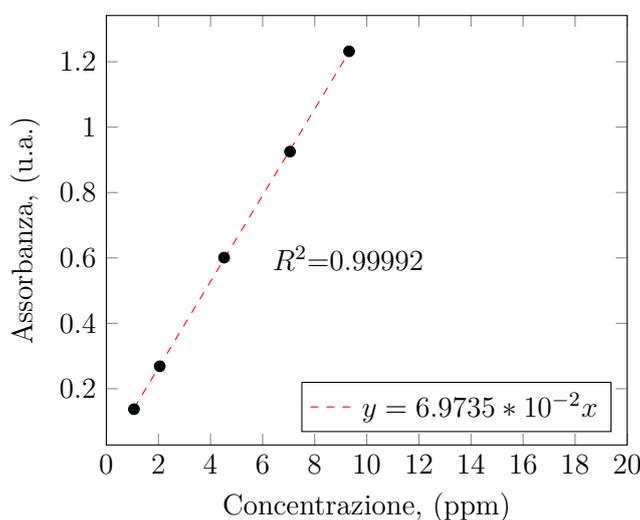


Figura 5.16: Retta di taratura - EtOH

Al termine dell'estrazione si ricavano un quantitativo di 0.73 mg di curcumina corrispondenti al 4.03% in peso del campione.

Spettroscopia UV/Visibile sui filtrati nel tempo

Il colore del filtrato prelevato durante la fase di filtraggio dimostra che vi è sicuramente una percentuale di curcumina che non è stata incorporata nel materiale. Si è deciso quindi di utilizzare lo spettro UV/Vis ricavato a diversi giorni di distanza dalla sintesi per valutare qualitativamente la degradazione della curcumina all'interno del filtrato. Come si può osservare dal grafico 5.18 il picco principale della curcumina, posizionato a lunghezze d'onda maggiore a causa della deprotonazione della molecola, è ancora presente dopo un tempo approssimativo di 24 ore (dalla sintesi) ma scompare in un tempo compreso tra 1 e 10 giorni. Questo risultato conferma l'impossibilità di mantenere la curcumina integra in soluzioni acquose basiche per tempi prolungati senza la "protezione" delle micelle del CTAB.

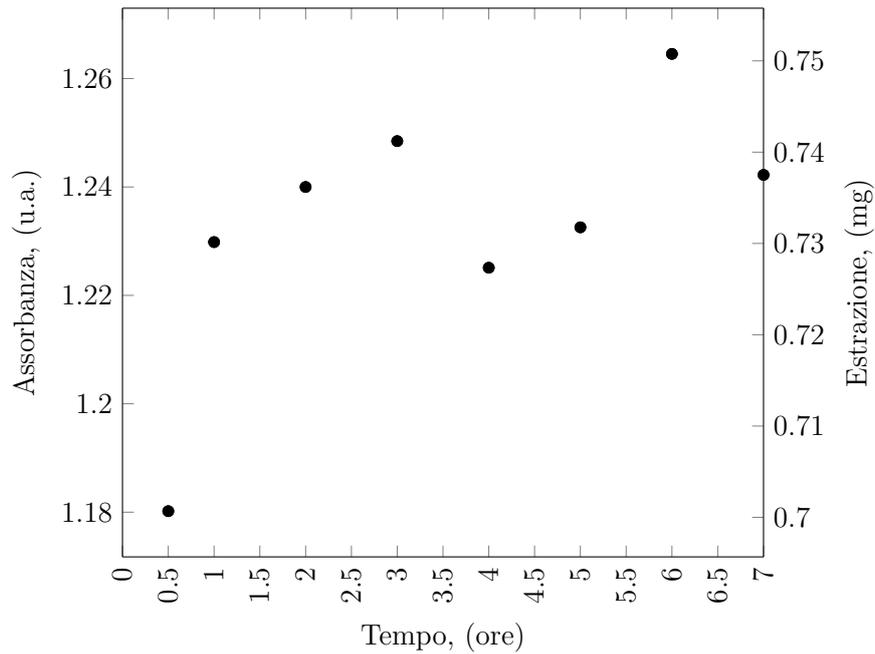


Figura 5.17: Estrazione in EtOH - MESO_SiO₂_2

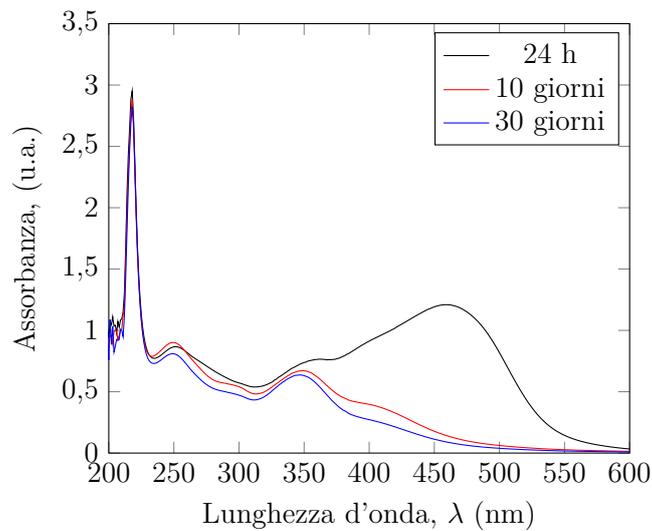


Figura 5.18: Spettro UV/Vis sul filtrato - MESO_SiO₂_Cur2

Conclusioni

Nel precedente capitolo la caratterizzazione svolta sul campione MESO_SiO₂ ha confermato l'ottenimento di una silice mesostrutturata contenente le micelle di surfattante all'interno dei pori. In questo capitolo si è valuta la possibilità di utilizzare un materiale di questo tipo per incorporare la curcumina. L'approccio scelto è stato di tipo *bottom-up*: attorno alla

molecola di curcumina viene infatti costruito il carrier. E' stato provato che il materiale mantiene la mesostruttura, con le molecole di curcumina disposte probabilmente all'interno delle micelle di surfattante. La curcumina non viene estratta dall'acqua, ma è accessibile all'etanolo. I lavaggi in etanolo propabilmente estraggono allo stesso tempo la curcumina e il CTAB, causando la perdita dell'ordine a lungo raggio all'interno del materiale.

Nella figura 5.19 è rappresentato un modello della silice mesostrutturata ottenuta e gli effetti del lavaggio sul materiale.

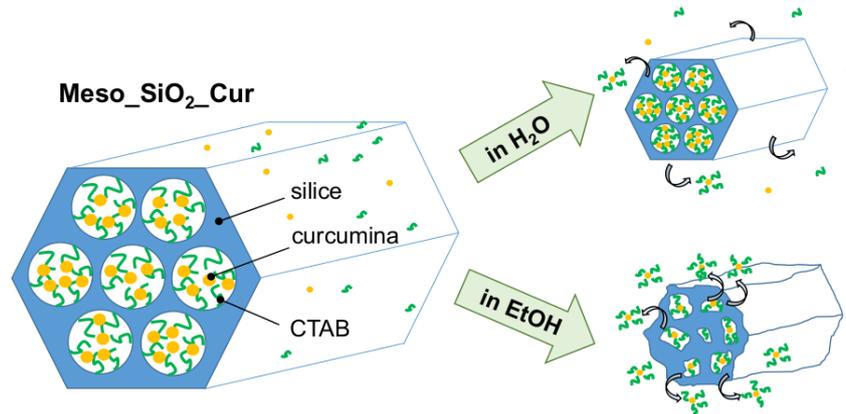


Figura 5.19: Modello di silici mesostrutturate contenenti curcumina

Capitolo 6

Rilascio di curcumina dalle silici mesostrutturate

L'ultima fase del lavoro di laboratorio ha riguardato i test di rilascio della curcumina dalle silici mesostrutturate. Questi test permettono di verificare che il rilascio del farmaco sia effettivamente possibile e soprattutto permettono di quantificarlo. Inoltre, dal momento che il sistema di analisi è un sistema chiuso, è possibile recuperare alla fine del test il residuo della sintesi valutando così anche il comportamento del carrier. I procedimenti sono spiegati in dettaglio nella sezione 3.4.

Generalmente, i test di rilascio si svolgono in soluzioni che mimano l'ambiente fisiologico in cui verrà utilizzato il carrier con il farmaco. Tenendo conto dell'ampio spettro di trattamenti che vedono protagonista la curcumina, si è scelto di eseguire i test in tre soluzioni che simulano ambienti fisiologici diversi: una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) dal momento che è ritenuto uno standard nei test biologici, una soluzione di HCl che simula l'ambiente gastrico ed una soluzione di sali che simula il sudore della pelle (AS) per riprodurre l'ambiente topico [47] [48]. Il campione scelto per i test di rilascio è il ME-SO-SiO₂-Cur2 che, secondo la composizione della miscela di sintesi, contiene la maggior quantità di curcumina.

Prima di procedere ai rilasci è necessario fare una premessa: le tre soluzioni scelte sono tutte soluzioni acquose ed il fatto che la curcumina è una molecola idrofobica e pressochè insolubile in acqua potrebbe essere di impedimento al rilascio del principio attivo da parte della silice. In uno studio sulla curcumina in soluzione di PBS, l'utilizzo di molecole di surfattante (in quel caso anionico) ha permesso di aumentare la solubilità della curcumina anche in ambiente acquoso [49]; è nota infatti la capacità dei surfattanti (se presenti in concentrazione maggiore della CMC) di solubilizzare i farmaci idrofobici. In quest'ottica, quelle stesse micelle di CTAB che hanno confinato al loro interno la curcumina in fase di sintesi, se rilasciate anch'esse, potrebbero aumentare la solubilità della curcumina in soluzione acquosa permettendone il rilascio dalla silice.

6.1 Rilascio in PBS

Per costruire la retta di taratura in PBS bisogna preparare inizialmente una soluzione madre di curcumina in etanolo. Il solvente organico consente di ottenere una concentrazione elevata di curcumina mantenendo dei volumi di soluzione accettabili (la solubilità della curcumina in etanolo è di 10 mg ml^{-1}). Vengono quindi disciolti 11.20 mg di curcumina in 18.50 g di etanolo; applicando l'equazione 3.5 si ricava una concentrazione di 605.4 ppm .

A questo punto si prelevano delle aliquote crescenti di soluzione madre che vengono portate a peso¹ con il PBS (0.01 M , $\text{pH}=7.4$) ottenendo le soluzioni figlie. In tabella 6.1 sono riportate le concentrazioni di soluzione figlia ed i relativi volumi di soluzione madre prelevati per ottenerle, ricavati tramite l'equazione 3.6.

In figura 6.1 sono rappresentate due rette di taratura della curcumina in PBS. Come si può osservare, le rette presentano coefficienti di determinazione R^2 diversi. Avendo scelto R^2 come indice della bontà dell'interpolazione lineare, si preferisce scartare il punto a concentrazione maggiore. In seguito le rette di taratura e i test di rilascio verranno concepiti in maniera tale da ricadere in un intervallo di concentrazioni compreso tra 0 e 8 ppm .

Tabella 6.1: Taratura della curcumina in PBS

Volume madre (ml)	Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[figlia] _{desiderata} (ppm)	[figlia] _{reale} (ppm)
0.13	0.0933	50.147	1	1.32
0.13	0.1093	25.0237	2	2.26
5.26	0.1950	25.0458	5	4.71
7.04	0.2964	25.0246	7	7.08
1.01	0.7644	25.0259	20	18.48

¹Avendo scelto di utilizzare i ppm si considerano le masse di soluzione al posto dei volumi.

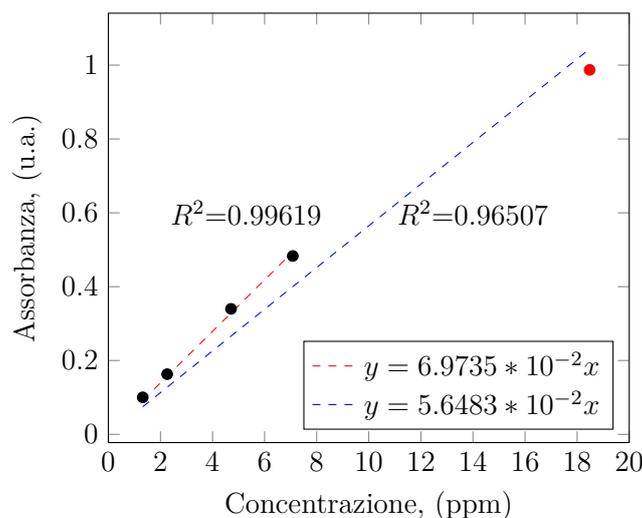


Figura 6.1: Retta di taratura - PBS

6.1.1 Test in PBS

Per procedere al test di rilascio si pesano 50.02 mg di MESO_SiO₂_Cur2 e si aggiungono ad un volume del peso di 500 g di PBS all'interno del serbatoio. Lo spettrofotometro viene impostato per misurare l'assorbimento a $\lambda=425$ nm che corrisponde al valore medio di lunghezza d'onda a cui avviene l'assorbimento massimo della curcumina in PBS. I parametri degli strumenti sono elencati nella sezione 3.4. E' interessante osservare come il precipitato, a contatto con una soluzione a pH pressochè neutro, riacquista rapidamente un colore giallo arancio, indice della riavvenuta protonazione della molecola. Il profilo di rilascio (figura 6.2) viene espresso in valori di assorbanza e mg di curcumina rilasciata in funzione del tempo.

Osservando l'andamento della curva, si nota che la silice non presenta un *burst-release* ma richiede un tempo di circa due ore prima di iniziare a rilasciare il farmaco. Il *plateau* viene raggiunto dopo 5 ore di tempo. La massa finale di curcumina rilasciata è di 2.84 mg, corrispondenti al 5.68% in peso (rispetto alla polvere iniziale). Il valore ottenuto è maggiore di quello ricavato con l'estrazione (4.03% wt.) ma è comunque comparabile, per cui si può ipotizzare che la curcumina venga rilasciata completamente.

Residuo finale

A conclusione del test, la soluzione viene filtrata per gravità con filtro da 25 μ m separando la fase liquida da quella solida. Mentre il filtrato viene analizzato tramite spettroscopia UV/Vis sull'intervallo tra 190 nm e 600 nm, la parte solida viene pesata.

Unendo i risultati del test con la pesatura del precipitato e la spettroscopia post-rilascio si ottengono due importanti risultati:

1. La polvere si è disciolta completamente nella soluzione di PBS e il quantitativo di precipitato recuperato è irrilevante.
2. Lo spettro UV/Vis restituisce la forma caratteristica della curcumina, dimostrando la mancata degradazione del principio attivo.

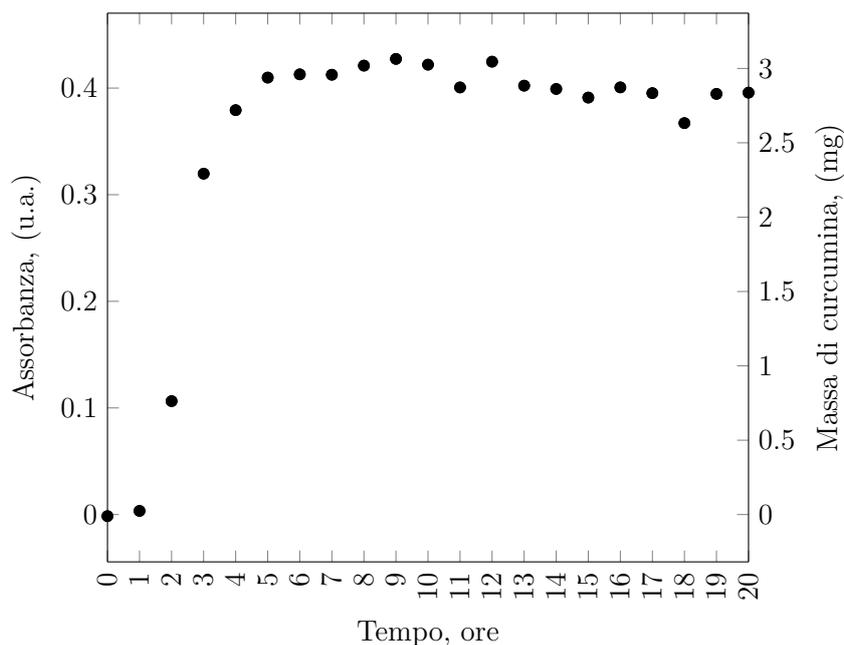


Figura 6.2: Rilascio - PBS

Il primo risultato può essere giustificato considerando la silice mesostrutturata come un materiale metastabile che subisce processi di degradazione in soluzione. Il secondo risultato è in contrasto con quelli riportati in letteratura che vedono nel PBS una soluzione in grado di degradare rapidamente la curcumina [50]. Tenendo conto del fatto che la silice si è disciolta completamente e che il PBS è una soluzione acquosa, si può supporre che il surfattante venga rilasciato anch'esso dalla silice continuando a mantenere lo stato micellare. In questo modo la curcumina, rimanendo all'interno delle micelle, avrebbe una maggiore solubilità in acqua e sarebbe protetta dalla degradazione in PBS.

6.2 Rilascio in sudore artificiale

In tabella 6.2 sono indicati i grammi di reagenti necessari per ottenere la soluzione di sudore artificiale.

Tabella 6.2: Composizione sudore artificiale

Sostanza	Peso (g)
NaCl	2.3366
CaCl ₂	0.1329
MgSO ₄	0.0968
KH ₂ PO ₄	0.8165

Per correggere il pH del preparato (pH=4.6) si aggiungono ≈ 11 ml di soluzione di NaOH 0.05 M, aumentandolo fino a pH=5.4. In seguito si procede a realizzare la soluzione madre in etanolo (594 ppm) e le soluzioni figlie in AS (tabella 6.3).

Tabella 6.3: Taratura della curcumina in sudore artificiale

Volume madre (ml)	Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[figlia] _{desiderata} (ppm)	[figlia] _{desiderata} (ppm)
0.14	0.0939	50.0163	1	1.12
0.14	0.1005	25.0015	2	2.39
0.26	0.1979	25.0076	5	4.70
0.38	0.3058	25.0178	7	7.26

In figura 6.3 è riportata la retta di taratura della curcumina in AS. Come si può notare, il coefficiente R^2 è leggermente minore (c'è più scostamento tra i dati) rispetto a quello ricavato in PBS ed è probabilmente dovuto al fatto che il pH più basso rende maggiormente instabile la curcumina in soluzione acquosa.

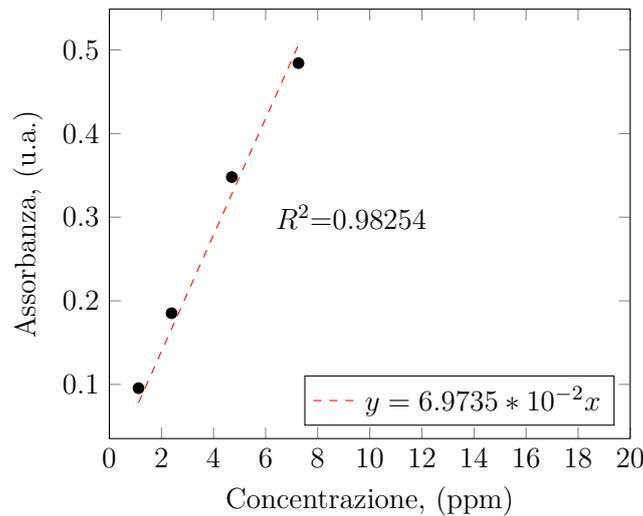


Figura 6.3: Retta di taratura - Sudore artificiale

6.2.1 Test in AS

Per il test vengono pesati 50.8 mg di di MESO_SiO₂_Cur2 e aggiunti ad un volume di 500 g di AS all'interno del serbatoio. Lo spettrofotometro viene impostato per misurare l'assorbimento a $\lambda=427$ nm che corrisponde, questa volta, al valore medio di lunghezza d'onda in cui si ha assorbimento massimo in AS. I parametri degli strumenti sono elencati nella sezione 3.4. Il profilo di rilascio (figura 6.4) viene sempre espresso contemporaneamente in valori di assorbanza e in mg di curcumina rilasciata in funzione del tempo.

Il risultato del test di rilascio è analogo a quello riscontrato in PBS ma con alcune differenze:

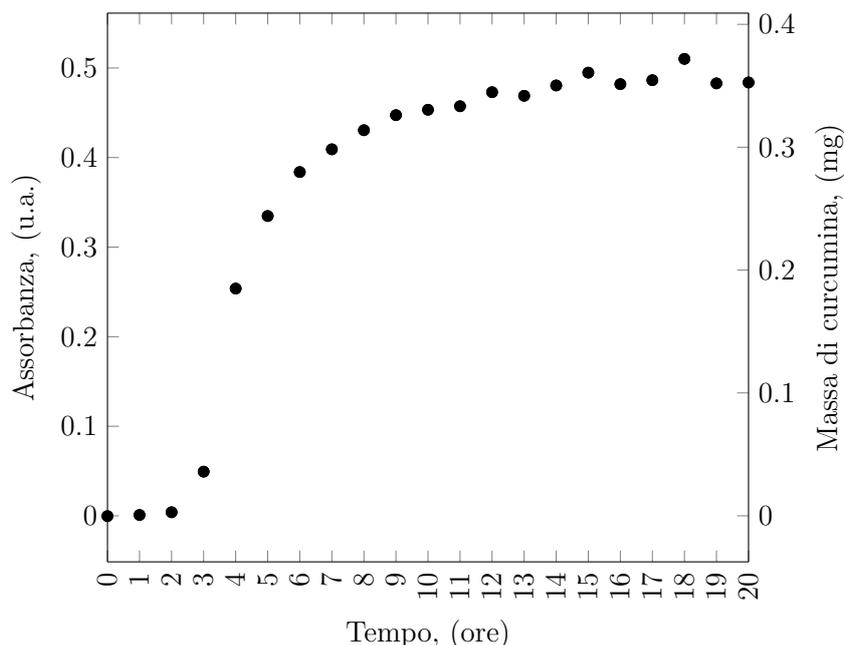


Figura 6.4: Rilascio - Sudore artificiale

1. Il rilascio è inizialmente più lento e necessita di un'ora in più di tempo prima di essere rilevante;
2. Dopo 20 ore non sembra che si sia raggiunto un plateau; al contrario si nota un trend crescente dei valori di curcumina rilasciata nel tratto finale². La massa finale di curcumina rilasciata è di 3.47 mg, corrispondenti al 6.83% in peso (rispetto alla polvere iniziale).

Residuo finale

A conclusione del test, la soluzione viene filtrata secondo il procedimento già descritto nella sezione 6.1; anche in questo caso non è possibile recuperare un quantitativo pesabile di precipitato. Le supposizioni fatte per il rilascio in PBS sono riadattabili anche al sudore artificiale a cui si aggiunge un ulteriore risultato: analizzando lo spettro UV/Vis post-filtraggio si osserva infatti come il picco di massimo assorbimento, pur essendo posizionato sempre sulla lunghezza d'onda corretta, presenta una forma diversa con la comparsa di due spalle attorno al picco principale³. In letteratura è presente uno studio di spettroscopia che associa il cambiamento nello spettro di assorbimento della curcumina in seguito all'interazione con il CTAB (figura 6.5). Considerando che l'assorbimento di una sostanza è molto influenzata dall'ambiente in cui si trova e dalle interazioni con le altre molecole,

²Il test non è stato possibile prostrarlo oltre le venti ore per problemi di memoria del calcolatore.

³Questa diversità è presente anche nel caso del PBS ma è più accentuata in AS

gli autori hanno giustificato il cambiamento nella forma del picco della curcumina in seguito alle interazioni con il surfattante allo stato micellare [29]. Il fatto che nello spettro post filtraggio questa particolare forma sia ben evidente sembra avvalorare l'ipotesi che la curcumina venga rilasciata in ambiente acquoso all'interno delle micelle.

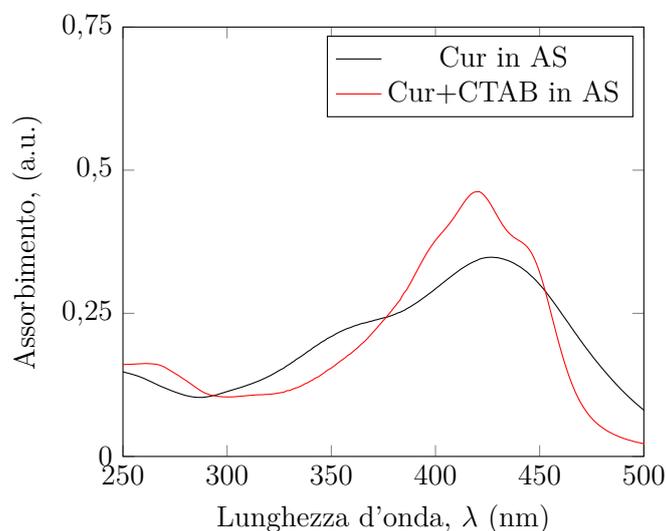


Figura 6.5: Rilascio - Confronto Cur+CTAB in AS

6.3 Rilascio in ambiente gastrico

L'ultimo test di rilascio è stato condotto in una soluzione a pH acido che simulasse l'ambiente gastrico. Per ottenere la retta di taratura in HCl si ricorre nuovamente all'espedito della soluzione madre in etanolo (≈ 605.4 ppm) soprattutto tenendo conto del fatto che a pH acido la curcumina diventa ancora più insolubile e instabile in ambiente acquoso. La soluzione acida si ricava miscelando 5.40 ml di HCl 37%wt. in 644.63 g di H₂O (0.1 M, pH=0.8).

In tabella 6.4 sono riportate le concentrazioni e i relativi volumi delle soluzioni, ricavati tramite l'equazione 3.6 mentre in figura 6.6 è presentata la retta di taratura.

Tabella 6.4: Taratura curcumina in soluzione di HCl

Volume madre (ml)	Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[figlia] (ppm)	[figlia] _{desiderata} (ppm)
0.14	0.1025	50.0087	1	1.32
0.14	0.1014	25.0058	2	2.26
0.26	0.2024	25.0065	5	4.71
0.39	0.3000	25.0165	7	7.08

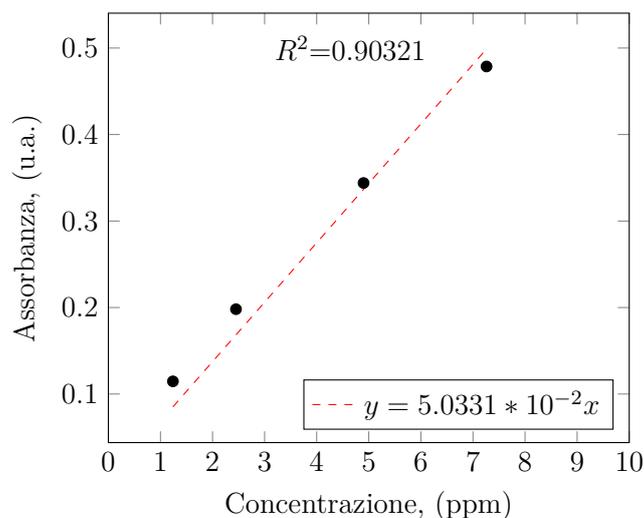


Figura 6.6: Retta di taratura - Soluzione di HCl

6.3.1 Test in soluzione di HCl

Per il test si pesano 47.7 mg del campione aggiungendoli ad una soluzione del peso di 500 g di HCl. Per misurare l'assorbimento si sceglie la lunghezza d'onda $\lambda=429$ nm e si impostano nello spettrofotometro gli stessi parametri dei test precedenti. Nel grafico (6.7) vengono espressi l'assorbanza e i mg di curcumina rilasciata in funzione del tempo.

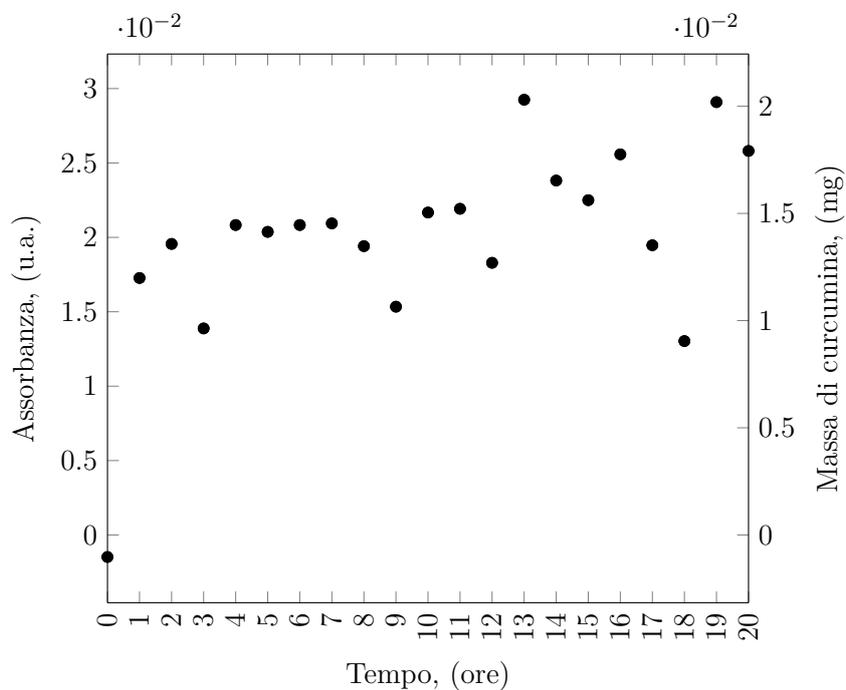


Figura 6.7: Rilascio - Soluzione di HCl

Il risultato del test di rilascio è completamente diverso da quelli ottenuti in PBS e AS. La prima grande differenza è nel profilo di rilascio: la quantità di curcumina rilevabile dallo spettrofotometro è praticamente trascurabile lungo tutto l'arco di tempo delle 20 ore, con un quantitativo finale di 0.2 mg, equivalenti allo 0.38% in peso (rispetto al precipitato iniziale).

Residuo finale

Osserando il precipitato dopo la fase di filtraggio si nota la seconda grande differenza: è presente un residuo quantificabile in 14.1 mg di colore giallo-arancio (figura 6.8). La silice mesostrutturata, in ambiente fortemente acido, non si è degradata completamente come successo in PBS e AS. La colorazione intensa della polvere insieme alla spettroscopia post-filtraggio sul filtrato confermano il mantenimento della curcumina all'interno del carrier ed il suo rilascio praticamente nullo.



Figura 6.8: Rilascio in soluzione di HCl - Precipitato finale

Considerando i risultati precedenti, l'ipotesi che la curcumina venga rilasciata in ambiente acquoso solo se all'interno delle micelle di surfattante sembra essere ulteriormente confermata. Il viraggio verso un colore giallo-arancio dimostra che la silice mesostrutturata è permeabile alla soluzione acida ma allo stesso tempo la sua mancata degradazione non libera le micelle di surfattante e di conseguenza non viene rilasciata la curcumina.

Capitolo 7

Conclusioni e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi è stato realizzato un sistema per il rilascio di curcumina basato su silici mesostrutturati. L'approccio scelto per realizzare il sistema è stato di tipo *bottom-up*, costruendo il *carrier* di silice amorfa attorno alle micelle di surfattante contenenti la molecola di curcumina. La motivazione di questa scelta è da ricercarsi nella scarsa solubilità in acqua della curcumina e nella rapida degradazione che essa subisce; in quest'ottica le micelle di surfattante permettono di solubilizzare il farmaco anche in ambiente acquoso e la proteggono dalla degradazione, mentre la matrice di silice successiva funge da supporto.

La prima parte di lavoro sperimentale è consistita nella sintesi di una silice mesostrutturata priva di curcumina. Il procedimento di sintesi si è svolto in soluzione acquosa, a temperatura e pressione ambiente, condizioni favorevoli alla successiva introduzione di molecole organiche. Le uniche criticità riscontrate in questa fase hanno riguardato l'utilizzo di una soluzione fortemente basica e di un surfattante potenzialmente tossico in vista di un'applicazione biomedicale se in quantità elevate. Dopo l'ottimizzazione dei parametri di sintesi (azione dell'agitatore magnetico, metodi e tempi di attesa per la somministrazione dei reagenti) è stato ottenuto un campione di materiale di riferimento senza curcumina. La caratterizzazione eseguita tramite diffrattometria a raggi X ha confermato l'ottenimento di una silice mesostrutturata del tipo MCM-41. La spettroscopia FTIR ha verificato la presenza delle molecole di surfattante che si suppone siano posizionate all'interno del materiale, aggregate in micelle tra la superficie della silice carica negativamente. L'assenza del picco caratteristico dei silanoli liberi, presente invece nelle silici mesoporose descritte in letteratura, ha suggerito un'interazione tra i silanoli superficiali anionici e le teste cationiche del surfattante. La microscopia elettronica tramite FESEM ha mostrato particelle a sezione esagonale in linea con quelle presenti in letteratura per le MCM-41. La spettroscopia EDS ha evidenziato una percentuale trascurabile dell'elemento sodio e dello ione bromuro. Quest'ultimo risultato rafforza il modello proposto per il materiale che vede le teste cationiche di surfattante non più in interazione con lo ione bromuro ma piuttosto con i gruppi superficiali SiO^- .

La seconda fase ha riguardato l'aggiunta della curcumina nella miscela di sintesi. La quantità di principio attivo è stata fatta variare ottenendo due silici mesostrutturati a differente concentrazione di curcumina. Su questi due campioni è stata eseguita un'iniziale caratterizzazione per valutare quanto l'aggiunta della curcumina potesse influenzare la mesostruttura. Dai risultati ottenuti tramite diffrattometria a raggi X è emerso come

l'aggiunta della molecola organica, in tutte e due le concentrazioni, non cambi la mesostruttura del materiale, ma aumenti il parametro di cella in un'azione di rigonfiamento, ancora più evidente nel campione con maggiore quantità di curcumina. La stessa tecnica di caratterizzazione è stata utilizzata per verificare il mantenimento dello stato amorfo della curcumina. Un farmaco allo stato amorfo è preferibile nei sistemi di rilascio in quanto la forma amorfa ha il vantaggio di rendere il farmaco maggiormente biodisponibile.

La spettroscopia FTIR e UV/Vis su solido hanno confermato la presenza della curcumina all'interno del materiale, come dimostrato dall'intenso colore assunto dal precipitato alla fine del procedimento di sintesi. Inoltre la spettroscopia UV/Vis su solido ha permesso di verificare sulla base del valore di assorbanza dei campioni la diversa quantità di curcumina all'interno del materiale.

Utilizzando il FESEM si è osservato che l'aggiunta della curcumina ha modificato la morfologia delle particelle: nel campione a concentrazione minore le particelle hanno assunto una forma *rod-like* (a bastoncino), mantenendo comunque la sezione esagonale, mentre nel campione a concentrazione maggiore sono state osservate molte particelle con morfologia allungata ma senza il profilo caratteristico delle MCM-41. Questi risultati suggeriscono che la molecola organica non agisca solamente come *swelling-agent* ma influenzi anche l'azione di *templating-agent* delle micelle di surfattante.

Sui campioni contenenti curcumina sono stati condotti una serie di lavaggi con volumi crescenti di acqua ed etanolo. Le motivazioni sono due: rimuovere i reagenti in eccesso, soprattutto per quanto riguarda l'idrossido di sodio e le molecole di surfattante, e studiare l'accessibilità alla curcumina da parte di questi solventi. Il lavaggio in acqua ha rimosso un quantitativo trascurabile di curcumina e non ha causato la perdita della mesostruttura, come dimostrato dalla spettroscopia UV/Vis su solido e dalla diffrattometria a raggi X. L'etanolo, al contrario, ha estratto la curcumina fin dal primo lavaggio e molto probabilmente ha portato in soluzione anche le molecole di surfattante, facendo perdere al materiale la sua mesostruttura. L'elevata solubilità della curcumina in etanolo è stata sfruttata anche per quantificare la percentuale di farmaco all'interno del materiale tramite estrazione in etanolo. Dal campione con maggior quantitativo di curcumina si è ricavato un valore di 4.03% in peso di curcumina. Il valore ottenuto è minore rispetto a quello nominale (9%); si può quindi supporre che:

1. Non tutta la curcumina venga incorporata nella silice mesostrutturata durante il processo di sintesi.
2. Subentrino processi di degradazione che portano a sottostimare la quantità di curcumina nei test di estrazione in etanolo.

Si può comunque concludere che la quantità di curcumina all'interno del materiale è compresa tra il 4% e il 9% in peso.

La terza e ultima fase è consistita nelle prove di rilascio della curcumina dalla silice mesostrutturata a maggior concentrazione di farmaco. I test sono stati condotti con gli stessi parametri ma in diverse soluzioni che simulassero le possibili applicazioni del sistema silice-farmaco. Confrontando i profili di rilascio si è osservato per la soluzione di PBS e per quella di sudore artificiale un comportamento simile: non è presente un *burst-release* bensì un rilascio graduale che richiede rispettivamente una e due ore di tempo prima di iniziare

ad essere rilevabile dallo spettrofotometro. Confrontando la quantità di curcumina rilasciata a fine test con quella nominale e quella ottenuta tramite estrazione, si può supporre che la curcumina venga rilasciata quasi completamente. La forma dei picchi di assorbimento della curcumina suggerisce che quest'ultima viene rilasciata dal materiale rimanendo all'interno delle micelle. Inoltre in tutte e due le soluzioni non è stato possibile recuperare un quantitativo apprezzabile di polvere residua. Il rilascio in soluzione di HCl ha avuto un esito completamente diverso: il livello di curcumina estratta è trascurabile lungo tutto l'intervallo di tempo scelto per la prova di rilascio. Inoltre, alla fine dell'esperimento è stato possibile recuperare alcune decine di mg di polvere di colore giallo, ad indicare la ritenzione della curcumina all'interno del materiale.

Dai test di rilascio svolti sul campione si può concludere che:

1. Il sistema non è adeguato per una somministrazione orale dal momento che il rilascio di curcumina in ambiente acido è praticamente nullo ed il *carrier* rimane integro.
2. In soluzioni saline a pH debolmente acido (sudore artificiale) o neutro (tampone salino) il *carrier* subisce reazioni di degradazione della matrice amorfa, liberando le micelle di surfattante. Queste, a loro volta, continuano a trasportare al loro interno la curcumina permettendone il rilascio anche in soluzione acquosa.

L'ultimo punto conferma la validità di questo sistema di rilascio per applicazioni topiche (ad esempio per il trattamento della psoriasi vista l'efficacia della curcumina come anti-psoriasi). Ai potenziali effetti benefici della curcumina si può aggiungere inoltre la fonte di silicio rilasciata dalla matrice del materiale, che svolge funzione trofica verso i tessuti. Concludendo, durante questo lavoro di tesi sono state sintetizzate con successo tre silici mesostrutturate, di cui una priva di curcumina e le altre contenenti il farmaco in due concentrazioni diverse. Il ruolo che riveste il surfattante nel rilascio di curcumina indirizza i possibili sviluppi futuri sulla scelta di altri tipi di surfattante in grado di svolgere la funzione di *templating-agent* per la silice mesostrutturata e allo stesso tempo che non presenti criticità anche a dosi elevate, come ad esempio l'octenidina dicloridrato (OCT).

Appendice A

Confronti

In figura A.1 sono graficati contemporaneamente i tre profili di rilascio nelle differenti soluzioni.

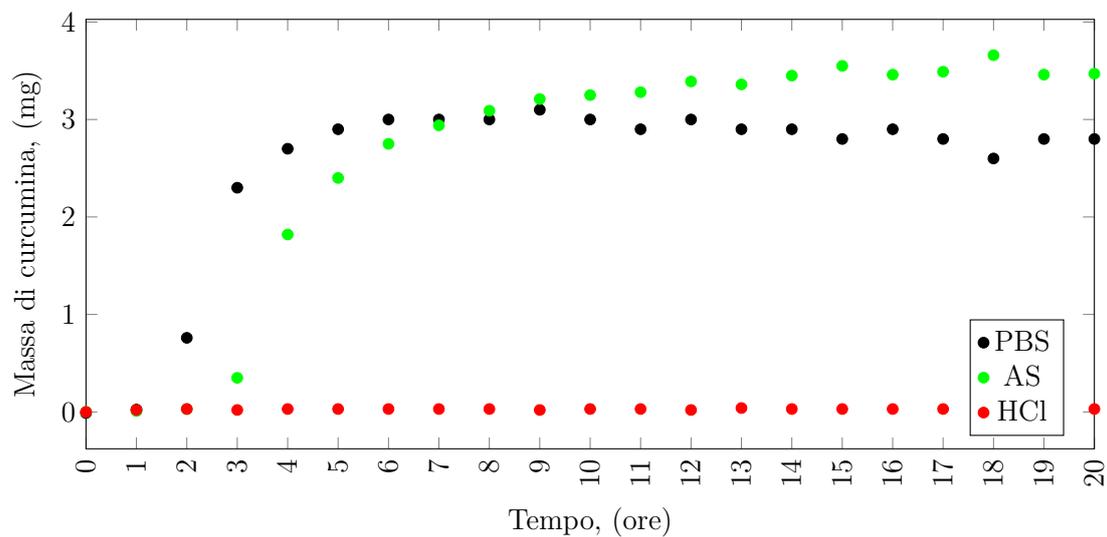


Figura A.1: Profili di rilascio - PBS,AS,HCl

Ringraziamenti

Leggo molto spesso che i ringraziamenti non sarebbero da scrivere, a quanto pare sono considerati solamente una consuetudine. Tuttavia, le lezioni seguite presso la Facoltà di Giurisprudenza mi hanno insegnato una cosa molto importante: le consuetudini sono dure a morire. Se considero anche che questa molto probabilmente sarà la mia ultima esperienza da studente (sigh!), i ringraziamenti per me sono d'obbligo.

Voglio quindi ringraziare tutto il personale del DISAT che ho avuto il piacere di conoscere e frequentare: professori, dottorandi e tesisti (ciao Sara e Marianna) e personale amministrativo. Spero in questo modo di raggiungervi tutti.

Voglio invece ringraziare in modo particolare la professoressa Onida per avermi dato, prima di tutto, la possibilità di svolgere questa tesi presso un dipartimento non mio e per avermi aiutato a superare tutti gli ostacoli che posso avere incontrato in questi mesi. Affrontare una tesi sperimentale quando (ahimè!) si sono passati troppi anni solo sui libri è un'esperienza molto bella e gratificante ma tutto può cambiare da un momento all'altro se i risultati non vengono o non sono promettenti. In queste situazioni la professoressa Onida è stata sempre presente e disponibile a suggerimenti e consigli.

Voglio concludere questa tesi ringraziando la mia tutor, la dottoressa Marta Gallo, per avermi supportato (o forse sopportato?) per tutto questo tempo. Sono stati per me bellissimi mesi e grazie a Marta ho imparato molto. Spero, anche se non ne ho la presunzione, di aver lasciato a tutti voi qualcosina anche di me.

Grazie.

Bibliografia

- [1] Vera Meynen, Pegie Cool e Etienne F Vansant. «Verified syntheses of mesoporous materials». In: *Microporous and mesoporous materials* 125.3 (2009), pp. 170–223.
- [2] Reema Narayan et al. «Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances». In: *Pharmaceutics* 10.3 (2018), p. 118.
- [3] CT Kresge et al. «Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism». In: *nature* 359.6397 (1992), p. 710.
- [4] Zeid Alothman. «A review: fundamental aspects of silicate mesoporous materials». In: *Materials* 5.12 (2012), pp. 2874–2902.
- [5] Werner Stöber, Arthur Fink e Ernst Bohn. «Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range». In: *Journal of colloid and interface science* 26.1 (1968), pp. 62–69.
- [6] Jeffrey Scott Beck et al. «A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates». In: *Journal of the American Chemical Society* 114.27 (1992), pp. 10834–10843.
- [7] Michael Grün, Iris Lauer e Klaus K Unger. «The synthesis of micrometer- and submicrometer-size spheres of ordered mesoporous oxide MCM-41». In: *Advanced Materials* 9.3 (1997), pp. 254–257.
- [8] Qiang Cai et al. «The preparation of highly ordered MCM-41 with extremely low surfactant concentration». In: *Microporous and Mesoporous Materials* 32.1-2 (1999), pp. 1–15.
- [9] Zhifeng Yi et al. «A new insight into growth mechanism and kinetics of mesoporous silica nanoparticles by in situ small angle X-ray scattering». In: *Langmuir* 31.30 (2015), pp. 8478–8487.
- [10] M Jayne Lawrence. «Surfactant systems: their use in drug delivery». In: *Chemical Society Reviews* 23.6 (1994), pp. 417–424.
- [11] María Vallet-Regí, Francisco Balas e Daniel Arcos. «Mesoporous materials for drug delivery». In: *Angewandte Chemie International Edition* 46.40 (2007), pp. 7548–7558.
- [12] Antonio L Doadrio et al. «Drug release from ordered mesoporous silicas». In: *Current pharmaceutical design* 21.42 (2015), pp. 6213–6819.
- [13] Aparna Ganguly, Tokeer Ahmad e Ashok K Ganguli. «Silica mesostructures: Control of pore size and surface area using a surfactant-templated hydrothermal process». In: *Langmuir* 26.18 (2010), pp. 14901–14908.

- [14] Isabel Izquierdo-Barba et al. «Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15». In: *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 50.3 (2009), pp. 421–429.
- [15] Zifan Wang et al. «The role of charge in the surfactant-assisted stabilization of the natural product curcumin». In: *Langmuir* 26.8 (2009), pp. 5520–5526.
- [16] Subash C Gupta et al. «Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities». In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39.3 (2012), pp. 283–299.
- [17] OP Sharma. «Antioxidant activity of curcumin and related compounds.» In: *Biochemical pharmacology* 25.15 (1976), p. 1811.
- [18] Sanjaya Singh e Bharat B Aggarwal. «Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane)». In: *Journal of Biological Chemistry* 270.42 (1995), pp. 24995–25000.
- [19] Kavirayani Priyadarsini. «The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent». In: *Molecules* 19.12 (2014), pp. 20091–20112.
- [20] Makiko Takenaka et al. «Effective extraction of curcuminoids by grinding turmeric (*Curcuma longa*) with medium-chain triacylglycerols». In: *Food Science and Technology Research* 19.4 (2013), pp. 655–659.
- [21] W Baumann, SV Rodrigues e LM Viana. «Pigments and their solubility in and extractability by supercritical CO₂-I: the case of curcumin». In: *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17.3 (2000), pp. 323–328.
- [22] Nilesh Kurmudle et al. «Enzyme-assisted extraction for enhanced yields of turmeric oleoresin and its constituents». In: *Food Bioscience* 3 (2013), pp. 36–41.
- [23] Grzegorz Gryniewicz e Piotr Slifirski. «Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status.» In: *Acta Biochimica Polonica* 59.2 (2012).
- [24] Angelo Siviero et al. «Curcumin, a golden spice with a low bioavailability». In: *Journal of Herbal Medicine* 5.2 (2015), pp. 57–70.
- [25] P Yurkanis Bruice. *Organic Chemistry, 2006*. 2006.
- [26] Florastina Payton, Peter Sandusky e William L Alworth. «NMR study of the solution structure of curcumin». In: *Journal of natural products* 70.2 (2007), pp. 143–146.
- [27] Preetha Anand et al. «Bioavailability of curcumin: problems and promises». In: *Molecular pharmaceutics* 4.6 (2007), pp. 807–818.
- [28] Liang Shen e Hong-Fang Ji. «Theoretical study on physicochemical properties of curcumin». In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 67.3-4 (2007), pp. 619–623.
- [29] Rakesh Sharma e Dipti Jani. «Interaction of cationic CTAB surfactant with curcumin, an anticarcinogenic drug: spectroscopic investigation». In: *Tenside Surfactants Detergents* 50.4 (2013), pp. 283–288.
- [30] Mandy HM Leung, Hannah Colangelo e Tak W Kee. «Encapsulation of curcumin in cationic micelles suppresses alkaline hydrolysis». In: *Langmuir* 24.11 (2008), pp. 5672–5675.

- [31] Lan Li, Fadi S Braiteh e Razelle Kurzrock. «Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis». In: *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 104.6 (2005), pp. 1322–1331.
- [32] Amit Kunwar et al. «Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study». In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1760.10 (2006), pp. 1513–1520.
- [33] Maurice O Iwunze. «Binding and distribution characteristics of curcumin solubilized in CTAB micelle». In: *Journal of molecular liquids* 111.1-3 (2004), pp. 161–165.
- [34] Anne Saupe e Thomas Rades. «Solid lipid nanoparticles». In: *Nanocarrier Technologies*. Springer, 2006, pp. 41–50.
- [35] Waree Tiyaaboonchai, Watcharaphorn Tungpradit e Pinyupa Plianbangchang. «Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles». In: *International Journal of Pharmaceutics* 337.1-2 (2007), pp. 299–306.
- [36] Lin Sun et al. «Enhanced topical penetration, system exposure and anti-psoriasis activity of two particle-sized, curcumin-loaded PLGA nanoparticles in hydrogel». In: *Journal of Controlled Release* 254 (2017), pp. 44–54.
- [37] Rajesh Kotcherlakota et al. «Curcumin loaded mesoporous silica: an effective drug delivery system for cancer treatment». In: *Biomaterials science* 4.3 (2016), pp. 448–459.
- [38] B Onida et al. «Permeability of micelles in surfactant-containing MCM-41 silica as monitored by embedded dye molecules». In: *Chemical Communications* 21 (2001), pp. 2216–2217.
- [39] William D Callister et al. *Fundamentals of materials science and engineering*. Vol. 471660817. Wiley London, 2000.
- [40] Qiang Cai et al. «Dilute solution routes to various controllable morphologies of MCM-41 silica with a basic medium». In: *Chemistry of materials* 13.2 (2001), pp. 258–263.
- [41] Kenneth SW Sing. «Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984)». In: *Pure and applied chemistry* 57.4 (1985), pp. 603–619.
- [42] Horacio E Bergna. *The colloid chemistry of silica*. Rapp. tecn. American Chemical Society, Washington, DC (United States), 1994.
- [43] J Goworek et al. «Thermal degradation of CTAB in as-synthesized MCM-41». In: *Journal of thermal analysis and calorimetry* 96.2 (2009), pp. 375–382.
- [44] Michael L Hair. *Infrared spectroscopy in surface chemistry*. M. Dekker New York, 1967.
- [45] Rommel B Viana, Alberico BF da Silva e André S Pimentel. «Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants». In: *Advances in Physical Chemistry* 2012 (2012).

- [46] Margarita Bernabe Pineda et al. «Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition». In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 60.5 (2004), pp. 1091–1097.
- [47] Takeshi Shimamura et al. «Investigation of the release test method for the topical application of pharmaceutical preparations: Release test of cataplasm including nonsteroidal anti-inflammatory drugs using artificial sweat». In: *Chemical and pharmaceutical bulletin* 52.2 (2004), pp. 167–171.
- [48] Margareth RC Marques, Raimar Loebenberg e May Almukainzi. «Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing». In: *Dissolution Technol* 18.3 (2011), pp. 15–28.
- [49] SMH Rahman et al. «Role of surfactant and pH in dissolution of curcumin». In: *Indian journal of pharmaceutical sciences* 71.2 (2009), p. 139.
- [50] Ying-Jan Wang et al. «Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products». In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 15.12 (1997), pp. 1867–1876.