POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea

in Ingegneria dei Materiali

Silice a mesoporosità ordinata come carrier di curcumina

Relatori

Prof.ssa Barbara Onida

Prof. Luigi Manna

Dott.ssa Marta Gallo

Candidato

Marianna Bitto

Marzo 2020

INDICE

ACRONIMI ..... **III**

1. INTRODUZIONE **1**

2. SISTEMI DI DRUG DELIVERY (DDS) **3**

3. SILICI MESOPOROSE **6**

3.1. SILICI A MESOPOROSITÀ ORDINATA (OMS) 7
3.2. CARATTERISTICHE DELLE SILICI MESOPOROSE 9
3.2.1. Dimensione dei pori *9*
3.2.2. Area superficiale specifica *10*
3.2.3. Volume poroso *11*
3.3. FENOMENO DI AMORFIZZAZIONE NEI MATERIALI MESOPOROSI 12
3.4. BIOCOMPATIBILITÀ DELLE SILICI MESOPOROSE 13
3.5. METODI DI IMPREGNAZIONE DEI FARMACI ALL'INTERNO DELLE SILICI MESOPOROSE 14
3.5.1. Adsorbimento da soluzione *14*
3.5.2. Incipient Wetness Impregnation (IWI) *15*
3.5.3. Evaporatore rotante (rotavapor) *15*
3.5.4. CO_2 Supercritica ($scCO_2$) *16*

4. PRINCIPIO ATTIVO UTILIZZATO **20**

4.1. LA CURCUMINA 20
4.1.1. Chimica della Curcumina *21*
4.1.2. Proprietà della curcumina *23*
4.1.3. Problematiche dell'utilizzo della curcumina *25*

5. IMPREGNAZIONE DI DUE PRINCIPI ATTIVI **28**

5.1. L' IBUPROFENE 28

6. MATERIALI E METODI **31**

6.1. MATERIALI 31
6.2. TECNICHE DI IMPREGNAZIONE 31
6.2.1. Impregnazione mediante Incipient Wetness Impregnation (IWI) *32*
6.2.2. Impregnazione mediante rotavapor *32*
6.2.3. Impregnazione mediante $scCO_2$ *33*
6.3. TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE 33
6.3.1. Diffrattometria a raggi X (XRD) *33*

6.3.2. Analisi di adsorbimento di azoto ... 34
6.3.3. Analisi termogravimetrica (TGA) ... 37
6.3.4. Spettroscopia FT-IR ... 37
6.3.5. Spettroscopia UV/Visibile ... 39

7. CARATTERIZZAZIONE DELLA SILICE SBA-15 IMPREGNATA TRAMITE IWI ... 40

8. CARATTERIZZAZIONE DELLA SILICE SBA-15 IMPREGNATA TRAMITE ROTAVAPOR ... 45

9. CONFRONTO TRA IL CAMPIONE SBA-15_CURC_IWI E IL CAMPIONE SBA-15_CURC_ROTA ... 51

10. SISTEMA A 2 PRINCIPI ATTIVI ... 55

10.1. CARATTERIZZAZIONE DELLA SILICE SBA-15 IMPREGNATA CON IBUPROFENE TRAMITE SCCO_2 ... 55
10.2. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE SBA-15_CURC_IWI IMPREGNATO CON IBUPROFENE TRAMITE SCCO_2 ... 59
10.3. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE SBA-15_CURC_ROTA IMPREGNATO CON IBUPROFENE TRAMITE SCCO_2 ... 64
10.4. CONFRONTO TRA IL CAMPIONE SBA-15_CURC_IWI_IBU E IL CAMPIONE SBA-15_CURC_ROTA_IBU ... 69

11. RILASCIO DELLA CURCUMINA ... 74

12. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI ... 81

13. APPENDICE ... 84

13.1. CARATTERIZZAZIONE DELLA SILICE GRACE IMPREGNATA TRAMITE *INCIPIENT WETNESS IMPREGNATION* ... 85

INDICE TABELLE ... 95

INDICE FIGURE ... 96

BIBLIOGRAFIA ... 100

RINGRAZIAMENTI ... 109

ACRONIMI

Drug delivery system	**DDS**
Silice a mesoporosità ordinata	**OMS**
Concentrazione micellare critica	**CMC**
Fluido fisiologico simulato	**SBF**
Nano particelle di silice	**NPs**
Incipient Wetness Impregnation	**IWI**
Anidride carbonica supercritica	**$scCO_2$**
Tampone fosfato salino	**PBS**
Farmaci antiinfiammatori non steroidei	**FANS**
Diffrattometria a raggi X	**XRD**
Analisi termogravimetrica	**TGA**
Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier	**FTIR**
Spettroscopia Ultravioletto/Visibile	**UV/Vis**
SBA-15 impregnata con curcumina tramite IWI	**SBA-15_Curc_iwi**
SBA-15 impregnata con curcumina tramite rotavapor	**SBA-15_Curc_rota**
SBA-15 trattata con metanolo	**SBA-15_metanolo**
SBA-15 impregnata con ibuprofene tramite $scCO_2$	**SBA-15_ibu**
SBA-15 impregnata con curcumina tramite IWI e con ibuprofene tramite $scCO_2$	**SBA-15_Curc_iwi_IBU**
SBA-15 impregnata con curcumina tramite rota e con ibuprofene tramite $scCO_2$	**SBA-15_Curc_rota_IBU**
Soluzione di acqua ed etanolo	**H_2O/EtOH**

GRACE impregnata con curcumina tramite IWI	**GRACE_Curc**
GRACE trattata a 500°C per un'ora	**GRACE_500x1h**
GRACE impregnata con curcumina tramite IWI dopo il trattamento a 500°C per un'ora	**GRACE_500x1h_Curc**

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, i sistemi di drug delivery (DDS), sono risultati una delle applicazioni più promettenti in ambito biomedico e farmaceutico. Questi sistemi sono in grado di somministrare e veicolare principi attivi all'interno del corpo, ottimizzando la capacità di questi ultimi rispetto alle terapie farmacologiche tradizionali. Esempi di questi dispositivi, possono considerarsi: le microemulsioni, le nanoemulsioni, i liposomi, i dendrimeri, le nanoparticelle polimeriche e alcuni sistemi inorganici.

Le silici mesoporose sono materiali inorganici ampiamente studiati negli ultimi 20 anni, di potenziale utilizzo in DDS. Esse sono caratterizzate da un'elevata area superficiale specifica e da un elevato volume poroso con diametro dei pori compreso tra 2 e 50 nm.

Il presente lavoro di tesi è stato rivolto allo studio di una silice a mesoporosità ordinata, la SBA-15, come carrier di curcumina, in vista di un'applicazione in campo topico.

La curcumina è una molecola pleiotropica, in grado di interagire con un elevato numero di molecole, come enzimi, proteine, DNA, RNA, fattori di crescita, citochine. Inoltre possiede proprietà antiinfiammatorie, antiossidanti, pro-apoptotiche, chemiopreventive, chemioterapeutiche, antiproliferative, antimicrobiche, di *wound healing* (cicatrizzazione della ferita), anti nocicettive e antiparassitarie. L'utilizzo della curcumina come principio attivo, però, risulta fortemente limitato dalla sua scarsa solubilità in acqua. Una possibile soluzione per ovviare a questo problema è incorporare la curcumina in un sistema di drug delivery. In particolare, nel presente lavoro, la curcumina è stata incorporata su silice SBA-15. Per impregnare tale principio attivo sono state utilizzate e comparate due diverse tecniche: l'*Incipient Wetness Impregnation* (IWI) e l'impregnazione mediante rotavapor.

Dopo aver verificato la possibilità di incorporare curcumina all'interno del supporto scelto, lo studio è stato esteso ad un'eventuale doppia impregnazione, utilizzando come secondo principio attivo un farmaco "modello", l'ibuprofene, e impregnandolo tramite l'utilizzo di una tecnica innovativa: l'impregnazione tramite CO_2 supercritica.

Tutti i campioni sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico e fisico. Infine è stato valutato il rilascio di curcumina in una soluzione modello di H_2O/EtOH da tutti i sistemi studiati. In questo modo è stato possibile valutare l'influenza della tecnica di impregnazione e dell'eventuale doppia impregnazione sulle cinetiche di rilascio della curcumina.

Tale lavoro si articola in differenti capitoli. Oltre questa prima parte introduttiva, il capitolo 2 introduce i sistemi di drug delivery e le loro principali proprietà. Il capitolo 3 si sofferma sulla descrizione delle silici mesoporose, in particolare sulle silici a mesoporosità ordinata e sulle loro caratteristiche. Inoltre tale capitolo analizza i principali metodi utilizzati per l'impregnazione di farmaci all'interno delle silici mesoporose, quali: adsorbimento da soluzione, *Incipient Wetness Impregnation*, rotavapor e CO_2 supercritica.

Il capitolo 4 si concentra sulla descrizione del principio attivo utilizzato, ossia la curcumina, sulle sue proprietà e problematiche. Il capitolo 5 introduce lo studio dell'impregnazione di due principi attivi, concentrandosi sulla descrizione del secondo farmaco utilizzato: l'ibuprofene.

Nel capitolo 6, l'attenzione verrà rivolta ai materiali utilizzati, alle modalità operative delle diverse tecniche di impregnazione e agli strumenti di caratterizzazione adoperati. I capitoli 7 e 8 sono incentrati rispettivamente sulla caratterizzazione della silice SBA-15 impregnata tramite IWI e tramite rotavapor. Il capitolo 9 illustra il confronto tra i sistemi ottenuti nei due capitoli precedenti. Il capitolo 10 si sofferma invece sulla caratterizzazione dei sistemi doppiamente impregnati e sul loro confronto.

Il capitolo 11 si concentra sul rilascio di curcumina dai sistemi studiati, nella soluzione di H_2O/EtOH. Infine, il capitolo 12 si sofferma sulle conclusioni tratte da questo lavoro di tesi e su possibili sviluppi futuri.

2. SISTEMI DI DRUG DELIVERY (DDS)

I sistemi di drug delivery sono una delle applicazioni più promettenti in campo biomedico e farmaceutico e rappresentano un'evoluzione per la scienza dei materiali [1].

Possono essere definiti come dei dispositivi in cui è possibile incorporare un farmaco al fine di migliorarne l'efficacia. Questi dispositivi vengono anche indicati con il nome di *drug carrier* (supporti di farmaco).Tale strategia permette, non solo di utilizzare principi attivi comuni, ma anche farmaci "proteici" i quali subiscono denaturazione in ambiente acido e quindi non possono essere assunti tramite ingestione [2].

Per lo studio completo di un drug delivery system ci sono una serie di fattori da considerare come è possibile osservare in figura 2.1.

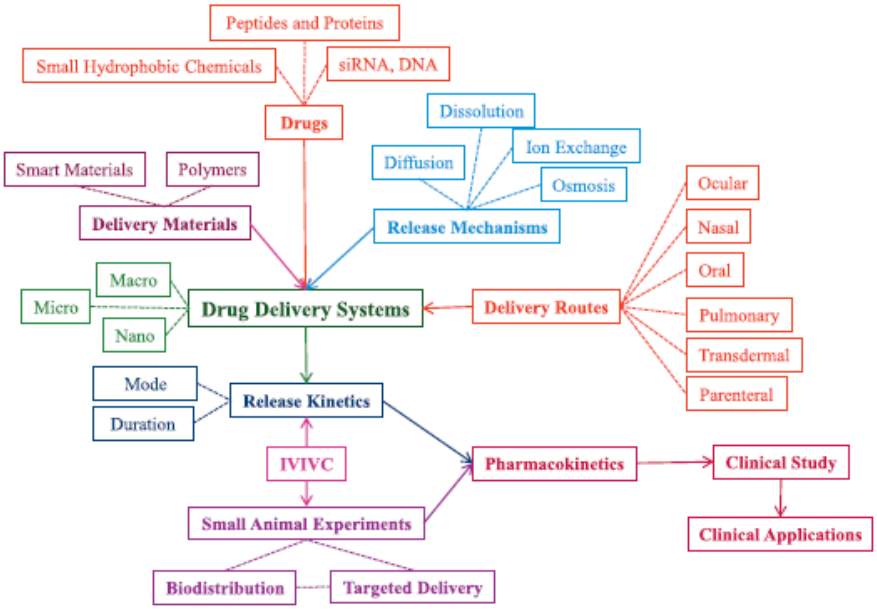

Figura 2.1 *Parametri che influenzano i drug delivery system [3].*

Innanzitutto è fondamentale capire che tipo di principio attivo si vuole incapsulare, sia dal punto di vista farmacologico che chimico-fisico. Inoltre bisogna studiare il tipo di somministrazione del principio attivo, la cinetica, il meccanismo di rilascio all'interno del corpo e ovviamente il tipo di carrier per incorporare e rilasciare al meglio il farmaco.

La difficoltà sta nel fatto che tutti questi fattori sono interconnessi tra di loro ed è quindi importante fare uno studio approfondito al fine di raggiungere lo scopo prefissato [3].

In generale i drug delivery system hanno diversi obiettivi: mantenere il farmaco allo stato amorfo, aumentare la biodisponibilità dei principi attivi, veicolare il farmaco nel sito di interesse e garantire un rilascio controllato e sostenuto del principio attivo. Infatti la concentrazione del principio attivo all'interno dell'organismo deve essere al di sopra della *minimal effective concentration* (MEC, concentrazione minima efficace) e al di sotto della *minimal toxic concentration* (MTC, minima concentrazione tossica) (figura 2.2) [4].

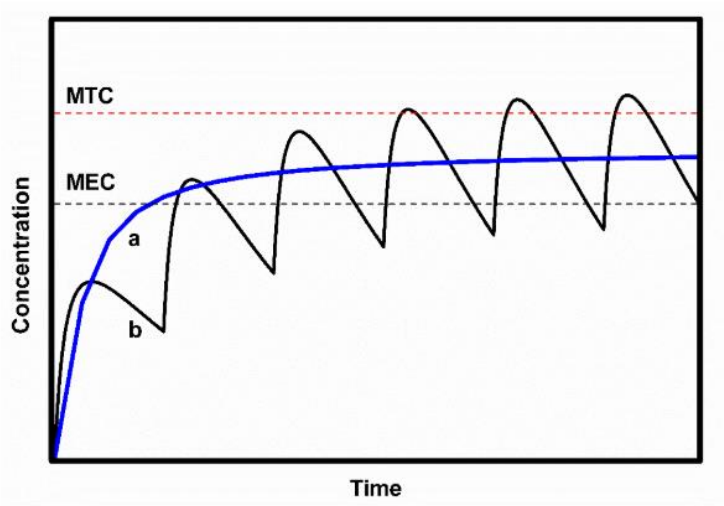

Figura 2.2 *Intervallo di concentrazione ottimale del farmaco [4].*

Tutte queste potenziali caratteristiche risultano di particolare interesse in ambito topico dove questi dispositivi permettendo un rilascio mirato nella zona di interesse consentirebbero di diminuire la quantità di farmaco somministrata. Ciò inoltre permetterebbe una riduzione degli effetti collaterali a livello sistemico. Infine sarebbe possibile diminuire la frequenza di applicazione del farmaco, migliorando in tale modo la qualità di vita del paziente [4].

A prescindere dall'applicazione finale, le tipologie di carrier utilizzate per l'incorporazione dei principi attivi sono varie [5]:

- Microemulsioni,

- Nanoemulsioni,
- Liposomi,
- Dendrimeri,
- Nanoparticelle lipidiche,
- Nanoparticelle polimeriche,
- Nanoparticelle inorganiche.

Nel presente lavoro di tesi ci soffermeremo su carrier inorganici e, in particolare, sulle silici mesoporose.

3. SILICI MESOPOROSE

Le silici mesoporose possono considerarsi tra i potenziali esempi di drug delivery system (DDS) studiati negli ultimi 20 anni [6] [7] [8] [9]. Grazie alle loro caratteristiche, questi tipi di carrier sono potenzialmente in grado di incapsulare una quantità considerevole di farmaco mantenendolo in forma amorfa. Inoltre potrebbero essere utilizzati come sistemi di rilascio sistemico, in grado di rilasciare il principio attivo ad una velocità controllata ed evitando il degrado prematuro del farmaco stesso e del carrier. Sarebbe possibile inoltre avere un rilascio del principio attivo in risposta ad uno stimolo esterno, come l'applicazione di un campo magnetico, o tramite un cambiamento nelle condizioni interne, come il pH [10].

Negli ultimi anni le silici mesoporose sono state studiate per la somministrazione di un'ampia gamma di composti chimici, semplici molecole come l'ibuprofene ed altri farmaci anti infiammatori, principi attivi più complessi come quelli per il cancro, ma anche macromolecole come il DNA e varie proteine [11].

Grazie a numerosi studi è stato provato che le silici mesoporose sono potenzialmente più vantaggiose rispetto ai tradizionali nano-carriers, soprattutto nella terapia del cancro [12]. Infatti uno dei maggiori problemi delle nano formulazioni tradizionali è la difficoltà di sviluppare un carrier che sia in grado di incapsulare sufficiente principio attivo e di rilasciarlo con una cinetica adeguata. Inoltre è difficoltoso trasportare efficacemente le nanoparticelle nella zona in cui è previsto il rilascio del farmaco, a causa delle numerose barriere fisiologiche. Un altro grande problema rimane la possibile tossicità di queste nano formulazioni e il loro costo elevato.

A causa di tutte queste limitazioni, numerosi scienziati si sono dedicati alla ricerca di nuovi carrier, in particolare micro e nano materiali inorganici per ottimizzare le performance dei sistemi di drug delivery. Tra i materiali inorganici proposti, appaiono di maggior interesse le silici mesoporose.

Le silici mesoporose sono dei materiali inorganici caratterizzati da un'elevata area superficiale specifica e da un elevato volume poroso con diametro dei pori compreso tra 2 e 50 nm. Inoltre la loro formulazione è semplice rispetto a quella dei precedenti sistemi studiati, economica e controllabile [12].

3.1.Silici a mesoporosità ordinata (OMS)

Yanagisawa et al. nei primi anni 90 hanno proposto la sintesi di alcuni materiali mesoporosi che avevano caratteristiche simili a quelle che oggi sono chiamate MCM-41 [13].

Nel 1992, dei ricercatori alla Mobil Corporation hanno sintetizzato la prima silice mesoporosa ordinata da gel di alluminosilicati utilizzando un meccanismo "*templante*" [14]. Infatti la sintesi di questa famiglia di materiali mesoporosi è basata sulla combinazione di due strategie di sintesi, quella sol-gel e quella degli agenti *templanti* [13].I ricercatori della Mobil Corporation hanno chiamato tale silice mesoporosa MCM-41 (Mobil Composition of Matter) [14]. Tale silice è composta da canali di dimensioni uniformi altamente regolari il cui diametro varia da 15 a 100 Å in funzione del tensioattivo utilizzato, dell'aggiunta di composti organici ausiliari e dei parametri di reazione [13].

La MCM-41 è la tipologia di silice mesoporosa più studiata in applicazioni biomediche ed è composta da pori cilindrici disposti secondo una simmetria esagonale. Durante la sintesi, quando la concentrazione del surfattante supera la concentrazione critica micellare (CMC) si formano delle micelle. Il precursore della silice si condensa sulla superficie del surfattante formando delle pareti di silice attorno alle micelle. Una volta rimosso il surfattante si ha la formazione della silice MCM-41 [12]. (Figura 3.1).

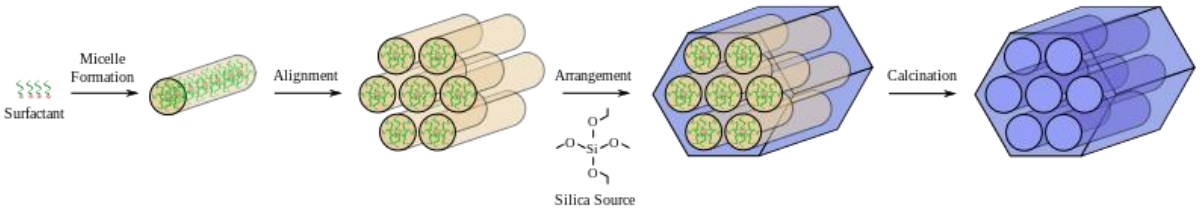

Figura 3.1 *Sintesi della silice mesoporosa MCM-41 [15].*

Oltre alla silice MCM-41 sono state sintetizzate diverse silici mesoporose nel corso degli anni, come la MCM-48 la quale, invece, ha una struttura tridimensionale, cubica. Rispetto alla MCM-41, caratterizzata da canali unidirezionali, la MCM-48 ha pori interconnessi tridimensionalmente, i quali sono particolarmente utili per un veloce trasporto molecolare ed una facile accessibilità.

Nei primi anni di scoperta di tale silice, la sintesi era molto complicata, in quanto implicava l'utilizzo di tensioattivi cationici e anionici con elevati tempi e temperature di reazione. Solo recentemente, utilizzando la reazione di Stöber, si è riusciti a semplificare la sintesi di tale silice [12].

Un altro tipo di silice mesoporosa ordianata molto studiata per applicazioni biomediche e, oggetto di questo lavoro di tesi, è la silice SBA-15. Tale silice è stata sintetizzata dai ricercatori dell'università della California, Santa Barbara, nel 1998; l'acronimo SBA infatti deriva proprio da "*Santa Barbara Amorphous*". Si tratta di una silice mesoporosa caratterizzata da una struttura dei pori ordinata esagonale, ma differentemente dalla MCM-41 essa è costituita da pori più larghi (4.6-30 nm) e pareti dei pori più spesse [13] [14].

Molti scienziati hanno lavorato con la SBA-15; Doadrio et al., ad esempio, hanno lavorato con tale silice incorporandovi gentamicina [16], Vallet-Regì et al. hanno testato invece l'amoxicillina in una SBA-15[17].

Altre famiglie di silici mesoporose sono MSU (Michigan State University) e KIT (Korea Advanced Institute Of Science And Technology) [4], rappresentate anche in figura 3.2.

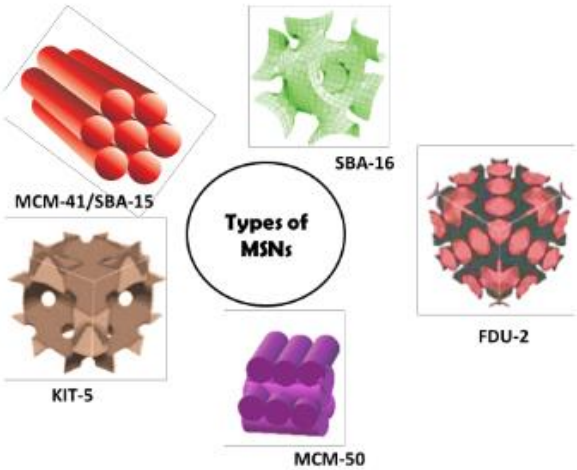

Figura 3.2 *Rappresentazione di diversi tipi di silici mesoporose [14].*

3.2. Caratteristiche delle silici mesoporose

Le silici mesoporose sono caratterizzate da:

- Porosità di dimensioni omogenee le quali consentono un controllo sul *loading* e sulla cinetica di rilascio del farmaco.
- Un elevato volume poroso che permette di incapsulare una buona quantità di principio attivo.
- Un'elevata area superficiale specifica, la quale favorisce l'adsorbimento del farmaco.
- Una superficie caratterizzata da silanoli e quindi facilmente funzionalizzabile per migliorare l'incorporazione del farmaco [1].

Tali caratteristiche verranno analizzate più in dettaglio nei seguenti paragrafi.

3.2.1. Dimensione dei pori

La dimensione dei pori è considerata una delle proprietà più importanti dei materiali mesoporosi [12].

Essa determina la dimensione delle molecole che possono essere adsorbite nei mesopori. Generalmente se il diametro dei pori è leggermente più grande delle dimensioni della molecola di farmaco, quindi se il rapporto dimensionale poro/molecola è maggiore di 1, la molecola viene adsorbita all'interno dei mesopori.

Inoltre un'importante caratteristica dei materiali mesoporosi è che il diametro dei mesopori può essere variato da 1.5 nm a decine di nm o cambiando la lunghezza delle catene del tensioattivo o solubilizzando sostanze ausiliarie nelle micelle. In tale modo quindi possono essere adsorbite non solo molecole semplici, ma anche macromolecole.

Inoltre la taglia dei pori non influisce soltanto nell'operazione di impregnazione del principio attivo, ma anche nella velocità di rilascio del farmaco. Un esempio è dato da uno studio di Vallet-Regì et al. in cui dell'ibuprofene è stato incorporato in MCM-41 con un diametro dei pori variabile da 2.5 nm a 3.6 nm. Il rilascio di tale farmaco in SBF ha confermato come la velocità di rilascio sia maggiore dalle silici con una dimensione dei pori più elevata (figura 3.3).

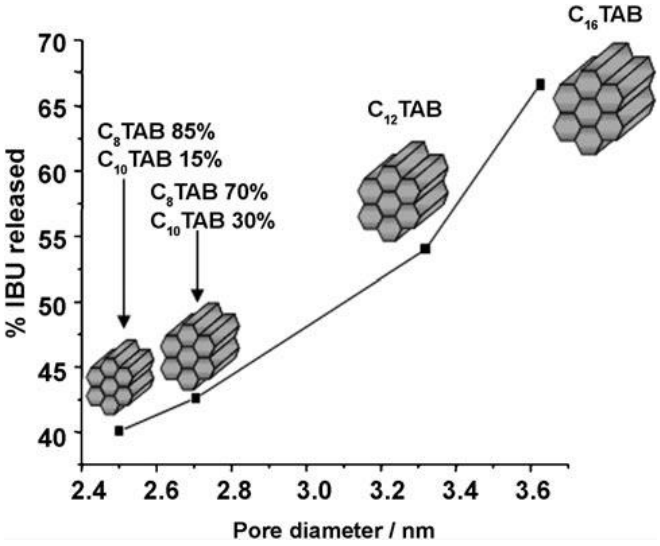

Figura 3.3 *Rilascio di ibuprofene da MCM-41 [1].*

Questo concetto comunque, non è solo applicabile alle strutture 2D esagonali come la MCM-41, ma anche alle strutture cubiche 3D come la MCM-48 [1].

3.2.2. Area superficiale specifica

Il processo di drug-loading è essenzialmente basato sulle proprietà di adsorbimento del materiale mesoporoso. La superficie, quindi, ha un ruolo fondamentale nella quantità di principio attivo adsorbito all'interno della silice [1]. La superficie delle silici è stata perciò oggetto di numerosi studi. Nel 1934 Hofman ha ipotizzato l'esistenza di gruppi di silanoli (Si-OH) sulla superficie della silice. Da quel momento in poi, numerosi scienziati hanno lavorato su tale argomento e confermato tramite tecniche analitiche l'esistenza di questi gruppi.

In particolare, si possono distinguere (Figura 3.4) [18]:

- Silanoli singoli o silanoli isolati.
- Silanoli geminali.
- Silanoli vicinali.
- Silanoli interni.

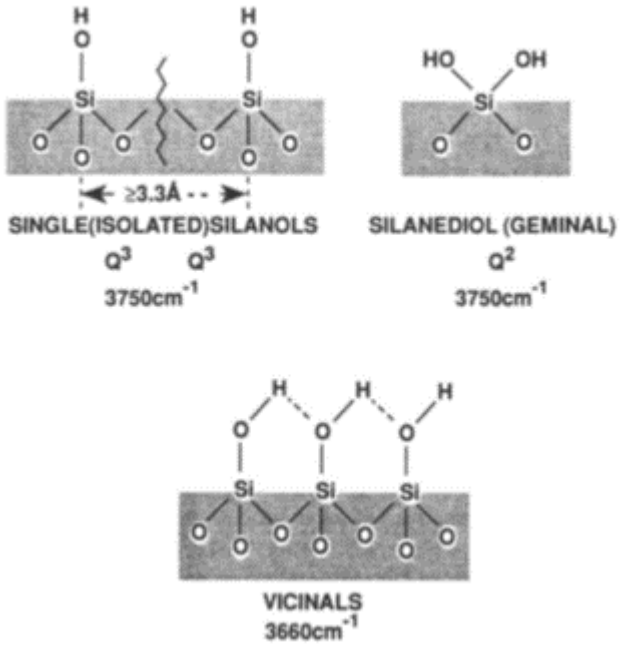

Figura 3.4 *Silanoli [18].*

I silanoli isolati sono liberi di formare legami a idrogeno con gli adsorbati, nel nostro caso le molecole di principio attivo, e possono essere sia accettori che donatori di legame a idrogeno.

Aumentando la temperatura si ha la scomparsa dei vari gruppi di silanoli, quindi trattando la silice ad elevate temperature se ne aumenta il carattere idrofobico a discapito di quello idrofilico. Infatti nelle silici che sono state trattate ad elevate temperature, il processo di adsorbimento è dominato da interazioni idrofobiche di Van der Waals, principalmente forze dispersive.

Inoltre un aspetto molto interessante della superficie delle silici è che a contatto con soluzioni acquose di differente forza ionica e pH, i silanoli possono deprotonarsi, inducendo la formazione di una carica superficiale negativa (SiO^-) responsabile dell'adsorbimento di ioni e molecole polari dalla soluzione [10].

3.2.3. Volume poroso

Come già affermato in precedenza, l'area superficiale specifica e la dimensione dei pori sono due dei principali parametri che influiscono nel *loading* e nel rilascio di un farmaco in un

sistema di drug delivery. L'interazione molecola di farmaco/silice infatti è un fenomeno di superficie, ma se durante il *loading* si creano interazioni tra le molecole di farmaco, il volume poroso può diventare un fattore chiave per la quantità di principio attivo caricata [1].

3.3. Fenomeno di amorfizzazione nei materiali mesoporosi

Un numero elevato di molecole farmaceutiche risulta essere scarsamente solubile in soluzioni acquose, impendendo il corretto rilascio del farmaco all'interno dell'organismo [19].

Un esempio è il rilascio orale di farmaci contro il cancro: la somministrazione di tali farmaci risulta molto complicata a causa sia delle proprietà fisico-chimiche del farmaco stesso, sia di barriere fisiologiche all'interno dell'organismo [20].

Sono state perciò esplorate numerose strategie al fine di migliorare la solubilità e la permeabilità delle molecole farmaceutiche [19]. Tra le tante strategie proposte, si è pensato di sfruttare la forma amorfa del farmaco invece della forma stabile cristallina [21]. Lo stato amorfo ha un'energia libera maggiore rispetto allo stato cristallino e quindi può essere notevolmente vantaggioso in termini di solubilità e biodisponibilità [22]. Sfortunatamente molte molecole farmaceutiche mostrano una forte tendenza alla ricristallizzazione [21], poiché lo stato amorfo è termodinamicamente instabile o metastabile [11], di conseguenza è difficoltoso avere un rilascio controllato della molecola di farmaco nel suo stato amorfo [21].

Tale limite può essere superato confinando il farmaco in un materiale nano poroso, come le silici mesoporose. Infatti, la cristallizzazione del farmaco è sfavorita al di sotto di una dimensione critica dei pori (d*) definita secondo la reazione:

$$d^* = \frac{4\sigma_{cl} T_m^{\infty}}{[(T_m^{\infty} - T)\Delta H_m \rho_c]}$$

Dove, σ_{cl} è l'energia di superficie tra il solido cristallino e il materiale fuso, ΔH_m è il calore associato al processo di fusione, T_m^{∞} è la temperatura di fusione e ρ_c è la densità del cristallo [11].

Come regola generale il diametro dei pori non deve superare la dimensione della molecola di farmaco di un fattore 10-20 per evitare il minimo rischio di cristallizzazione. Generalmente le molecole di farmaco utilizzate nei sistemi di drug delivery hanno un diametro tra 0.3 e 1 nm,

perciò i materiali mesoporosi, avendo pori con un diametro compreso tra 2 e 50 nm, sono dei candidati ideali per essere utilizzati come carriers di farmaci [19].

3.4. Biocompatibilità delle silici mesoporose

La biocompatibilità e la bioattività sono dei requisiti importanti per le applicazioni biomedicali delle silici mesoporose.

Per quanto riguarda la biocompatibilità, la dimensione delle particelle sembra ricoprire un ruolo fondamentale. Onida et al. hanno studiato l'effetto di nanoparticelle di silice (NPs) sulle cellule neuronali GT1-7. In particolare sono state studiate due diverse tipologie di NPs aventi diametro pari a 50 nm e 200 nm. In questo lavoro, tramite test citotossici e tramite l'analisi della concentrazione di calcio intracellulare, è stato dimostrato come la taglia delle particelle possa influenzare le cellule neuronali. In particolare è stato evidenziato come le NPs aventi diametro pari a 50 nm mostrino effetti di tossicità sulla cellule neuronali a differenza delle NPs con un diametro pari a 200 nm [23].

Giri et al. hanno studiato invece la biocompatibilità di "magnet/MSN stimuli-responsive" (silici mesoporose in cui il rilascio del principio attivo è governato da un campo magnetico) con le cellule tumorali HeLa [24]. Le cellule in contatto con le particelle di silice (di dimensioni 200 nm x 80 nm e con pori di circa 3 nm di diametro) hanno continuato a crescere senza danni ai nuclei, dimostrando la biocompatibilità dei carrier analizzati [24].

Inoltre alcuni gruppi si sono concentrati sullo studio della bioattività delle silici mesoporose. Gomez-Vega et al. sono stati i primi a studiare la bioattività di film di silice mesoporosa sulla lega Ti6Al4V [25][26]. I test, effettuati in SBF (fluido fisiologico simulato), hanno mostrato che dopo sette giorni i film avevano indotto la formazione di apatite [25][26].

Sono stati effettuati studi anche su varie silici mesoporose, come SBA-15, MCM-41 ed MCM-48. Il gruppo di Izquierdo-Barba, dopo aver effettuato vari test *in vitro* e diverse caratterizzazioni (FTIR, SEM-EDS, TEM-ED-EDX), ha dimostrato la presenza di idrossiapatite sulla superficie delle silici SBA-15 e MCM-48. La cinetica di formazione dello strato di idrossiapatite si è dimostrata diversa nei due casi; nel caso di SBA-15, il layer di apatite si è formato dopo 30 giorni, nel caso invece di MCM-48, dopo 60 giorni. Per quanto riguarda

invece la silice MCM-41, anche dopo 60 giorni di immersione, non si è trovata alcuna traccia di apatite sulla sua superficie [27].

Il gruppo di Vallet-Regi ha invece studiato la bioattività della silice MCM-41 dopata con fosforo, ottenendo, tramite test *in vitro*, una risposta bioattiva dopo soli 13 giorni di immersione [6].

3.5. Metodi di impregnazione dei farmaci all'interno delle silici mesoporose

I metodi di incorporazione di un principio attivo all'interno di silici mesoporose sono numerosi.

I più studiati sono l'adsorbimento da soluzione, l'*Incipient Wetness Impregnation* (IWI) e il rotavapor. Tra le tecniche più innovative si può menzionare invece l'utilizzo di fluidi supercritici come la CO_2 supercritica.

In tale lavoro di tesi sono stati utilizzati l'*Incipient Wetness Impregnation*, il rotavapor e la CO_2 supercritica.

3.5.1. Adsorbimento da soluzione

L'adsorbimento da soluzione è il metodo di impregnazione più utilizzato nel drug loading. Con tale tecnica, il farmaco viene dissolto in un solvente adatto e il materiale poroso viene immerso nella soluzione. In tale modo le molecole di farmaco vengono adsorbite sulle pareti dei pori del carrier.

Questo tipo di impregnazione può richiedere da una a più ore e una volta concluso, il carrier viene separato dalla soluzione tramite filtrazione o centrifugazione.

Dopo di ciò la polvere può essere ulteriormente essiccata rimuovendo l'eccesso di solvente.

L'adsorbimento da soluzione è un metodo molto semplice e permette di avere dei risultati riproducibili; inoltre non è richiesto l'uso di temperature elevate durante il processo e questo lo rende adatto alle molecole più sensibili termicamente.

Uno degli svantaggi di tale metodo, però, è che per avere una buona percentuale di farmaco all'interno del carrier mesoporoso, si deve utilizzare un'elevata quantità di soluzione. Inoltre, risulta complicato quantificare con precisione la percentuale di farmaco effettivamente caricata sul supporto. Inoltre, si ha uno spreco di una grande quantità di principio attivo durante la fase di filtrazione/centrifugazione [4].

3.5.2. *Incipient Wetness Impregnation* (IWI)

Tale metodo consiste nel mettere a contatto la silice mesoporosa con un volume di soluzione uguale al volume poroso della silice. È quindi la capillarità che attira nei pori la soluzione contenente il farmaco. Uno dei vantaggi più importanti di tale tecnica è il fatto di permettere un maggior controllo della quantità di farmaco incorporata all'interno del carrier [4].

Inoltre con tale metodo si evita il passaggio di filtrazione tipico invece dell'adsorbimento da soluzione [28].

In letteratura sono presenti numerosi articoli nei quali si utilizza l'*Incipient Wetness Impregnation*. Ad esempio, il gruppo di Lopez, il quale ha utilizzato l'IWI per incapsulare cortisolo all'interno di quattro diverse tipologie di SBA [29], quello di Azais, che ha incorporato ibuprofene in SBA-15 e MCM-41 [30], ma anche quello di Mallaerts [28], il quale ha utilizzato questo metodo per incorporare itroconazolo all'interno di una SBA-15 [5] [31].

3.5.3. Evaporatore rotante (rotavapor)

L'evaporatore rotante o rotavapor è uno strumento utilizzato per la rimozione di un solvente da un campione. Nel caso specifico di questa tesi il campione è costituito dalla silice mesoporosa e dal farmaco. Lo strumento è costituito da un pallone rotante in cui viene inserita la soluzione di solvente e campione, esso è inserito all'interno di un bagno di acqua calda e viene fatto ruotare (schema in figura 3.5). Una pompa a vuoto, riducendo la pressione nell'apparecchio, causa una diminuzione della temperatura di ebollizione del solvente. Con tale metodo perciò, la velocità di evaporazione del solvente è molto più elevata.

Il solvente evaporato viene fatto condensare in un secondo pallone e una volta conclusa l'evaporazione, il farmaco sarà stato incorporato nel carrier e la polvere potrà essere recuperata.

Temperature del bagno d'acqua tra i 25 e i 50°C sono sufficienti per i solventi utilizzati più comunemente [32] [33] [34].

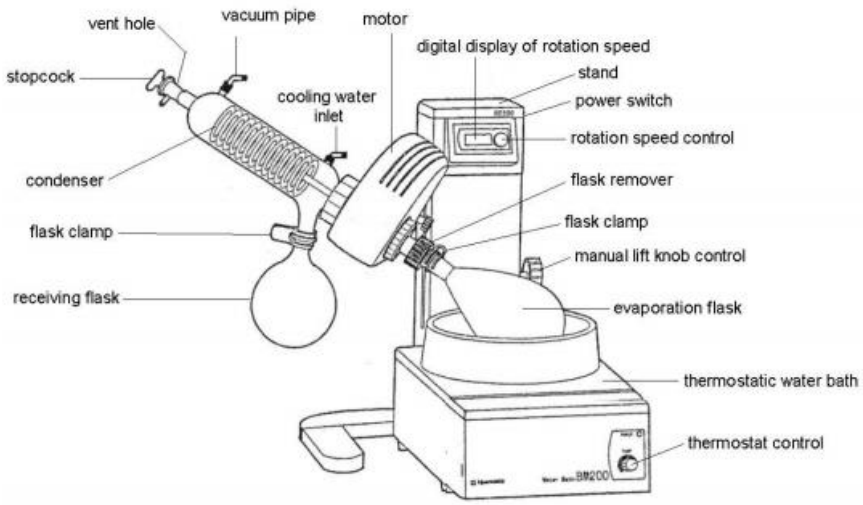

Figura 3.5 *Schema di un rotavapor [32].*

In letteratura sono presenti diversi lavori nei quali si utilizza il rotavapor per incorporare un principio attivo. Ad esempio il gruppo di Jambhrunkar, il quale ha incorporato curcumina all'interno della silice MCM-41 tal quale e in MCM-41 funzionalizzate [35]; il gruppo di AbouAitah, il quale ha incorporato curcumina nelle silici MCM-41 e KCC-1 entrambe funzionalizzate [36]; e il gruppo di Popat, il quale ha incorporato griseofulvina all'interno di MCM-41 tal quale e funzionalizzata [37].

3.5.4. CO_2 Supercritica ($scCO_2$)

Un fluido supercritico può essere definito come una sostanza che si trova ad una temperatura ed una pressione maggiore del suo valore critico e che ha una densità uguale o più elevata della sua densità critica. Alla temperatura ed alla pressione critica, la densità della fase liquida e della fase gassosa diventano uguali e perciò si ottiene il fluido supercritico.

Questi fluidi quindi godono sia delle proprietà del liquido, sia delle proprietà del gas. La loro natura liquida, gli permette di agire come un solvente, mentre la loro natura gassosa, gli permette di diffondere facilmente e velocemente all'interno di un materiale [4].

Il biossido di carbonio è il fluido supercritico maggiormente utilizzato poiché raggiunge il suo valore critico ad una temperatura ed una pressione accessibili. La temperatura è pari a 31.4 °C, mentre la pressione è pari a 74 bar. In figura 3.6 è riportato il diagramma di fase della CO_2.

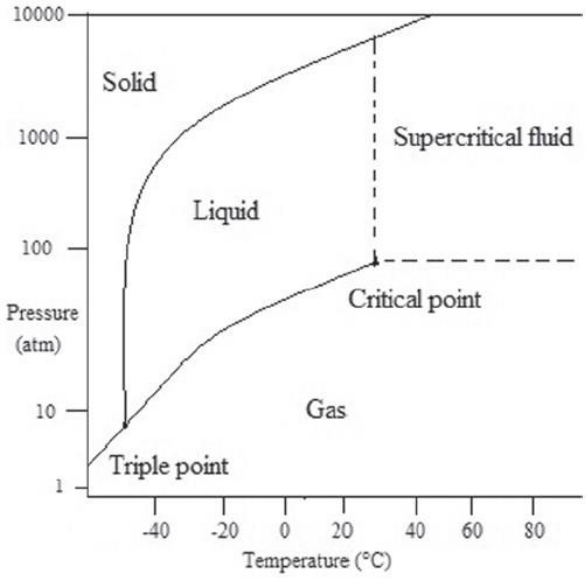

Figura 3.6 *Diagramma di fase del biossido di carbonio [38].*

Inoltre la $scCO_2$ è un fluido inodore, incolore, economico, non tossico, non infiammabile, sicuro, altamente puro e riciclabile [39].

La CO_2 supercritica, può essere utilizzata in numerose applicazioni:

- Estrazione di componenti da prodotti alimentari [4].
- Cromatografia [4].
- Applicazioni biologiche [4].
- Modificazioni superficiali [39].
- Formazione di nano cristalli [39].
- Preparazione e formazione di schiume e di aerogels [4].

- Impregnazione di farmaci all'interno di un carrier [4].

Per quanto riguarda il drug loading, negli ultimi anni vi è stato un interesse sempre più crescente nell'utilizzo della $scCO_2$, grazie alle sue proprietà, al fatto che non rilascia residui al termine dell'impregnazione e che rappresenta un'alternativa ecosostenibile ai classici solventi utilizzati [38]. Inoltre con tale metodo è possibile impregnare diversi farmaci idrofobici che con i classici metodi di impregnazione a base acquosa non sarebbe possibile incapsulare [4].

Il processo è costituito da tre fasi:

1. Dissoluzione del principio attivo in CO_2 supercritica.
2. Impregnazione del farmaco nel carrier.
3. Depressurizzazione del sistema [38].

L'apparato in cui avviene l'impregnazione è mostrato in figura 3.7.

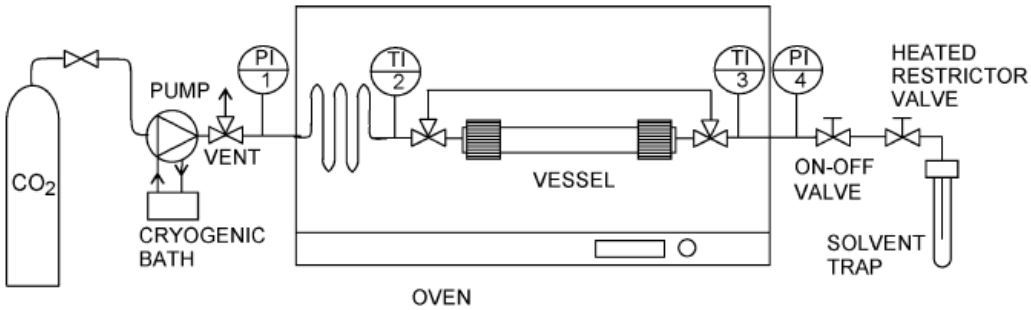

Figura 3.7 *Apparato del sistema di CO_2 supercritica [40].*

È un impianto continuo che opera in modo statico. Esso è costituito da un vessel, ossia un reattore in acciaio inossidabile, dentro il quale vengono inseriti dei cilindri in cui vengono posizionati il carrier e il farmaco prescelti. Il vessel viene posto all'interno di un forno in cui la temperatura viene mantenuta costante.

Per prima cosa viene purificato il reattore in acciaio inox con CO_2 gassosa, al fine di eliminare l'aria residua; dopo di ciò, l'impianto viene fatto lavorare in continuo fino al raggiungimento delle condizioni di lavoro selezionate.

Il vessel viene quindi riempito con CO_2 supercritica e la valvola on-off viene chiusa. Alla fine del processo di impregnazione, l'apparato viene scaricato tramite una valvola di regolazione riscaldata dotata di una trappola per il solvente [40] [41] [5].

In letteratura sono presenti numerosi lavori in cui si utilizza la CO_2 supercritica come metodo di impregnazione. Ad esempio il gruppo di Onida ha incorporato ibuprofene, clorotrimazolo e idrocortisone, tramite $scCO_2$, in ossido di zinco mesoporoso [41]; il gruppo di Ahern ha incapsulato fenofibrato nella silice SBA-15 [42]; il gruppo di Patil ha incorporato carbamazepina in una silice MCM-41 [43]; e il gruppo di Ni, ha incorporato ibuprofene nella silice SBA-15 [44].

4. PRINCIPIO ATTIVO UTILIZZATO

Nel presente lavoro di tesi sono state studiate varie tecniche di impregnazione su un supporto di OMS al fine di incapsulare il principio attivo curcumina. Il campo di applicazione previsto è principalmente quello topico.

I capitoli che seguono sono dedicati alla descrizione del principio attivo.

4.1. La Curcumina

Negli ultimi anni, i ricercatori si sono concentrati sempre di più sullo studio di principi attivi derivanti da prodotti naturali al fine di approfondire le loro proprietà a livello terapeutico.

Tra i vari prodotti è stata molto presa in considerazione la curcuma e quindi il suo componente principale ossia la curcumina [45].

La scoperta della curcumina risale a circa due secoli fa grazie agli studiosi Vogel e Pelletier, i quali riuscirono ad isolare ciò che rendeva di colore giallo la curcuma e la chiamarono curcumina. Solo nel 1910 i ricercatori Milobedzka e Lampa identificarono la struttura chimica della curcumina come diferuloilmetano [46] [47]. Lo stesso gruppo riuscì a sintetizzare il composto nel 1913 [46]. Nel 1953 invece, il gruppo di Srinvasan riuscì a separare e a quantificare i componenti della curcumina [48].

Dagli anni 70' in poi molti ricercatori si concentrarono sullo studio delle caratteristiche e delle proprietà della curcumina; l'interesse infatti per questa molecola crebbe drasticamente nel corso degli anni, come è possibile notare dalla figura 4.1 [46].

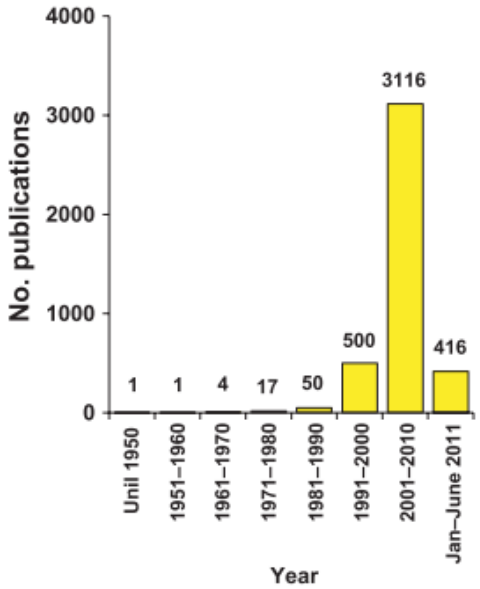

Figura 4.1 *Numero di pubblicazioni sulla Curcumina [46].*

4.1.1. Chimica della Curcumina

La curcumina è una molecola simmetrica nota anche con il nome di diferuloilmetano. Il nome definito dalla IUPAC è invece: (1E, 6E) – 1,7 – bi (4 – idrossi – 3 metossifenil) – 1,6 – eptadiene – 3,5 – dione. La sua formula chimica è $C_{21}H_{20}O_6$ ed ha un peso molecolare di 368.38 g/mol.

La molecola della curcumina è costituita da due gruppi arile aventi un gruppo metossi in posizione para ed un ossidrile in posizione orto, connessi tra loro grazie ad un ponte α,β – insaturo di 7 atomi di carbonio, e da un gruppo α-β- dichetone.

Il gruppo ossidrile legato all'anello benzenico costituisce un fenolo, la curcumina rientra quindi nella categoria dei polifenoli.

Il gruppo dichetone invece esibisce una tautomeria cheto-enolica, come è possibile notare dalla figura 4.2 [47] [49].

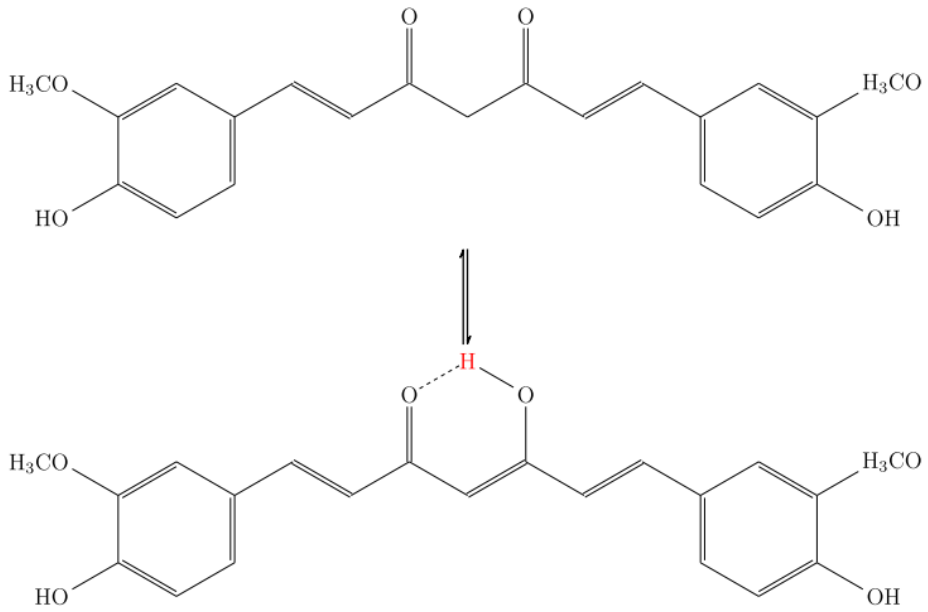

Figura 4.2 *Tautomeria cheto-enolica [47].*

In generale la forma enolica è più stabile di quella chetonica nella maggior parte dei solventi non polari e debolmente polari.

La curcumina è quasi insolubile in acqua, mentre è facilmente solubile in solventi polari come etanolo, metanolo e acetonitrile [47] [49].

La curcumina può essere definita come un debole acido di Brönsted, capace di deprotonarsi tre volte all'aumentare del pH della soluzione [50]. I tre protoni dissociabili sono uno appartenente al gruppo enolico e due appartenenti al gruppo fenolico. Diversi studi hanno dimostrato come il protone appartenente al gruppo enolico sia il più acido tra i tre protoni dissociabili [51].

Lo spettro di assorbimento della curcumina è costituito da due bande molto elevate; una nella regione del visibile con un massimo tra 410 e 430 nm e una nella regione degli UV con un massimo a 265 nm [49]. Con la deprotonazione del gruppo fenolico, si ha un effetto batocromo e quindi uno shift nello spettro di assorbimento verso lunghezze d'onda più elevate (≈ 467 nm), cambiando il colore della molecola da giallo a rosso scuro [47] [51].

Grazie quindi a studi spettroscopici, è possibile capire se la curcumina si trova in una forma protonata o deprotonata e se si sia degradata o meno [47].

Tale molecola infatti soffre di degradazione in soluzioni alcaline formando vanillina, acetone, acido ferulico e feruloilmetano, i quali presentano un assorbimento trascurabile nella regione UV-Vis (figura 4.3) [52].

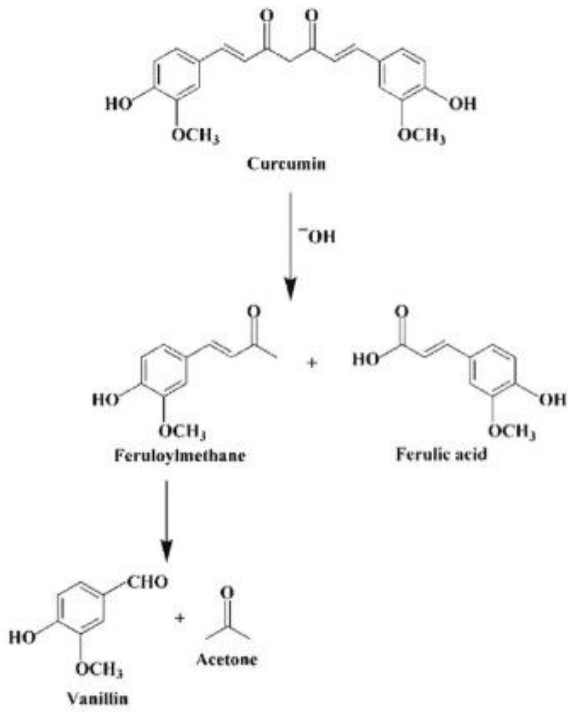

Figura 4.3 *Prodotti di degradazione della curcumina [52].*

In soluzioni basiche quindi la curcumina è caratterizzata da una colorazione rossastra e da due picchi principali nello spettro di adsorbimento a 261 nm e a 463 nm, i quali tendono a diminuire di intensità nel corso del tempo, indicando proprio la degradazione della molecola [52].

4.1.2. Proprietà della curcumina

Numerosi studi hanno dimostrato come la curcumina sia una molecola altamente pleiotropica, in grado di interagire con un elevato numero di molecole, come enzimi, proteine, DNA, RNA, fattori di crescita, citochine. È proprio grazie ai suoi gruppi funzionali che riesce ad interagire con così tante molecole [45].

La curcumina inoltre possiede proprietà antiinfiammatorie, antiossidanti, pro-apoptotiche, chemiopreventive, chemioterapeutiche, antiproliferative, antimicrobiche, di *wound healing* (cicatrizzazione della ferita), anti nocicettive e antiparassitarie [46]. Alcune di queste verranno descritte in modo più approfondito nei capitoli successivi.

4.1.2.1. Proprietà antiinfiammatorie

Numerose ricerche hanno dimostrato tramite test *in vitro* le proprietà antiinfiammatorie della curcumina. Tale principio attivo è in grado infatti di regolare la produzione di molecole antiinfiammatorie [46].

Il gruppo di Srimal ha descritto nei propri lavori, come la curcumina sia efficacie sia nella fase acuta, che nella fase cronica dell'infiammazione e come la sua attività possa essere paragonata a quella del fenilbutazone, un farmaco usato comunemente come antiinfiammatorio [53].

4.1.2.2. Proprietà antiossidanti

Lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi di diverse patologie, come nell'ischemia cerebrale e del miocardio, nel cancro, nell'ipossia, in shock e nelle emorragie.

La curcumina è in grado di esercitare una forte attività antiossidante, comparabile a quella della vitamina C ed E [54].

L'attività antiossidante della curcumina può derivare sia dal gruppo idrossile, che dal gruppo metile [46]. In uno studio è stato dimostrato tramite test *in vitro* come la curcumina inibisca la produzione di anioni superossidi, radicali idrossili e radicali di diossido di azoto [54].

4.1.2.3. Proprietà antitumorali.

In varie ricerche è stato osservato come la curcumina sia citotossica per una grande quantità di cellule tumorali. L'azione della curcumina dipende dal tipo di cellula, dalla concentrazione e dalla lunghezza del trattamento. Il meccanismo principale tramite il quale la curcumina risulta citotossica è l'induzione di apoptosi. Inoltre tale principio attivo ha il potenziale di inibire lo sviluppo e la progressione del cancro, colpendo vari step del processo di oncogenesi. Quindi

agisce come agente bloccante sia durante gli step iniziali del cancro, sia durante la progressione, inibendo la proliferazione di cellule maligne [46].

4.1.2.4. Proprietà di wound healing

La cicatrizzazione di una ferita e quindi la sua guarigione, è un processo molto complesso che coinvolge vari tipi di cellule, diverse citochine, fattori di crescita e le proteine della matrice extracellulare. Diversi studi sulla curcumina hanno dimostrato come questa possa agire sulla riparazione di una ferita rafforzando la fibronectina e la formazione di collagene.

Inoltre grazie agli studi del gruppo di Sidhu [55] è stato possibile dimostrare come il trattamento con curcumina porti ad un incremento nella formazione del tessuto granulare, di una neo-vascolarizzazione, di una più veloce riepitelizzazione della ferita in casi di lesione da diabete o da idrocortisone, regolando l'attività del fattore di crescita TGF-β1, dei suoi recettori e la sintesi dell'ossido nitrico durante la guarigione della ferita.

Studi più recenti hanno inoltre provato come la curcumina riesca ad inibire il danno causato dal perossido di idrogeno nei cheratinociti e nei fibroblasti grazie alle sue proprietà antiossidanti. Tutte queste ricerche suggeriscono quindi come il trattamento con curcumina aiuti ad aumentare la velocità di riparazione della ferita, a regolare la formazione di tessuto granulare e ad indurre la formazione di fattori di crescita [54].

4.1.3. Problematiche dell'utilizzo della curcumina

La limitazione più grande della curcumina risiede nella sua bassa biodisponibilità, dovuta ad una scarsa solubilità in soluzioni acquose, ad una scarsa permeabilità intestinale [45], ad uno scarso assorbimento e ad un rapido metabolismo [56]. Per migliorare la biodisponibilità della curcumina è possibile utilizzare dei coadiuvanti come la piperina, oppure è possibile ricorrere a sistemi di drug delivery (DDS) come liposomi, nano particelle, complessi fosfolipidici, micelle e silici mesoporose [46].

Sono numerosi i gruppi che hanno approfondito lo studio di silici mesoporose come carrier di curcumina. Il gruppo di Bollu ha analizzato due silici mesoporose, MSU-2 e MCM-41, entrambe funzionalizzate, come carrier di curcumina, valutando la cinetica di rilascio del

farmaco in un fluido sanguigno simulato. Inoltre, è stata studiata la citotossicità di questi sistemi dimostrandone l'efficacia contro diverse cellule tumorali [57]. Il gruppo di Xu ha studiato la silice MCM-41 funzionalizzata con dendrimeri e ha analizzato la quantità di curcumina incorporata e il rilascio di questa in PBS [58]. Il gruppo di Li ha approfondito la cinetica di rilascio di curcumina dalla silice MCM-41 funzionalizzata e inoltre ha dimostrato come questo sistema sia citotossico per le cellule tumorali mammarie [59]. Abouaitah et al. hanno studiato l'incorporazione tramite rotovapor di curcumina all'interno delle silici MCM-41 e KCC-1, entrambe funzionalizzate con gruppi aminopropile. Test di rilascio da questi carrier ad un pH acido (2,5), hanno mostrato un incremento della solubilità della curcumina [36]. Il gruppo di Elbialy ha approfondito lo studio sull'incorporazione di curcumina in una silice MCM-41 funzionalizzata, dimostrando inoltre l'attività antitumorale di tale sistema in vitro con le cellule tumorali HepG2 e HeLa [60]. Kotcherlakota et al. hanno studiato le silici KIT-6, MSU-2 e MCM-41 funzionalizzate con gruppi amminici, come possibili carrier per curcumina, e inoltre hanno dimostrato la maggiore attività antitumorale di questi sistemi in vitro confrontandola con quella della sola curcumina [61]. Il gruppo di Lü ha analizzato la silice MCM-41 funzionalizzata come carrier di curcumina, incorporando tale farmaco non solo all'interno dei pori, ma anche sulla superficie della silice [62]. Jambhrunkar et al. hanno studiato l'incorporazione di curcumina all'interno di silici MCM-41, funzionalizzate con gruppi metile e gruppi amino, valutando quindi come una superficie specifica più idrofobica o più idrofilica, possa influire sulla quantità di farmaco incorporato e sul rilascio di questo. Inoltre hanno dimostrato l'efficacia di questi sistemi contro le cellule tumorali SCC25 [35]. Il gruppo di Wang ha studiato come carrier di curcumina, nanoparticelle di silici mesoporose dendritiche funzionalizzate con acido folico. Tale gruppo ha analizzato inoltre la cinetica di rilascio del farmaco in PBS e dimostrato la citotossicità di questi sistemi per le cellule tumorali mammarie [63]. Il gruppo di Jin, infine, ha studiato l'incorporazione di curcumina su delle nano particelle cave di silice mesoporosa, analizzando il rilascio del farmaco in una soluzione acquosa a pH 10 [64].

In generale, tutti questi gruppi si sono concentrati sull'incorporazione di curcumina in silici per lo più funzionalizzate e hanno approfondito le proprietà antitumorali di tale principio attivo. Inoltre in letteratura sono state studiate principalmente nanoparticelle di silice mesoporosa come carrier di curcumina e non particelle sub-micrometriche e a mesoporosità ordinata come la SBA-15.

Nel presente lavoro di tesi invece è stata studiata come carrier di curcumina la silice SBA-15, una silice mesoporosa (non in forma di nanoparticelle), non funzionalizzata. Inoltre, viste le proprietà di *wound healing* della curcumina, il principale fine applicativo di questo carrier è previsto in ambito topico. Tale sistema è stato analizzato attraverso diverse caratterizzazioni chimico-fisiche al fine di verificare l'effettiva possibilità di incorporare curcumina all'interno del carrier scelto.

5. IMPREGNAZIONE DI DUE PRINCIPI ATTIVI

Nel presente lavoro di tesi, dopo aver verificato la possibilità di incorporare curcumina all'interno del supporto scelto, lo studio è stato esteso ad un'eventuale doppia impregnazione. In letteratura sono presenti pochi lavori dedicati allo studio della doppia incorporazione in silici mesoporose. In particolare il gruppo di Chen ha incorporato su una silice di tipo MCM-41 sia il farmaco antitumorale doxorubicina che dei frammenti di RNA [65]; mentre nel lavoro di tesi di Mazzeo sono stati incorporati su una silice a mesoporosità disordinata l'antiinfiammatorio idrocortisone e l'antifungineo clotrimazolo [5]. Da entrambi i lavori si evince come lo studio di una doppia impregnazione sia vantaggioso al fine di ottenere un'azione sinergica dei due principi attivi. Per tale motivo, nel presente lavoro di tesi si è scelto di incorporare su una silice a mesoporosità ordinata sia curcumina che un secondo principio attivo, sempre in vista di un'eventuale applicazione topica. Nello specifico per studiare la fattibilità del processo di doppia impregnazione è stato scelto un farmaco "modello" già studiato in numerosi lavori scientifici: l'ibuprofene. Le caratteristiche di tale principio attivo verranno descritte nel paragrafo successivo.

5.1.L' Ibuprofene

L'ibuprofene appartiene alla famiglia dei farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS) comunemente usati per applicazioni orali e topiche [66] grazie alle sue proprietà analgesiche, antiinfiammatorie e antipiretiche [67].

L'ibuprofene, nella sua azione antiinfiammatoria, agisce come inibitore non selettivo degli isoenzimi cicloossigenasi (COX-1 e COX-2) i quali sono responsabili della conversione dell'acido arachidonico in prostaglandine. Le prostaglandine svolgono un ruolo chiave nella piressia, nell'infiammazione e nella sensazione di dolore. In particolare l'ibuprofene inibisce le prostaglandine PGE 2 e PGI 2 [68].

La molecola dell'ibuprofene è costituita da un anello benzenico con in posizione para due gruppi diversi; uno è la catena metil-propil alchile e l'altro è un gruppo acido propionico (figura 5.1) [69].

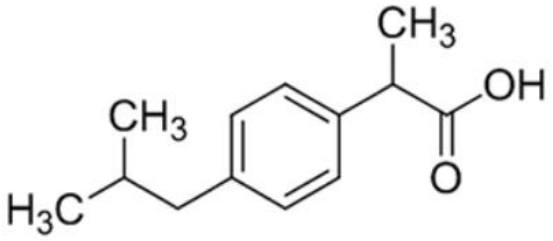

Figura 5.1 *Struttura molecolare dell'ibuprofene [38].*

La sua formula chimica è $C_{13}H_{18}O_2$ e il nome IUPAC è: (RS) - acido 2 – [4 – (2 – metilpropil) fenil] propanoico [70].

L'ibuprofene è un acido debole e la sua solubilità in soluzioni acquose è funzione del pH, come è possibile notare dalla figura 5.2 [71].

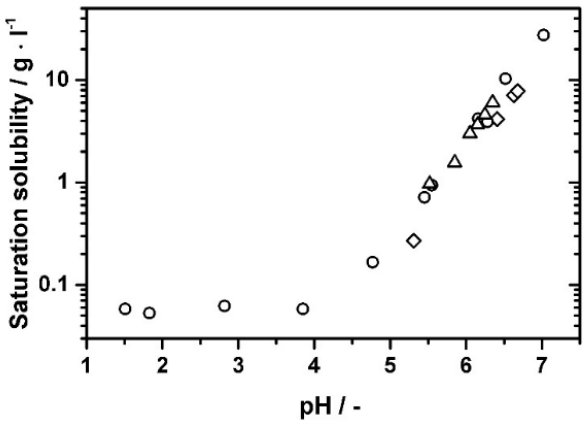

Figura 5.2 *Dipendenza della solubilità in soluzioni acquose dell'ibuprofene dal pH [71].*

Come è possibile osservare dal grafico in figura 14, la solubilità dell'ibuprofene aumenta con l'aumentare del pH; tuttavia tale principio attivo è caratterizzato da una scarsa solubilità in soluzioni acquose, infatti una delle maggiori limitazioni dell'ibuprofene è la sua bassa biodisponibilità. Per tale motivo, sono stati effettuati numerosi gli studi per incorporarlo in sistemi di drug loading [68].

Ad esempio, Onida et al. hanno incorporato l'ibuprofene in ossido di zinco nanostrutturato [66], i gruppi di Song e di Ahmadi hanno utilizzato una SBA-15 funzionalizzata come carrier per il rilascio controllato di ibuprofene [72] [73], il gruppo di Izquierdo-Barba invece ha utilizzato tre silici mesoporose differenti (MCM-48, SBA-15, SBA-15 funzionalizzata) per incorporare ibuprofene e valutarne il rilascio in SBF (fluido fisiologico simulato) [74].

In questo lavoro di tesi invece, l'ibuprofene è stato utilizzato come farmaco modello per verificare la fattibilità di una doppia impregnazione. In seguito, diverse tecniche di analisi hanno permesso di caratterizzare il sistema contenente i due principi attivi.

6. MATERIALI E METODI

6.1. Materiali

Per l'impregnazione tramite *Incipient Wetness Impregnation* sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), ≥ 65 %, in polvere da Curcuma Longa, Sigma-Aldrich®;
- etanolo (CH_3CH_2OH), anidro, Carlo Erba®;
- SBA-15, pore size 8 nm, Sigma-Aldrich®.

Per l'impregnazione tramite rotavapor sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), ≥ 65 %, in polvere da Curcuma Longa, Sigma-Aldrich®;
- metanolo (CH_3OH), ≥ 99,9 %, per HPLC, Honeywell Riedel- deHaen, Chromasolv™;
- SBA-15, pore size 8 nm, Sigma-Aldrich®.

Per l'impregnazione tramite $scCO_2$ sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), ≥ 65 %, in polvere da Curcuma Longa, Sigma-Aldrich®;
- ibuprofene ($C_{13}H_{18}O_2$), ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®;
- SBA-15, pore size 8 nm, Sigma-Aldrich®.

Per le caratterizzazioni e i rilasci sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- etanolo (CH_3CH_2OH), anidro, Carlo Erba®;
- acqua demineralizzata LiChrosolv® per cromatografia; Merck®.

6.2. Tecniche di impregnazione

Nei capitoli che seguono verranno descritte le tre tecniche di impregnazione utilizzate in questo lavoro di tesi: *Incipient Wetness Impregnation* (IWI), impregnazione mediante rotavapor e $scCO_2$.

6.2.1. Impregnazione mediante *Incipient Wetness Impregnation* (IWI)

Uno dei metodi scelti per impregnare la silice SBA-15 è l'*Incipient Wetness Impregnation* (IWI). Tramite questo metodo, il carrier mesoporoso viene impregnato con un volume di solvente uguale al volume dei pori. Proprio per tale motivo, il volume poroso della silice e la solubilità del farmaco nel solvente prescelto, sono i parametri principali che si devono considerare. Per quanto riguarda il solvente organico, è stato scelto di utilizzare etanolo. La solubilità della curcumina in etanolo è pari a 1 mg/ml.

Modalità di preparazione. Inizialmente, è stata preparata la soluzione di etanolo e curcumina di concentrazione 0.9 mg/ml. Successivamente sono stati pesati 400 mg di SBA-15, e tale silice è stata riposta in una piastra di petri. Infine, tramite l'utilizzo di una pipetta, il carrier è stato impregnato con un quantitativo di soluzione (circa 1 ml) paragonabile al volume poroso della silice. Tale procedimento è stato ripetuto per un numero di volte tale da raggiungere la percentuale in massa di farmaco desiderata. Dopo ogni impregnazione, è stato dato tempo al solvente di evaporare (a temperatura ambiente).

Alla fine del procedimento, è stato incorporato un quantitativo teorico di principio attivo pari all'8 wt.%.

6.2.2. Impregnazione mediante rotavapor

Il secondo metodo scelto per impregnare la silice SBA-15 è il rotavapor. Si è deciso di seguire il lavoro di Jambhrunkar e il suo gruppo, i quali hanno effettuato impregnazioni su una silice MCM-41 con curcumina [35].

Modalità di preparazione. Inizialmente, sono stati pesati 640 mg di SBA-15 e 160 mg di curcumina e sono state inserite nel pallone rotante. In seguito sono stati immessi 40 ml di metanolo nello stesso pallone. La soluzione contenente le polveri e il solvente è stata sonicata per 2 minuti e infine il pallone rotante è stato collegato ad un rotavapor, per 20 minuti a 50 °C, al fine di far evaporare il solvente ed ottenere il campione di silice impregnata con curcumina.

6.2.3. Impregnazione mediante $scCO_2$

Il terzo metodo di impregnazione utilizzato è la $scCO_2$. Tale metodo è stato utilizzato per incorporare ibuprofene all'interno dei campioni già caricati con curcumina.

Modalità di preparazione. Inizialmente sono state preparate le pastiglie di SBA-15 e di farmaco ciascuna di circa 100 mg, mediante l'utilizzo di una pressa. Tali pastiglie sono state inserite all'interno di un cilindro di vetro come è possibile vedere dalla figura 6.1.

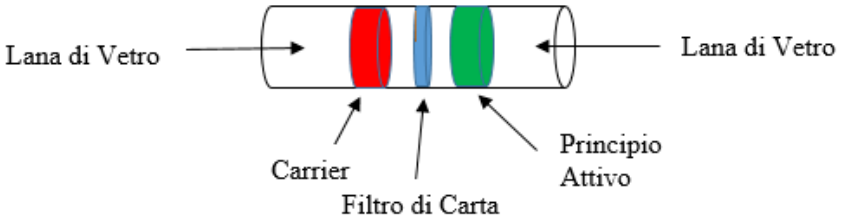

Figura 6.1 *Composizione cilindro per impregnazione con $scCO_2$.*

All'estremità del cilindro è stata posta della lana di vetro, al fine di proteggere il sistema. Il filtro di carta invece è stato utilizzato per evitare il contatto tra il farmaco e il supporto. Il cilindro infine è stato posto all'interno del vessel dell'apparato per l'impregnazione tramite $scCO_2$. I parametri di impregnazione utilizzati sono stati: 35°C, 15 MPa, 8 h.

6.3. Tecniche di caratterizzazione

Nel presente lavoro di tesi è stata eseguita una caratterizzazione chimico-fisica dei sistemi di drug delivery studiati. Nei capitoli seguenti verranno descritte le diverse tecniche di caratterizzazione utilizzate.

6.3.1. Diffrattometria a raggi X (XRD)

La diffrattometria a raggi X è una tecnica di analisi non distruttiva che permette di studiare la struttura della materia, sia questa cristallina o amorfa. I raggi X sono una forma di radiazione elettromagnetica ad alta energia e caratterizzati da una lunghezza d'onda comparabile alla

distanza tra gli atomi in un solido. Alla base di questa tecnica vi è l'interazione tra l'onda incidente (raggi X) ed il reticolo cristallino, secondo la legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d \cdot sen(\vartheta)$$

Dove d è la distanza tra i piani atomici, λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente, n è l'ordine di diffrazione e ϑ è l'angolo di incidenza.

Per caratterizzare i materiali mesoporosi è possibile effettuare sia un'analisi a bassi angoli, per verificare la presenza di un ordine strutturale a lungo raggio, sia ad alti angoli, per verificare se il sistema sia cristallino o amorfo. Nel presente lavoro di tesi, sono stata effettuate unicamente analisi ad alti angoli, poiché lo scopo principale è stato quello di verificare che il farmaco, una volta incorporato nei carrier, non diventasse cristallino.

Lo strumento utilizzato è il diffrattometro X'PERT3 Panalytical. L'emissione dei raggi X, avviene da un anodo in rame con $\lambda = 1.5406$ Å. Inoltre, lo strumento opera con una tensione di 40 kV e una corrente di 40 mA.

6.3.2. Analisi di adsorbimento di azoto

L'adsorbimento di azoto permette di valutare l'area superficiale specifica e la porosità di materiali porosi. Durante la misura, viene analizzata la quantità di azoto adsorbito e desorbito dal materiale al variare della pressione parziale dell'adsorbato (azoto).

I dati così ottenuti vengono rappresentati in curve chiamate isoterme di adsorbimento. Nel 1985 la IUPAC ha raggruppato in sei classi le isoterme [75]. (Figura 6.2)

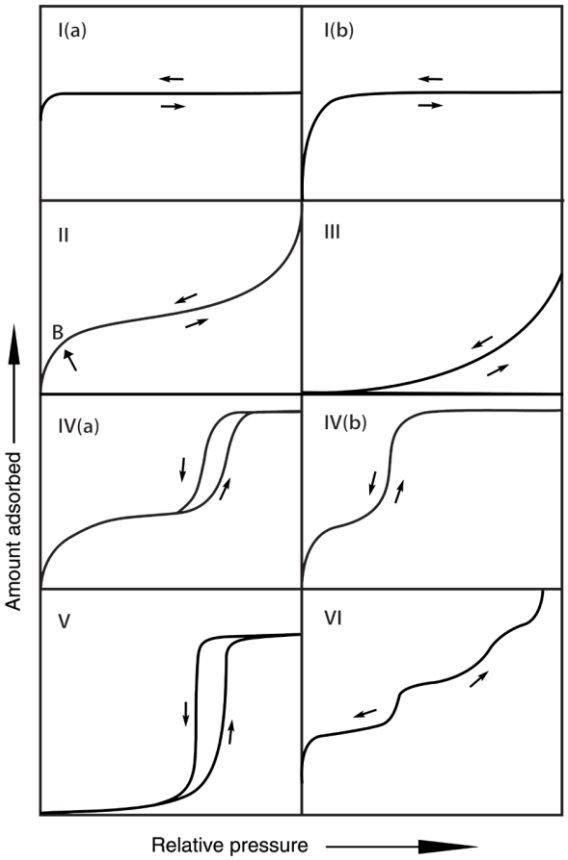

Figura 6.2 *Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [75].*

Le isoterme di tipo **I** identificano i materiali microporosi. La curva **I** (a) indica materiali che hanno una dimensione dei pori < 1 nm, mentre la curva **I** (b) indica materiali che hanno una dimensione dei pori < 2.5 nm. Tali isoterme, presentano, a pressioni più elevate, un plateau, indice del fatto che il materiale non è più in grado di adsorbire ulteriore adsorbato.

L'isoterma di tipo **II** è caratteristica dei materiali macroporosi e non porosi. Il punto di flesso presente nella curva, indica la formazione di un monostrato di adsorbato, il quale continua a crescere all'aumentare della pressione.

L'isoterma di tipo **III** è caratteristica di situazioni in cui le interazioni tra adsorbente e adsorbato sono deboli.

Le isoterme di tipo **IV** vengono utilizzate per descrivere i materiali mesoporosi. L'adsorbimento in questi materiali è governato dalle interazioni tra adsorbato e adsorbente e dalle interazioni tra le molecole durante la condensazione. Nella curva **IV** (a), la condensazione capillare è

accompagnata da un'isteresi. Questo fenomeno avviene quando la dimensione dei pori supera un certo valore critico funzione del sistema di adsorbimento e della temperatura. Con adsorbenti caratterizzati invece da una più bassa dimensione dei pori, la curva, **IV** (b), è completamente reversibile, ossia il ramo di adsorbimento e quello di desorbimento coincidono.

L'isoterma di tipo **V** è caratteristica, come la **III**, di deboli interazioni tra adsorbente e adsorbato. Inoltre in tale curva è presente un'isteresi associata al meccanismo di riempimento e svuotamento dei pori.

L'isoterma di tipo **VI** è utilizzata per descrivere un adsorbimento *layer-by-layer* su una superficie non porosa altamente uniforme [75].

Esiste anche una classificazione dei cappi di isteresi, oltre che delle isoterme, identificata sempre dalla IUPAC. (Figura 6.3)

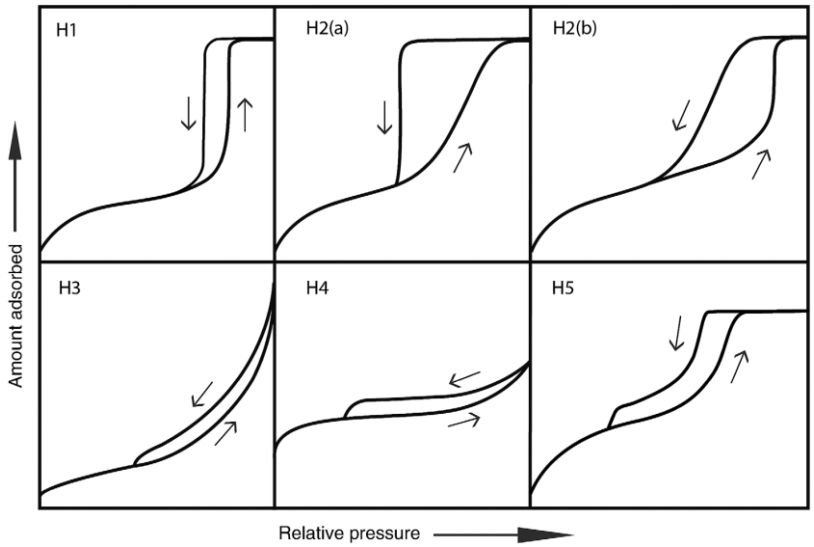

Figura 6.3 *Classificazione IUPAC dei cappi di isteresi [75].*

La tipologia H1, è associata a pori cilindrici. La tipologia H2 invece, è caratteristica di una struttura più complessa in cui gli effetti del *network* (*pore blocking*) sono importanti. Il cappio di isteresi di tipo H3, è associato all'esistenza di aggregati di particelle disposti in strati sottili. La tipologia H4, è generalmente osservata in materiali contenenti sia micropori che mesopori

[76]. Il cappio di isteresi H5 invece, è più inusuale, ed è caratteristico di un sistema contenente sia mesoporosità aperte, che parzialmente bloccate [75].

Nel presente lavoro di tesi, la tecnica dell'adsorbimento di azoto è stata utilizzata al fine di conoscere l'area superficiale, il diametro medio e la distribuzione dei pori, e il volume poroso dei sistemi studiati.

Prima di ogni misura è stato eseguito un degasaggio, effettuato a 70°C per 3 ore, per eliminare contaminazioni e/o acqua presenti sulla superficie dei campioni.

Per effettuare l'analisi è stato utilizzato lo strumento ASAP 2020 Plus Micrometrics. Per ricavare il valore dell'aera superficiale dei sistemi studiati, è stato utilizzato il modello BET (Brunauer, Emmett and Teller); per ricavare invece il valore della dimensione dei pori, è stato utilizzato il modello BJH (Barett, Joyner and Halenda).

6.3.3. Analisi termogravimetrica (TGA)

La termogravimetria è una tecnica di analisi che misura la variazione di massa di un campione in funzione della temperatura o del tempo in atmosfera controllata.

È possibile calcolare la variazione di massa del campione, tramite la seguente relazione:

$$\Delta m\% = \frac{m_{iniziale} - m_{finale}}{m_{inizlale}} \cdot 100$$

Nel presente lavoro, l'analisi termogravimetrica è stata utilizzata per quantificare la massa di principio attivo incorporato sui supporti mesoporosi. Nello specifico, i campioni (circa 10 mg) sono stati sottoposti ad una rampa di riscaldamento di 10°C/min fino al raggiungimento di 800°C, ed è stata insufflata aria all'interno dello strumento.

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

6.3.4. Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è una tecnica di caratterizzazione non distruttiva che attraverso la radiazione IR, permette di ricavare informazioni strutturali sul materiale analizzato [2].

Attraverso l'interazione tra i raggi IR e un campione è possibile avere informazioni di tipo qualitativo sui legami chimici e, in particolare, sui modi di vibrazione dei gruppi funzionali delle molecole presenti nel materiale. Esistono diversi modi di vibrazione:

- Stiramento o *stretching*, in cui la vibrazione è lungo l'asse di legame della molecola; questo modo di vibrazione può essere simmetrico o antisimmetrico.
- Piegamento o *bending*, in cui si ha una vibrazione oscillatoria dell'angolo di legame; questo tipo di oscillazione si distingue in *rocking*, *scissoring*, *wagging* o *twisting* [19]. (Figura 6.4)

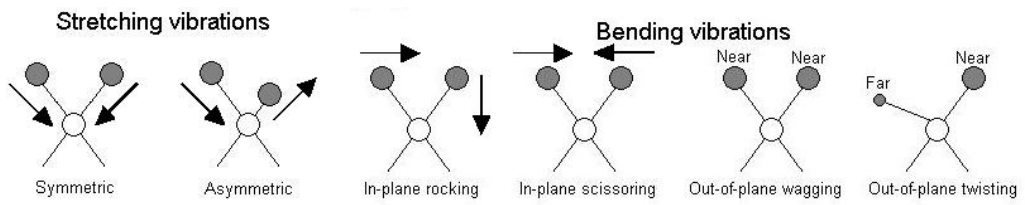

Figura 6.4 *Modi di vibrazione di una molecola [77].*

Non tutti i modi di vibrazione sono IR attivi, infatti affinché un modo vibrazionale sia visibile in uno spettro IR, è necessario che vari il momento di dipolo della molecola durante la vibrazione [19].

In uno spettro IR è possibile distinguere due zone, una relativa ai gruppi funzionali, tra 4000 e 1300 cm^{-1}, e una relativa alle impronte digitali della molecola, tra 1300 e 600 cm^{-1} [5]. (Figura 6.5)

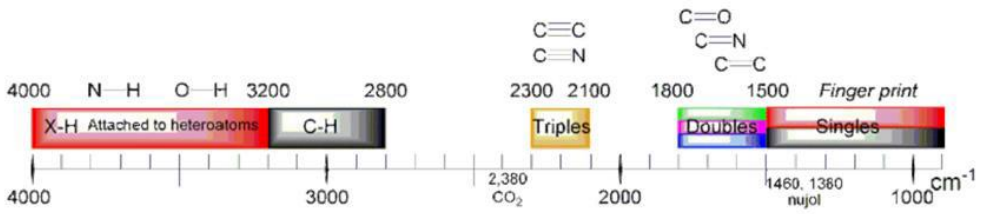

Figura 6.5 *Zone dello spettro IR [5].*

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato lo spettrofotometro Equinox 55 Bruker.

Gli spettri sono stati rappresentati in termini di assorbanza in funzione del numero d'onda. I campioni, in pastiglie molto sottili (con o senza KBr), sono stati inseriti all'interno di una cella trasparente alla radiazione IR nella quale è stata impostata una pressione di 0.1 Pa.

6.3.5. Spettroscopia UV/Visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica di caratterizzazione qualitativa e quantitativa utilizzata per identificare e determinare la concentrazione di composti in una determinata soluzione. Ogni composto, infatti, presenta un picco (o più) di assorbimento caratteristico ad una determinata lunghezza d'onda. Una schematizzazione di uno spettrofotometro UV/Vis è osservabile in figura 6.6.

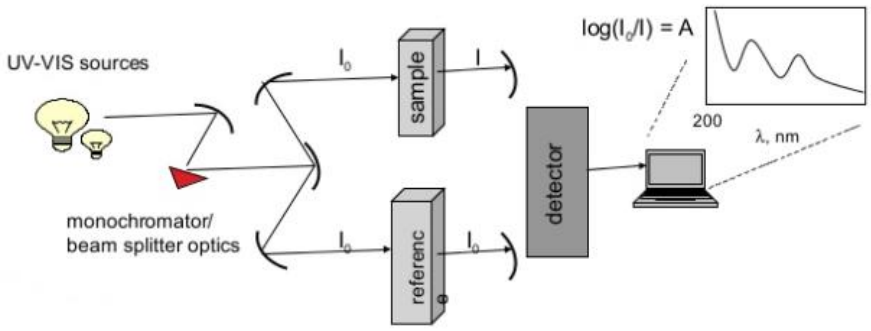

Figura 6.6 *Schema di uno spettrofotometro UV/Vis [78].*

I componenti principali sono: una sorgente di energia radiante, un monocromatore, i recipienti per il campione e per il riferimento (cuvette) e un rivelatore.

Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è lo spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer. Per il corretto utilizzo dello strumento, è necessario riempire inizialmente due cuvette con il solvente puro, al fine di impostare il bianco. Successivamente in una delle due cuvette viene inserita la soluzione campione, la cui assorbanza viene confrontata con quella del riferimento (il bianco). Le cuvette utilizzate sono in quarzo e hanno un percorso ottico di 1 cm.

7. CARATTERIZZAZIONE DELLA SILICE SBA-15 IMPREGNATA TRAMITE IWI

La silice SBA-15 è stata impregnata con curcumina tramite IWI secondo la tecnica descritta nel paragrafo 6.2.1. Di seguito verranno descritti i risultati ottenuti tramite questo metodo.

Diffrattometria a raggi X

Lo spettro in figura 7.1 mostra un picco a 17.5° relativo alla curcumina cristallina, indice del fatto che il farmaco non è completamente amorfo all'interno della silice.

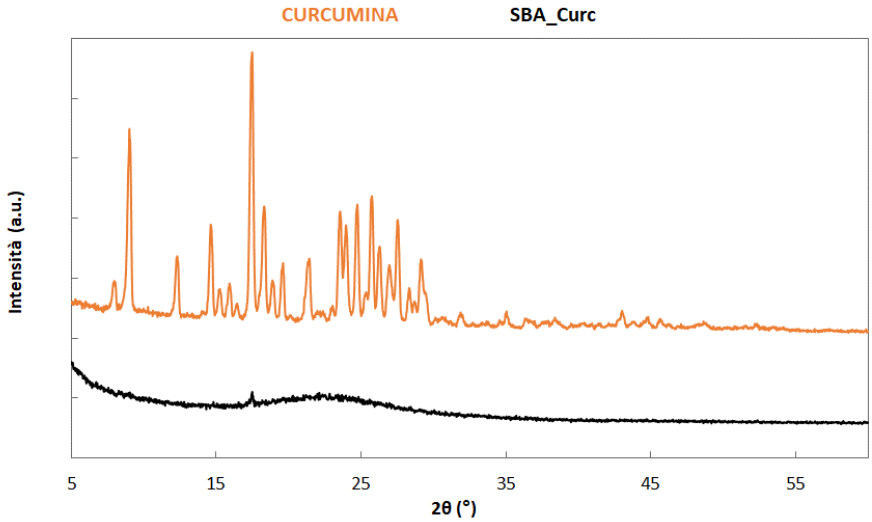

Figura 7.1 *Spettro XRD di SBA-15_Curc_iwi e curcumina.*

Adsorbimento di azoto

In figura 7.2 è possibile notare il confronto tra l'isoterma del riferimento (SBA-15) e l'isoterma del campione impregnato (SBA-15_Curc_iwi). Le isoterme sono entrambe di tipo IV, non si nota un cambiamento della forma del cappio di isteresi, ma una leggera diminuzione del volume poroso.

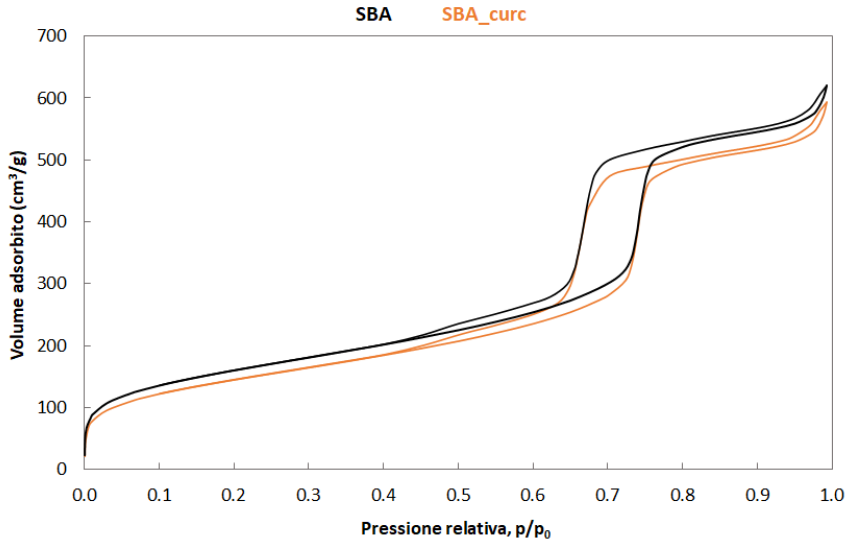

Figura 7.2 *Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_iwi.*

In figura 7.3 invece vi è il confronto tra le due distribuzioni porose, si può notare come la distribuzione ottenuta incorporando curcumina nella SBA-15 sia uguale a quella del riferimento stesso.

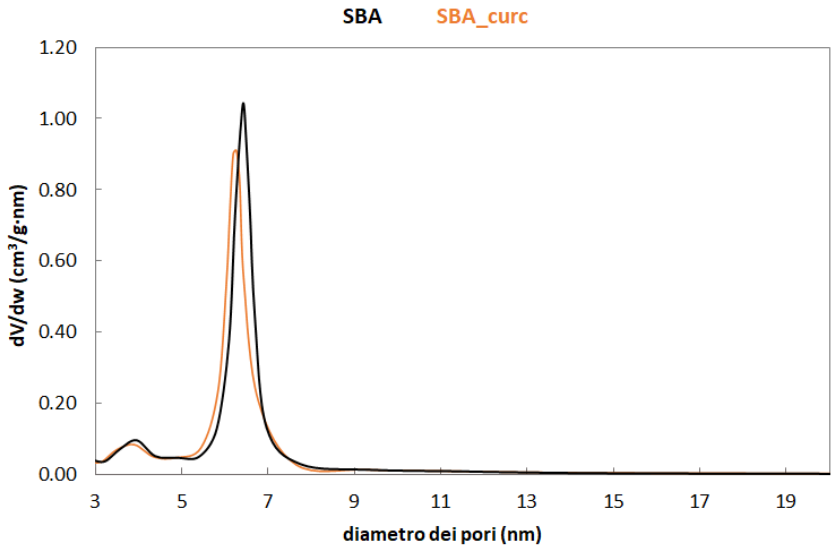

Figura 7.3 *Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_iwi.*

Nella tabella 7.1 è riportato un confronto tra i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione. È possibile osservare una diminuzione sia di superficie specifica, che di volume poroso a seguito dell'impregnazione, a conferma dell'avvenuta incorporazione di curcumina.

Tabella 7.1 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15 e SBA-15_Curc_iwi.*

	SBA	**SBA-15_Curc_iwi**
Area superficiale specifica (m^2/g)	570	520
Volume poroso (cm^3/g)	0,90	0,82
Diametro dei pori (nm)	6,4	6,3

Analisi termogravimetrica

Dalla curva termogravimetrica riportata in figura 7.4, è possibile osservare come dalla temperatura ambiente ad una temperatura di circa 172°C il campione subisca una perdita di peso di circa il 4,5 % associabile ad acqua fisisorbita sulla superficie. Successivamente si nota una diminuzione di peso prima più modesta e poi più ripida di circa il 6,6 % fino alla temperatura di 800°C. L'1,6 % di questa perdita è dovuto alla condensazione dei silanoli, mentre il 5,0 % alla degradazione della curcumina. Da tale analisi è quindi possibile concludere come il contenuto in massa di curcumina sia più basso del valore nominale (8 wt. %) e corrisponda al 5 wt. %.

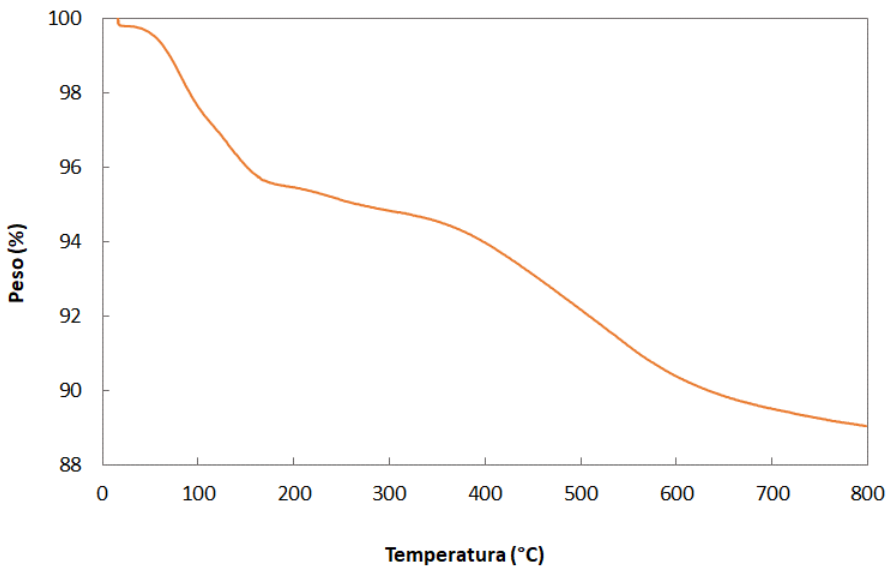

Figura 7.4 *Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_iwi.*

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 7.5 è osservabile un confronto tra lo spettro FTIR del riferimento (SBA-15) e lo spettro del campione SBA-15_Curc_iwi. Per quanto riguarda la zona dei silanoli, nel campione caricato con curcumina, si osserva una diminuzione evidente del picco dei silanoli isolati (3750 cm^{-1}) ed un aumento della banda dovuta ai silanoli interagenti. Questo è indice del fatto che il principio attivo sta interagendo con la superficie della silice tramite la formazione di legami idrogeno con i silanoli. Inoltre nello spettro del campione SBA-15_Curc_iwi è possibile osservare diverse bande relative al principio attivo. Il picco a 1625 cm^{-1} è caratteristico dello *stretching* C=C e C=O della molecola. Il picco a 1603 cm^{-1} e la spalla a circa 1578 cm^{-1} sono dovuti allo *stretching* C=C degli anelli aromatici, mentre la banda più intensa a 1510 cm^{-1} è caratteristica dello *stretching* C=O e del *bending* di CC=O e CCC [79]. Inoltre sono meno visibili, ma comunque presenti, i picchi a 1464 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} relativi al *bending* CH_3 e il picco a 1428 cm^{-1} caratteristico del *bending* CCC, CCH e COH [80].

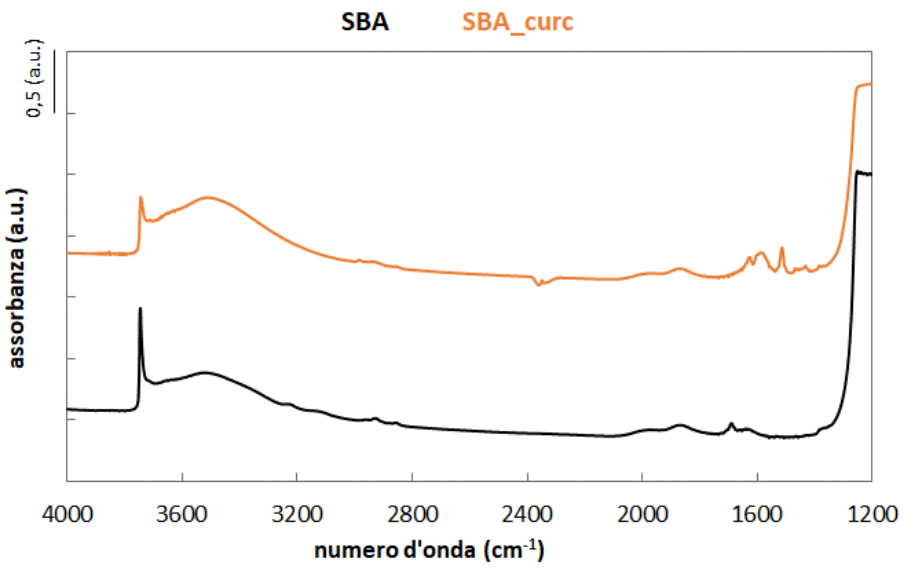

Figura 7.5 *Confronto tra lo spettro FTIR della silice SBA e del campione SBA-15_Curc_iwi.*

I risultati ottenuti mostrano come sia possibile incorporare curcumina tramite IWI su silice SBA-15 non funzionalizzata. La curcumina sembra interagire con la superficie del carrier attraverso legami a idrogeno con i silanoli. Bisogna comunque sottolineare come la quantità impregnata sia inferiore a quella teorica e come parte della curcumina sia in forma cristallina (contrariamente a quanto desiderato).

8. CARATTERIZZAZIONE DELLA SILICE SBA-15 IMPREGNATA TRAMITE ROTAVAPOR

La silice SBA-15 è stata impregnata con curcumina tramite rotavapor secondo la tecnica descritta nel paragrafo 6.2.2. Di seguito verranno descritti i risultati ottenuti tramite questo metodo.

Diffrattometria a raggi X

Lo spettro XRD in figura 8.1 non mostra alcun picco caratteristico, indice del fatto che il principio attivo è in uno stato amorfo all'interno del carrier.

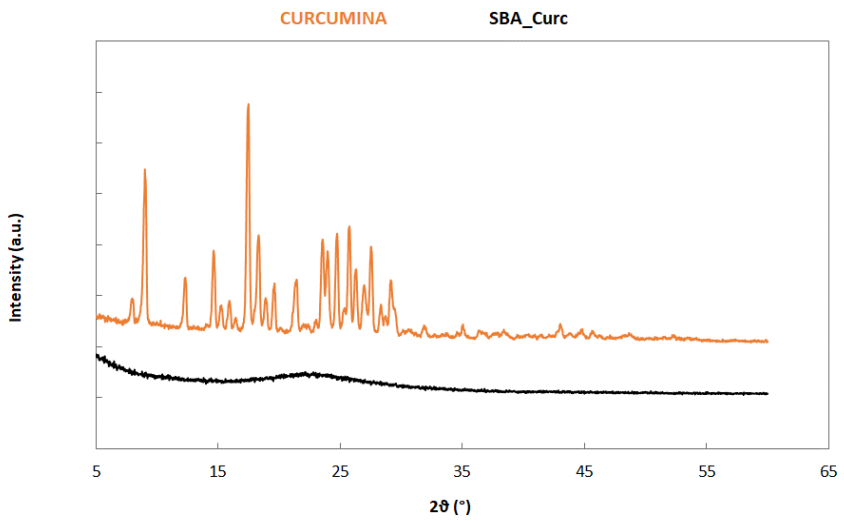

Figura 8.1 *Spettro XRD di SBA-15_Curc_rota e curcumina.*

Adsorbimento di azoto

In figura 8.2 è possibile osservare il confronto tra l'isoterma del riferimento (SBA-15) e l'isoterma del campione impregnato (SBA-15_Curc_rota). Le isoterme sono entrambe di tipo IV, non si nota un cambiamento della forma del cappio di isteresi, ma una leggera diminuzione del volume poroso. Inoltre è ben visibile come l'isoterma del campione impregnato sia traslata verso pressioni relative più elevate, indice di un rigonfiamento dei pori.

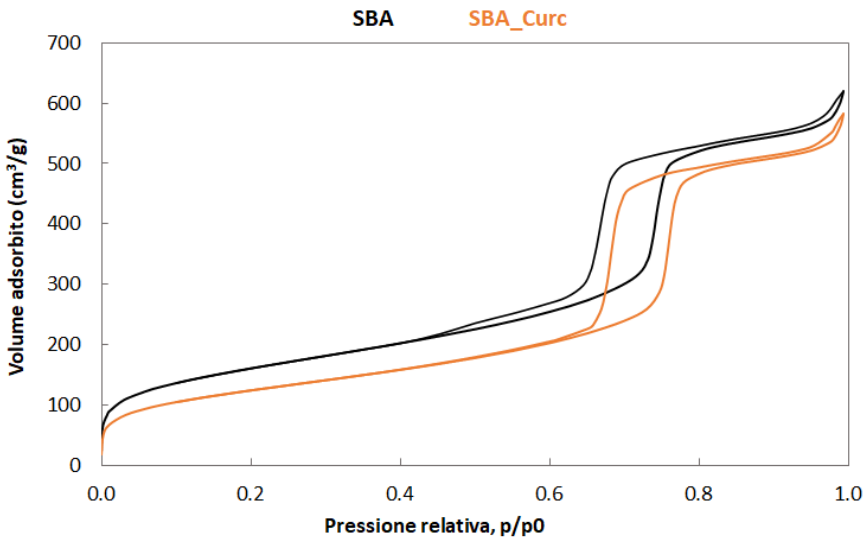

Figura 8.2 *Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_rota.*

In figura 8.3 invece vi è il confronto tra le distribuzioni dei pori dei due campioni. Le curve confermano un aumento della dimensione dei pori nel campione impregnato tramite l'utilizzo del rotavapor.

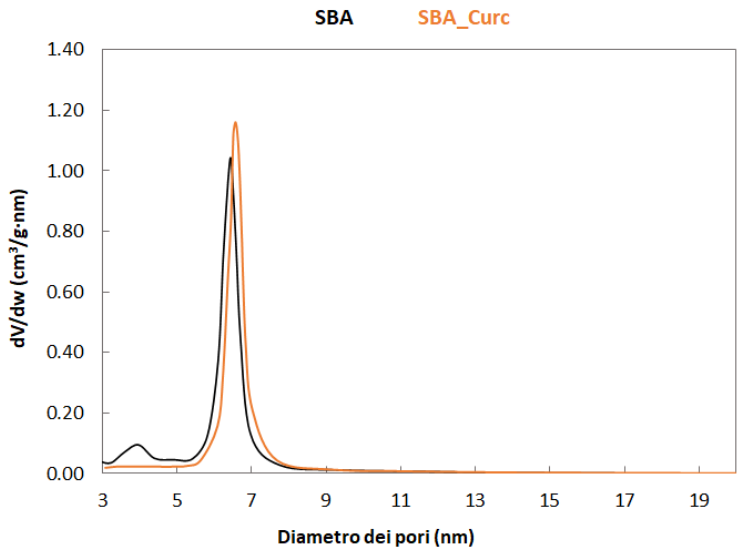

Figura 8.3 *Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_rota.*

Un confronto tra i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione impregnato è riportato in tabella 8.1. E' possibile osservare una diminuzione sia di area superficiale specifica, che di volume poroso e un aumento del diametro dei pori.

Tabella 8.1 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15 e SBA-15_Curc_rota.*

	SBA	**SBA-15_Curc_rota**
Area superficiale specifica (m^2/g)	570	445
Volume poroso (cm^3/g)	0,90	0,87
Diametro dei pori (nm)	6,4	6,6

Infine per verificare se l'aumento della dimensione dei pori e quindi l'effetto di *swelling* sul campione SBA-15_Curc_rota sia dovuto al trattamento con metanolo, un campione di silice SBA-15 è stato sottoposto a un procedimento simile a quello adoperato per l'impregnazione tramite rotavapor, ma senza l'aggiunta di curcumina.

Inizialmente, sono stati pesati 100 mg di SBA-15 e inseriti in un backer con 6,25 ml di metanolo. La soluzione contenente le polveri e il solvente è stata sonicata per 2 minuti e infine è stato fatto evaporare il solvente in uno stirrer per 20 minuti a 50 °C.

Dal grafico in figura 8.4 è possibile notare il confronto tra l'isoterma del riferimento (SBA-15) e l'isoterma della silice di riferimento trattata con metanolo (SBA-15_metanolo). Le isoterme sono entrambe di tipo IV, non si nota un cambiamento della forma del cappio di isteresi, ma un aumento del volume poroso e uno spostamento della curva verso pressioni relative più elevate.

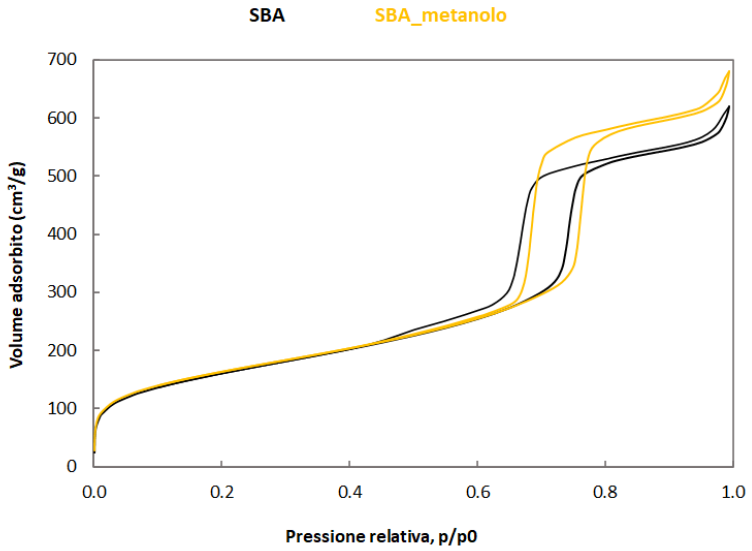

Figura 8.4 *Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione trattato con metanolo.*

In figura 8.5 invece vi è il confronto tra le due distribuzioni porose. Dalle curve è possibile vedere come ci sia stato effettivamente un aumento della dimensione dei pori, passando da un valore medio di 6,4 nm, relativo al riferimento, ad un valore di 6,8 nm, relativo alla silice trattata.

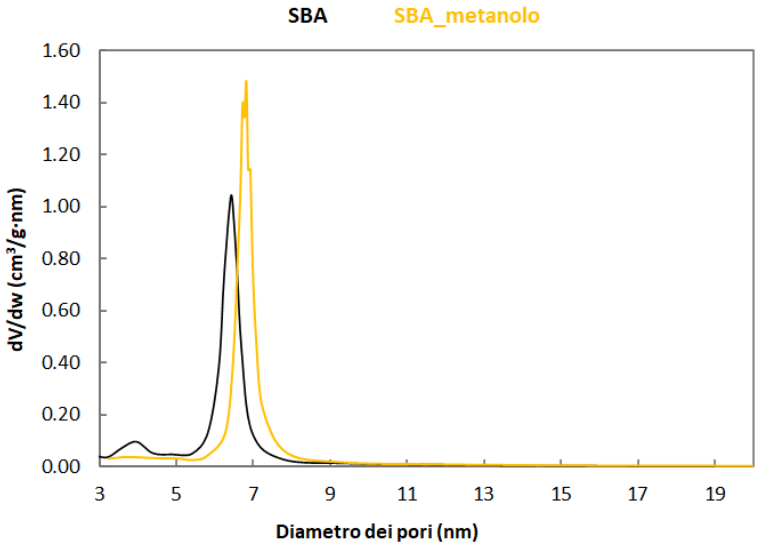

Figura 8.5 *Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione trattato con metanolo.*

È possibile quindi concludere che l'aumento del diametro dei pori osservato nel campione SBA-15_Curc_rota, non sia imputabile alla presenza di curcumina, bensì al trattamento con metanolo effettuato durante l'impregnazione.

Analisi termogravimetrica

Dall'analisi ATG osservabile in figura 8.6, è possibile notare come dalla temperatura ambiente ad una temperatura di circa 172°C abbia luogo una perdita di peso di circa l'1 % associabile ad acqua fisisorbita sulla superficie. Successivamente si nota una diminuzione di peso prima più modesta e poi più ripida di circa il 7,7 % fino alla temperatura di 800°C. L'1,6 % di questa perdita è dovuto ai silanoli, mentre il 6,1 % alla curcumina.

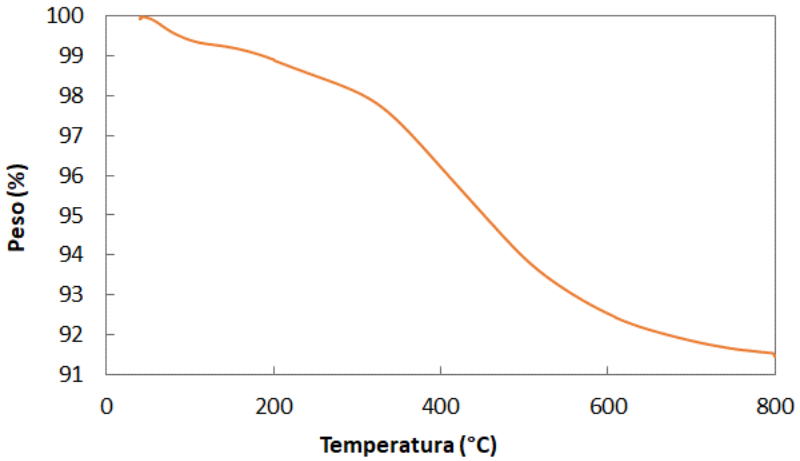

Figura 8.6 *Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_rota.*

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 8.7 è presente un confronto tra lo spettro FTIR del riferimento (SBA-15) e lo spettro del campione SBA-15_Curc_rota. Per quanto riguarda la zona dei silanoli, si nota nel campione contenente curcumina, una diminuzione molto evidente del picco caratteristico dei silanoli isolati (3750 cm^{-1}) ed un aumento invece della banda dovuta ai silanoli interagenti. Questo è indice del fatto che il principio attivo sta interagendo con la superficie della silice tramite la

formazione di legami a idrogeno con i silanoli. Inoltre nello spettro del campione SBA-15_Curc_rotavapor è possibile osservare diverse bande relative al principio attivo. Il picco a 1625 cm^{-1} è caratteristico dello *stretching* C=C e C=O della molecola. Il picco a 1603 cm^{-1} e la spalla a circa 1578 cm^{-1} sono dovuto allo *stretching* C=C degli anelli aromatici, mentre la banda più intensa a 1510 cm^{-1} è caratteristica dello *stretching* C=O e del *bending* di CC=O e CCC [79]. Inoltre sono meno visibili, ma comunque presenti, i picchi a 1464 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} relativi al *bending* CH_3 e il picco a 1428 cm^{-1} caratteristico del *bending* CCC, CCH e COH [80].

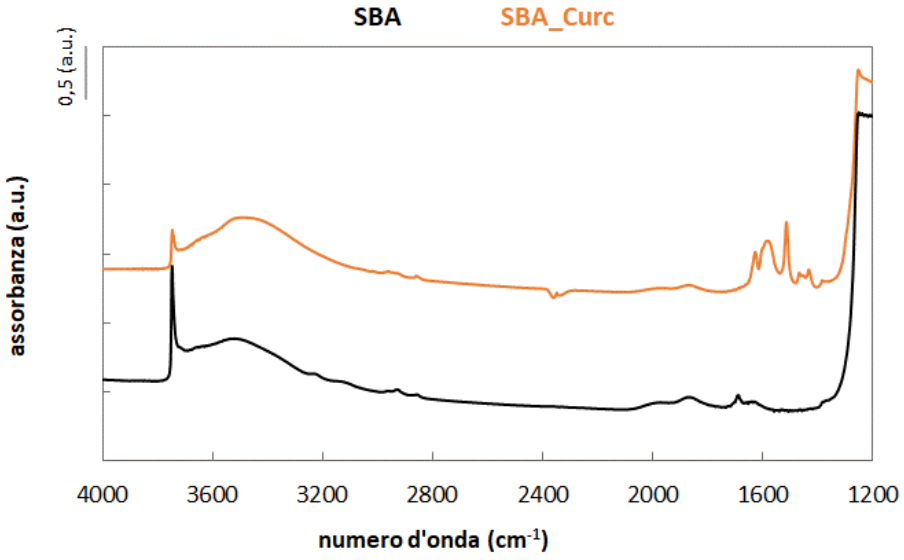

Figura 8.7 *Confronto tra lo spettro FTIR della silice SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_rota.*

I risultati derivanti da tali analisi evidenziano come sia possibile incorporare curcumina, tramite l'utilizzo del rotavapor, all'interno della silice SBA-15, non funzionalizzata. La curcumina sembra essere distribuita in modo omogeneo sulla superficie del carrier e sembra interagire con essa attraverso la formazione di legami a idrogeno con i silanoli. Inoltre tale principio attivo si presenta in forma amorfa all'interno del carrier.

9. CONFRONTO TRA IL CAMPIONE SBA-15_Curc_iwi E IL CAMPIONE SBA-15_Curc_rota

Diffrattometria a raggi X

Dagli spettri riportati in figura 7.1 e 8.1 è possibile notare come nel caso di impregnazione tramite la tecnica IWI, il farmaco non è completamente amorfo, ma mostra un picco a 17,5°. Nel caso invece di impregnazione tramite rotavapor, la curcumina si presenta totalmente amorfa all'interno del supporto. Quindi tale tecnica si è mostrata più efficacie dal punto di vista dell'amorfizzazione del farmaco.

Adsorbimento di azoto

Le figure 9.1 e 9.2 mostrano rispettivamente il confronto delle isoterme di adsorbimento e delle distribuzioni porose tra i campioni SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_rota.

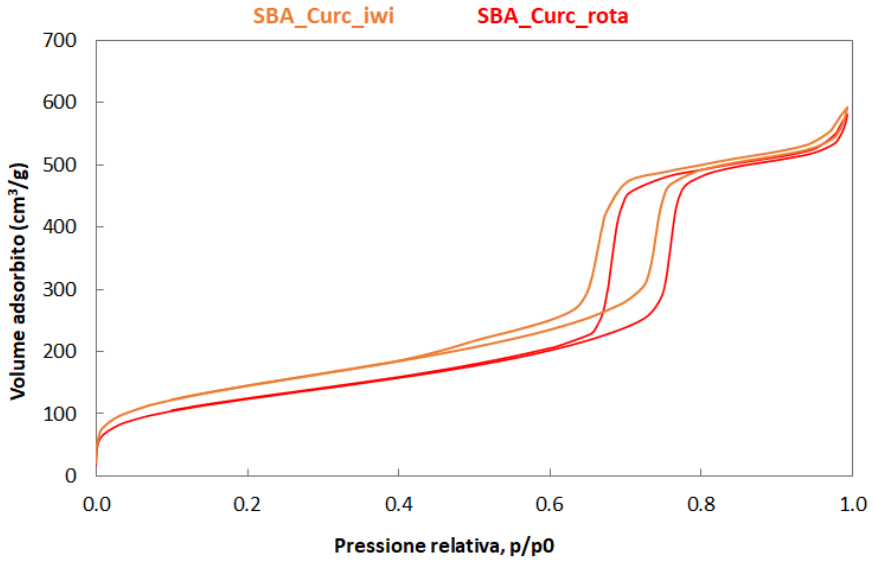

Figura 9.1 *Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_rota.*

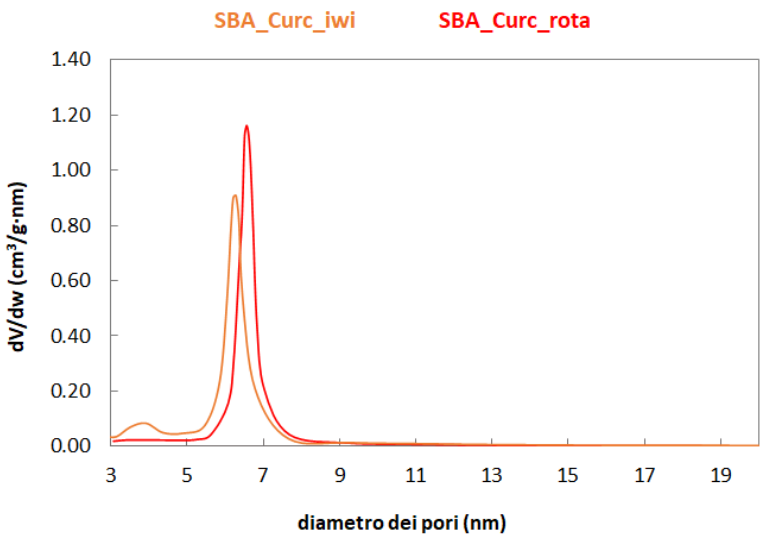

Figura 9.2 *Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_rota.*

Dal confronto tra le isoterme di adsorbimento è possibile osservare come entrambe le curve siano isoterme di tipo IV e come la forma del cappio di isteresi sia la stessa. Inoltre è ben visibile come l'isoterma del campione SBA-15_Curc_rota si trovi a pressioni relative più elevate. Per quanto riguarda invece il confronto delle distribuzioni porose, è possibile osservare come nel campione SBA-15_Curc_rota si è verificato un aumento della dimensione dei pori.

In tabella 9.1 è possibile notare un confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto tra il campione SBA-15_Curc_iwi, il campione SBA-15_Curc_rota e il riferimento (SBA-15). È ben visibile come ci sia una maggiore diminuzione di area superficiale specifica nel campione SBA-15_Curc_rota, rispetto al campione SBA-15_Curc_iwi a indicare una distribuzione più omogenea del farmaco sulla superficie del supporto nel caso del campione SBA-15_Curc_rota. Per quanto riguarda il volume poroso, la diminuzione maggiore riguarda il campione SBA-15_Curc_iwi. Questo risultato può essere spiegato considerando due aspetti. In primo luogo, come dimostrato, il campione trattato tramite rotavapor ha subito un rigonfiamento dei pori, che "maschera" l'eventuale diminuzione di volume poroso indotto dall'incorporazione della curcumina. In secondo luogo, nel caso dell'impregnazione tramite IWI, si può ipotizzare una distribuzione meno omogenea del principio attivo nei pori e un fenomeno di *pore blocking*. Quest'ultimo è coerente con quanto osservato, cioè una diminuzione di volume poroso senza, però, una diminuzione significativa del diametro dei pori.

Tabella 9.1 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15, SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_rota.*

	SBA	SBA-15_Curc_iwi	SBA-15_Curc_rota
Area superficiale specifica (m^2/g)	570	520	445
Volume poroso (cm^3/g)	0,90	0,82	0,87
Diametro dei pori (nm)	6,4	6,3	6,6

Analisi termogravimetrica

Dal confronto tra le figure 7.4 e 8.6 è possibile dimostrare come la quantità di farmaco incorporata sia differente nei campioni SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_rota. Nel primo caso la curcumina incorporata è pari al 5,0 wt. %, nel secondo caso invece la quantità incorporata è pari al 6,1 wt. %. Quindi l'utilizzo del rotavapor è risultato più efficace in termini di quantità di principio attivo incorporata.

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Osservando gli spettri in figura 9.3 è possibile notare come presentino gli stessi picchi relativi ai gruppi funzionali della curcumina. Nel caso del campione SBA-15_Curc_rota, l'intensità relativa di tali picchi è però più elevata, indice di una maggiore quantità di principio attivo all'interno del supporto. Inoltre osservando la zona del silanoli, è possibile notare una diminuzione più evidente del picco caratteristico dei silanoli isolati nel campione SBA-15_Curc_rota e quindi un aumento più significativo della banda dovuta ai silanoli interagenti. Questo è indice del fatto che il principio attivo sta interagendo con la superficie della silice in quantità maggiore e in modo più efficace nel campione in cui è stato utilizzato il rotavapor come metodo di impregnazione.

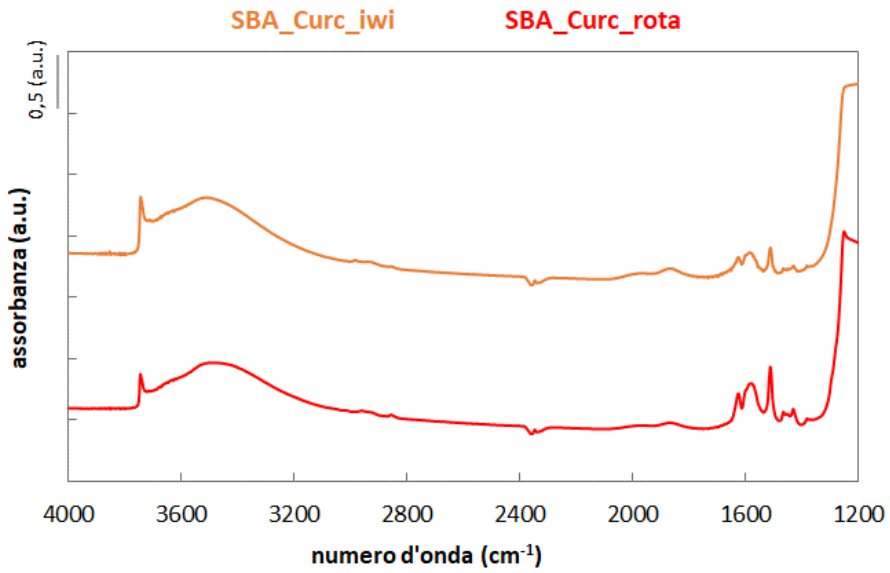

Figura 9.3 *Confronto tra gli spettri FTIR dei campioni SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_rota.*

Si può quindi concludere che, benchè sia possibile incorporare curcumina su silice SBA-15, sia utilizzando l'IWI che il rotavapor, quest'ultima tecnica risulta preferibile. Tramite rotavapor, infatti, è possibile incorporare una quantità maggiore di curcumina completamente amorfa ed ottenere una distribuzione omogenea del farmaco sulla superficie delle porosità del supporto. Infine, nella prospettiva di ottimizzare ulteriormente l'impregnazione tramite rotavapor, si può ipotizzare l'utilizzo di un solvente diverso dal metanolo (ad esempio l'etanolo), così da evitare fenomeni collaterali come il rigonfiamento dei pori.

10. SISTEMA A 2 PRINCIPI ATTIVI

Prima di eseguire la doppia impregnazione, è stata effettuata una prova preliminare di impregnazione tramite $scCO_2$ con solo ibuprofene. I risultati di tale impregnazione sono mostrati all'inizio del presente capitolo. I paragrafi successivi, invece, sono dedicati alla doppia impregnazione di ibuprofene e curcumina tramite $scCO_2$ e IWI o rotavapor rispettivamente.

10.1. Caratterizzazione della silice SBA-15 impregnata con ibuprofene tramite $scCO_2$

La silice SBA-15 è stata impregnata con ibuprofene tramite $scCO_2$ secondo la tecnica descritta nel paragrafo 6.2.3. Di seguito verranno descritti i risultati ottenuti tramite questo metodo.

Diffrattometria a raggi X

Lo spettro del campione SBA-15_ibu in figura 10.1 non mostra alcun picco caratteristico, indice del fatto che il principio attivo si trova in uno stato amorfo all'interno del carrier.

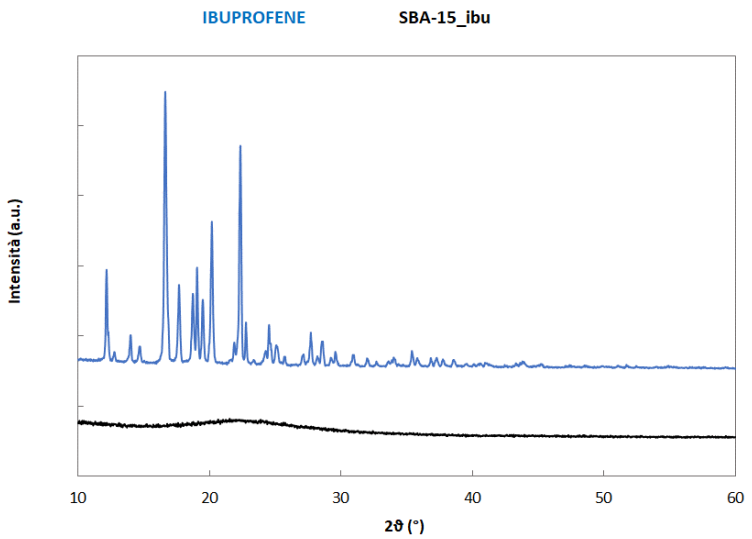

Figura 10.1 *Spettro XRD di ibuprofene cristallino e del campione SBA-15_ibu.*

Adsorbimento di azoto

In figura 10.2 è possibile notare il confronto tra l'isoterma del riferimento (SBA-15) e l'isoterma del campione impregnato con ibuprofene (SBA-15_ibu). Sono ben osservabili una diminuzione del volume adsorbito e un cambiamento della forma del cappio di isteresi, indice di una transizione da una porosità cilindrica ed ordinata ad una meno definita. Non è da escludere anche un fenomeno di *pore blocking.*

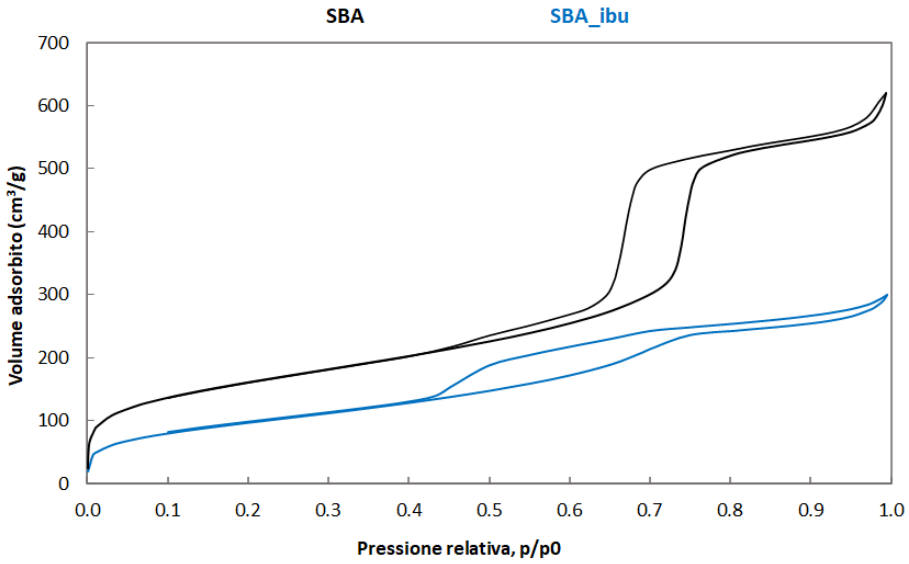

Figura 10.2 *Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_ibu.*

In figura 10.3 invece vi è il confronto tra le due distribuzioni porose. Dalla curva relativa al campione SBA-15_ibu è possibile vedere come la distribuzione si è mantenuta monomodale mentre si nota una diminuzione della dimensione dei pori nel campione.

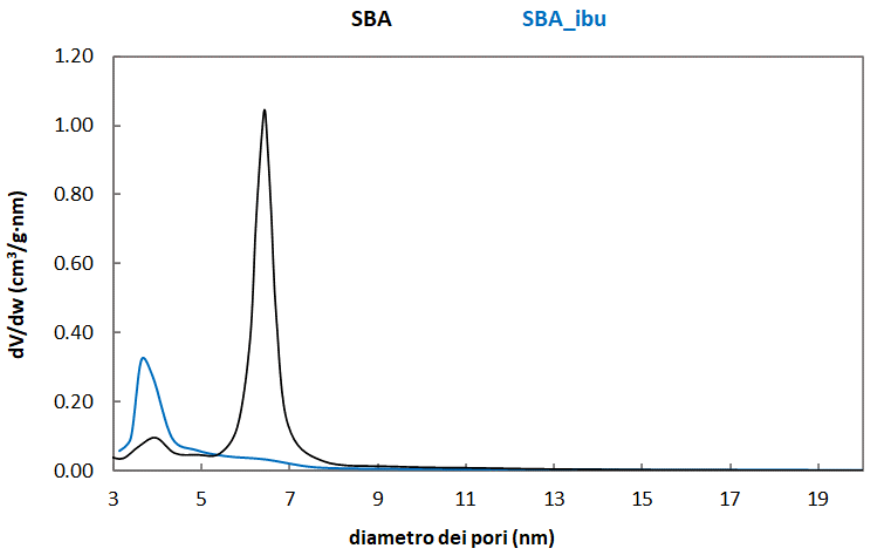

Figura 10.3 *Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_ibu.*

Nella tabella 10.1 è riportato un confronto tra i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione. Tali valori hanno subito un'evidente diminuzione nel campione SBA-15_ibu.

Tabella 10.1 *Confronto tra i valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15 e SBA-15_ibu.*

	SBA	**SBA-15_ibu**
Area superficiale specifica (m^2/g)	570	355
Volume poroso (cm^3/g)	0,90	0,45
Diametro dei pori (nm)	6,4	3,6

In conclusione, i risultati dell'analisi di adsorbimento di azoto mostrano come una quantità significativa di ibuprofene sia stata incorporata sul supporto. Il principio attivo sembra essere

distribuito omogeneamente sulla superficie della silice, anche se, almeno in parte, potrebbe occludere alcuni dei pori.

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 10.4 è osservabile un confronto tra lo spettro FTIR del riferimento (SBA-15) e lo spettro del campione SBA-15_ibu. Per quanto riguarda la zona dei silanoli, nel campione caricato con ibuprofene, è possibile osservare un'evidente diminuzione del picco caratteristico dei silanoli isolati e la comparsa di una banda larga relativa ai silanoli impegnati per legame a idrogeno. Questo è indice del fatto che il principio attivo sta interagendo con la superficie della silice tramite la formazione di legami idrogeno con i silanoli. Inoltre, in tale zona, è possibile vedere una banda a 3650 cm^{-1} indice di un legame a idrogeno tra i silanoli e il fenile della molecola dell'ibuprofene e una componente sotto 3500 cm^{-1} dovuta a silanoli interagenti col carbonile della molecola. Nello spettro del campione SBA-15_ibu è possibile osservare diverse bande relative al principio attivo. Le bande tra 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} sono caratteristiche dello *stretching* C-H della molecola [81]. Il picco a 1711 cm^{-1} invece, è relativo allo *stretching* del carbonile C=O del gruppo carbossilico; è interessante notare che questa frequenza è più bassa rispetto a quella relativa all'ibuprofene puro, coerentemente col legame idrogeno tra il carbonile e i silanoli [72]. Sotto i 1600 cm^{-1} sono presenti invece dei modi di *bending*.

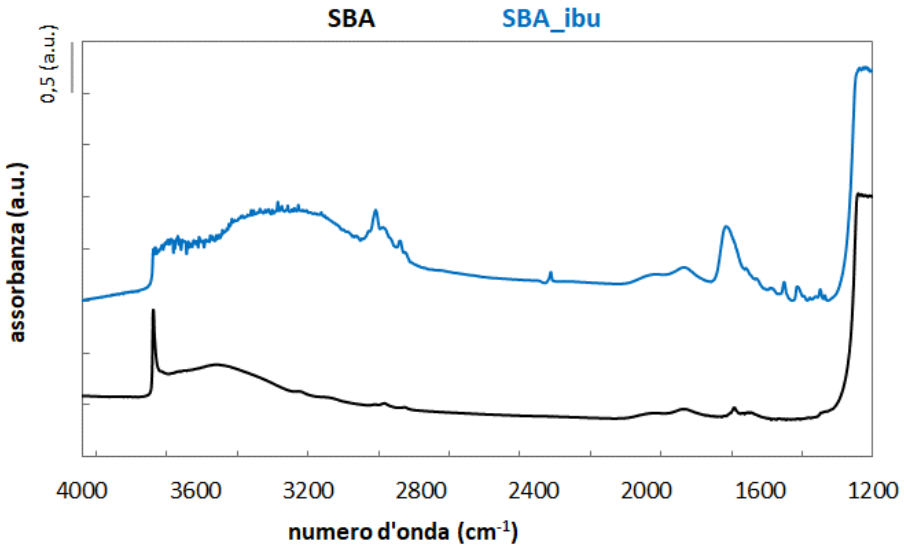

Figura 10.4 *Confronto tra lo spettro FTIR della silice SBA-15 e del campione SBA-15_ibu.*

10.2. Caratterizzazione del campione SBA-15_Curc_iwi impregnato con ibuprofene tramite $scCO_2$

Il campione SBA-15_Curc_iwi, contenente curcumina, è stato impregnato con ibuprofene tramite $scCO_2$ secondo la tecnica descritta nel paragrafo 6.2.3. Di seguito verranno riportati i risultati dei test di caratterizzazione del campione contente i due principi attivi così ottenuto. Tale campione verrà indicato con la sigla "SBA-15_Curc_iwi_IBU".

Diffrattometria a raggi X

Lo spettro XRD in figura 10.5 non mostra alcun picco cristallino, indice del fatto che i principi attivi sono entrambi in uno stato amorfo all'interno del carrier. L'impregnazione dell'ibuprofene è stata effettuata circa 4 mesi dopo l'impregnazione della curcumina nella SBA-15, tale invecchiamento ha fatto sì che la curcumina, inizialmente in parte cristallina (figura 7.1), si amorfizzasse durante il tempo, come dimostrato nel lavoro di tesi di Nicolas Mazzeo [5].

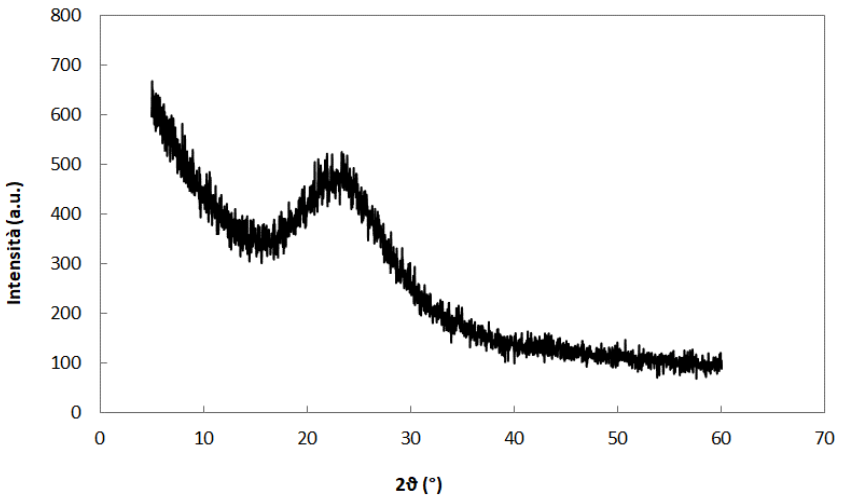

Figura 10.5 *Spettro XRD di SBA-15_Curc_iwi_IBU.*

Adsorbimento di azoto

In figura 10.6 è possibile notare il confronto tra l'isoterma del riferimento contenente soltanto curcumina (SBA-15_Curc_iwi) e l'isoterma del campione contente anche ibuprofene (SBA-15_Curc_iwi_IBU). È possibile notare un cambiamento della forma del cappio di isteresi, indice di una transizione da una porosità cilindrica ordinata ad una meno definita a seguito dell'incorporazione di ibuprofene. Così come osservato nel caso della singola impregnazione di ibuprofene (figura 10.2), non è da escludere una situazione di *pore blocking*.

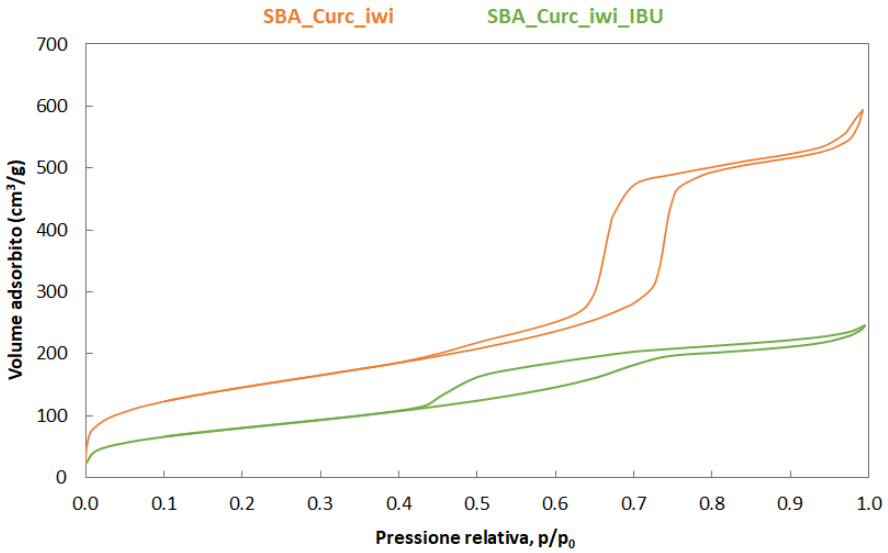

Figura 10.6 *Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU.*

In figura 10.7 invece è riportato il confronto tra le due distribuzioni porose. Dalla curva relativa al campione SBA-15_Curc_iwi_IBU è possibile vedere come la distribuzione si è mantenuta monomodale mentre si nota una diminuzione della dimensione dei pori nel campione.

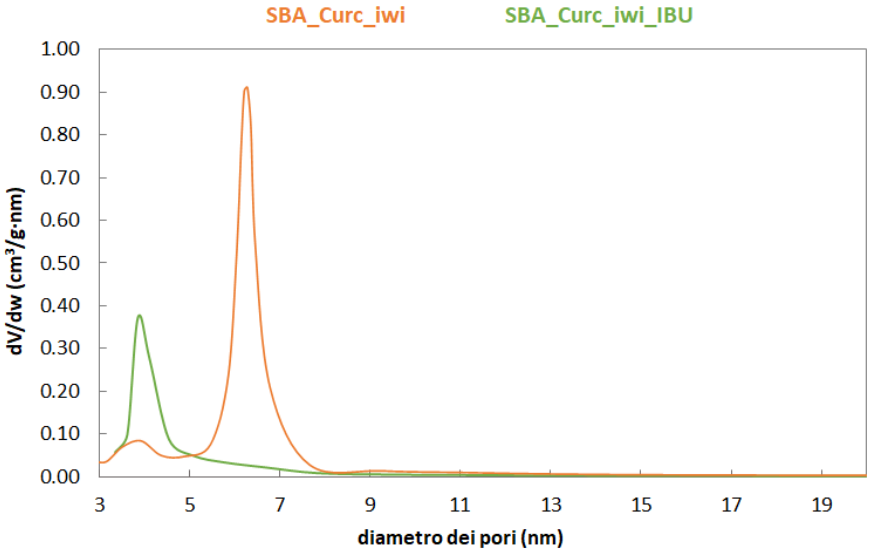

Figura 10.7 *Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU.*

Nella tabella 10.2 è riportato un confronto tra i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione. Tale tabella mostra una diminuzione evidenti di tutti i valori ricavati.

Tabella 10.2 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_iwi_IBU.*

	SBA-15_Curc_iwi	**SBA-15_Curc_iwi_IBU**
Area superficiale specifica (m^2/g)	520	295
Volume poroso (cm^3/g)	0,82	0,37
Diametro dei pori (nm)	6,3	3,8

Concludendo, i risultati di tale analisi mostrano come una quantità significativa di ibuprofene sia stata incorporata sul supporto, nonostante esso fosse già caricato con un primo farmaco. L'ibuprofene potrebbe, almeno in parte, occludere alcuni dei pori.

Analisi termogravimetrica

Dalla curva termogravimetrica osservabile in figura 10.8, è possibile notare una perdita di peso di circa il 3 %, dalla temperatura ambiente ad una temperatura di circa 106°C, associabile ad acqua fisisorbita sulla superficie. Successivamente si nota una diminuzione di peso prima più modesta e poi più ripida di circa il 13 % fino alla temperatura di 800°C. L'1,6 % di questa perdita è dovuto ai silanoli, il 5,0 % alla degradazione della curcumina (derivante dall'analisi fatta sul campione SBA-15_Curc_iwi) e il 6,1 % dalla degradazione dell'ibuprofene.

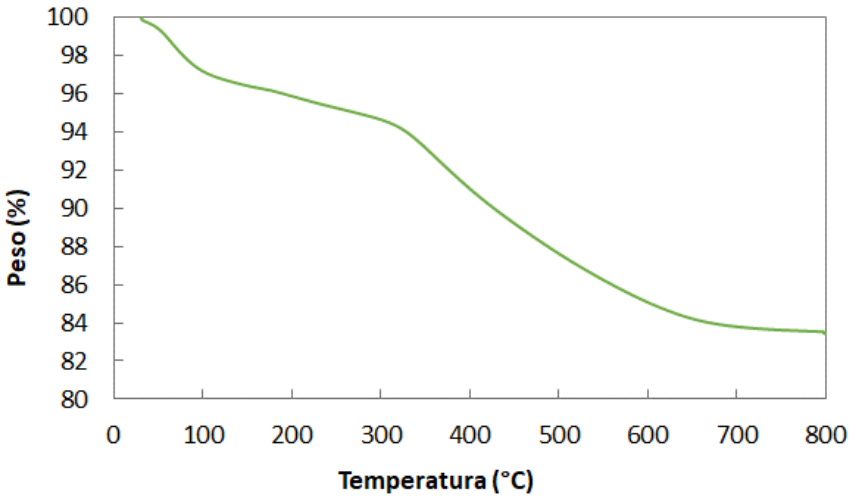

Figura 10.8 *Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU.*

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 10.9 è osservabile un confronto tra lo spettro FTIR del riferimento (SBA-15_Curc_iwi) e lo spettro del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. Per quanto riguarda la zona dei silanoli, nel campione a due principi attivi si ha una diminuzione più evidente del picco caratteristico dei silanoli isolati e la comparsa di una banda larga dovuta ai silanoli impegnati per legame idrogeno. Questo è indice del fatto che entrambi i farmaci stanno interagendo con la superficie della silice tramite la formazione di legami idrogeno. Inoltre, in tale zona, è

possibile vedere una banda a 3650 cm^{-1} indice di un legame a idrogeno tra i silanoli e il fenile della molecola dell'ibuprofene.

Per quanto riguarda invece le bande relative alla curcumina e all'ibuprofene, esse sono ben visibili dallo spettro del campione e facilmente comparabili con gli spettri in figura 7.5 e 10.4. Inoltre non vi è stata alcuna traslazione dei picchi, indice del fatto che le due molecole probabilmente non stiano interagendo tra di loro, ma solo singolarmente con la silice.

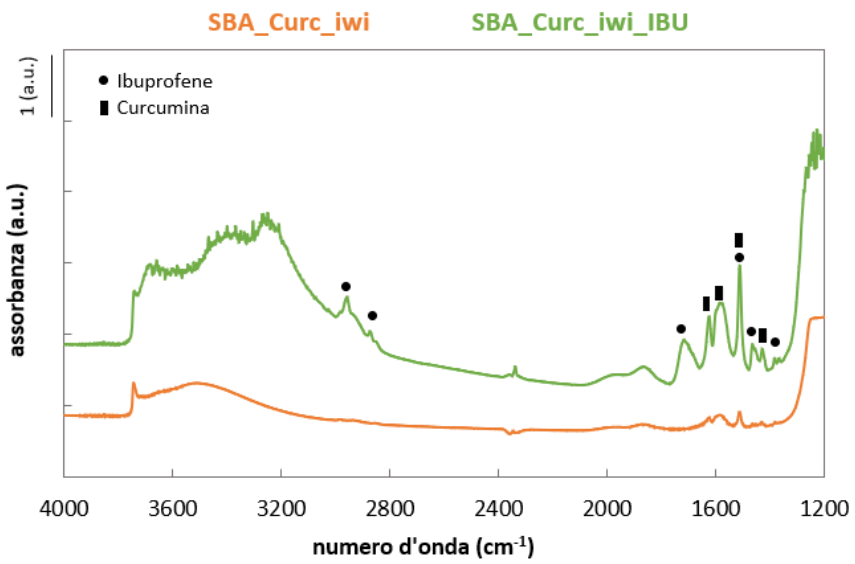

Figura 10.9 *Confronto tra lo spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU.*

Infine, è stata fatta un'ulteriore analisi FTIR sul campione SBA-15_Curc_iwi_IBU, diluendo il campione con KBr (50 wt. %), al fine di osservare al meglio la zona dei silanoli come mostrato in figura 10.10.

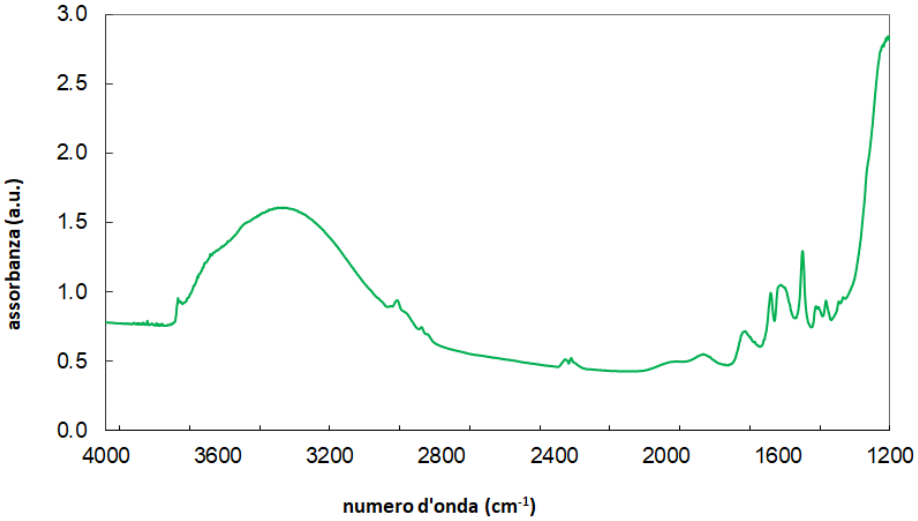

Figura 10.10 *Spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU con KBr.*

Lo spettro evidenzia la presenza di una banda molto intensa e strutturata tra 3700 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} dovuta all'interazione dei silanoli della silice con le molecole. Inoltre, si osserva come le bande relative ai due principi attivi si siano mantenute alle medesime lunghezze d'onda, diminuendo però di intensità.

Dati i risultati, è possibile affermare come sia stato possibile incorporare ibuprofene, tramite $scCO_2$, all'interno del supporto già caricato con curcumina. L'ibuprofene sembra interagire con la superficie della silice attraverso legami a idrogeno con i silanoli. Inoltre i due farmaci sembrano non interagire tra di loro, ma solo con la superficie del supporto. I risultati, hanno inoltre mostrato come sia la curcumina, che l'ibuprofene, si trovino in uno stato amorfo all'interno del carrier.

10.3. Caratterizzazione del campione SBA-15_Curc_rota impregnato con ibuprofene tramite $scCO_2$

Il campione SBA-15_Curc_rota è stato impregnato con ibuprofene tramite $scCO_2$ secondo la tecnica descritta nel paragrafo 6.2.3. Di seguito verranno descritti i risultati ottenuti tramite questo metodo.

Diffrattometria a raggi X

Lo spettro in figura 10.11 non mostra alcun picco caratteristico, indice del fatto che i principi attivi sono entrambi in uno stato amorfo all'interno del carrier.

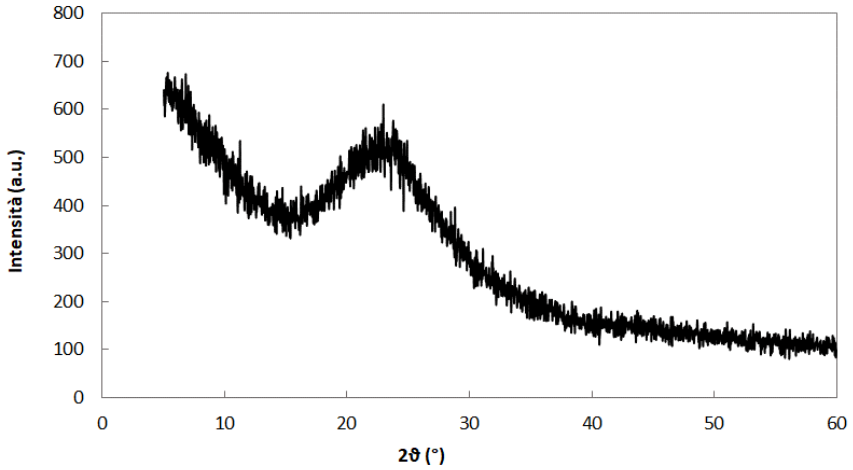

Figura 10.11 *Spettro XRD di SBA-15_Curc_rota_IBU.*

Adsorbimento di azoto

In figura 10.12 è possibile notare il confronto tra l'isoterma del campione contenente solo curcumina (SBA-15_Curc_rota) e l'isoterma del campione contenente due principi attivi (SBA-15_Curc_rota_IBU). Si osserva un cambiamento della forma del cappio di isteresi, conseguenza del passaggio da una porosità cilindrica e ordinata ad una meno definita. Anche in questo caso, non si esclude un parziale *pore blocking.*

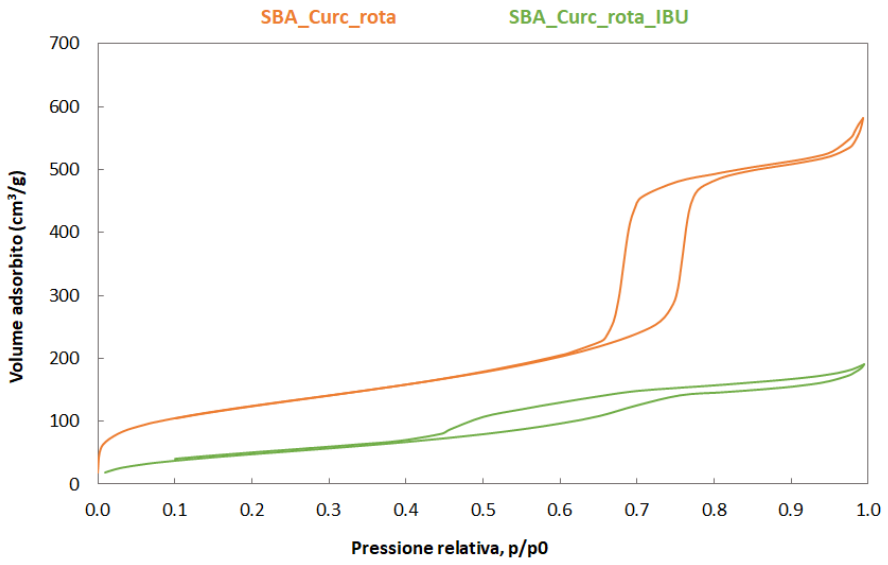

Figura 10.12 *Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_rota e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU.*

In figura 10.13 invece vi è il confronto tra le due distribuzioni porose. Il campione SBA-15_Curc_rota_IBU presenta una distribuzione dei pori monomodale, ma con un diametro dei pori inferiore a quello del materiale di riferimento contenente soltanto curcumina.

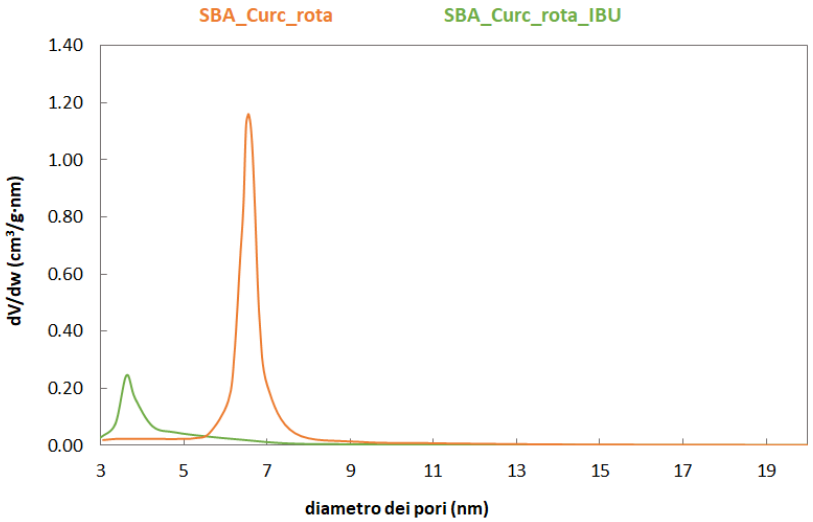

Figura 10.13 *Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_rota e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU.*

Nella tabella 10.3 è riportato un confronto tra i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione. A seguito della seconda impregnazione è possibile notare una diminuzione consistente di tutti i valori, a conferma che l'ibuprofene è stato incorporato efficacemente.

Tabella 10.3 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15_Curc_rota e SBA-15_Curc_rota_IBU.*

	SBA-15_Curc_rota	**SBA-15_Curc_rota_IBU**
Area superficiale specifica (m^2/g)	445	190
Volume poroso (cm^3/g)	0,87	0,27
Diametro dei pori (nm)	6,6	3,6

Analisi termogravimetrica

Dalla curva termogravimetrica osservabile in figura 10.14, è possibile notare una diminuzione di peso prima più modesta e poi più ripida di circa il 18 % fino alla temperatura di 800°C. L'1,6 % di questa perdita è dovuto ai silanoli, il 6 % alla degradazione curcumina (derivante dall'analisi fatta sul campione SBA-15_Curc_rota) e il 10 % alla degradazione dell'ibuprofene.

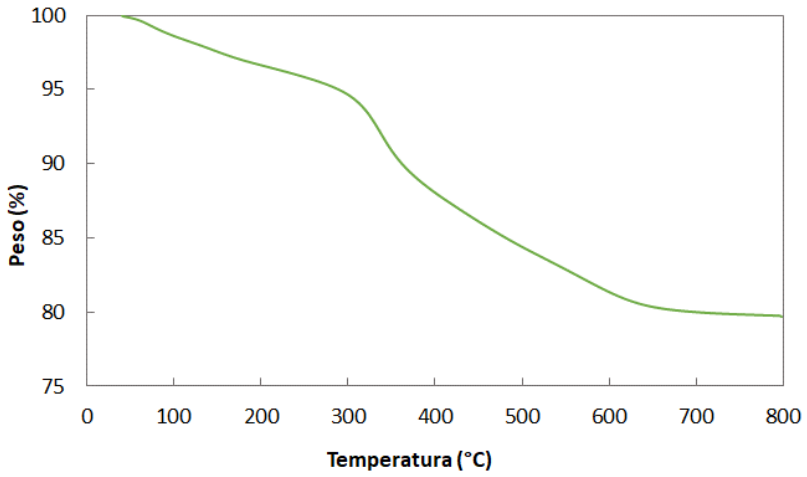

Figura 10.14 *Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_rota_IBU.*

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 10.15 è osservabile un confronto tra lo spettro FTIR del riferimento (SBA-15_Curc_rota) e lo spettro del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. Nel campione contenente due principi attivi si osserva una diminuzione evidente del picco caratteristico dei silanoli isolati e la comparsa di una banda larga relativa ai silanoli interagenti. Come osservato per il campione SBA-15_Curc_iwi_IBU, anche in questo caso entrambi i farmaci interagiscono separatamente con la superficie della silice tramite la formazione di legami a idrogeno con i silanoli. Inoltre, in tale zona, è possibile vedere una banda a 3650 cm^{-1} indice di un legame a idrogeno tra i silanoli e il fenile della molecola dell'ibuprofene.

Per quanto riguarda invece le bande relative alla curcumina e all'ibuprofene, esse sono ben visibili dallo spettro del campione e facilmente comparabili con gli spettri in figura 8.7 e 10.4. Inoltre non vi è stata alcuna traslazione dei picchi, indice del fatto che le due molecole probabilmente non stiano interagendo tra di loro, ma solo con la silice.

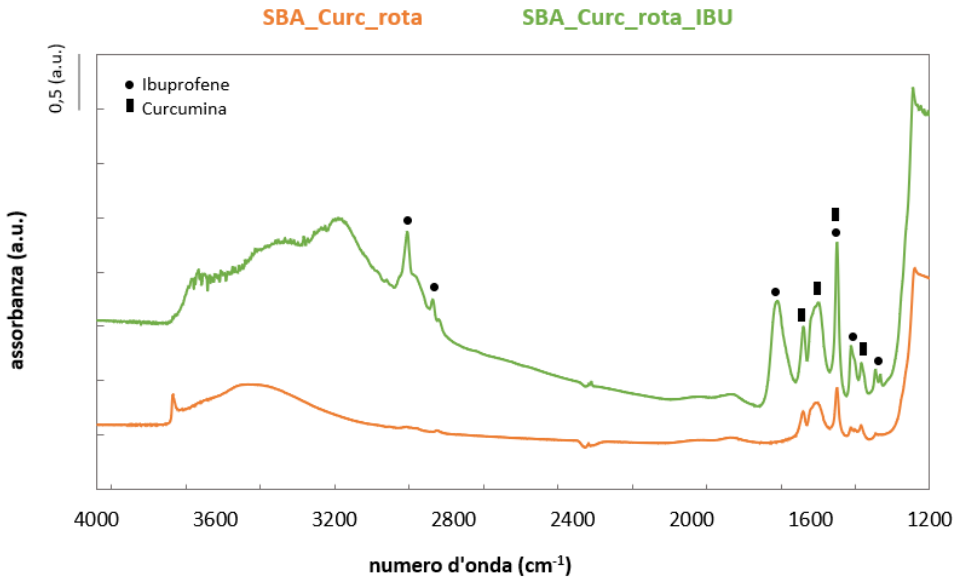

Figura 10.15 *Confronto tra lo spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_rota e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU.*

Anche in questo caso, come col campione SBA-15_Curc_iwi_IBU, è stata fatta un'ulteriore analisi FTIR, diluendo il campione con KBr (50 wt. %), in modo da poter osservare la zona dei silanoli. I risultati ottenuti portano a conclusioni comparabili a quelle riportate per il campione SBA-15_Curc_iwi_IBU, ossia: una buona interazione tra i due principi attivi e la superficie della silice e bande relative ai farmaci molto meno intense ma uguali in numero d'onda se comparate col campione SBA-15_Curc_rota_IBU non diluito con KBr.

I risultati ottenuti evidenziano come sia stato possibile incorporare una quantità significativa di ibuprofene nel campione SBA-15_Curc_rota. L'ibuprofene si trova in forma amorfa all'interno del carrier e, sembra essere distribuito omogeneamente sulla superficie della silice. Non è da escludere comunque una situazione di parziale *pore blocking*.

10.4. Confronto tra il campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e il campione SBA-15_Curc_rota_IBU

Diffrattometria a raggi X

Dagli spettri riportati in figura 10.5 e 10.11 è possibile notare come in entrambi i campioni, i due principi attivi siano amorfi all'interno del supporto.

Adsorbimento di azoto

Le figure 10.16 e 10.17, mostrano rispettivamente il confronto delle isoterme di adsorbimento e delle distribuzioni porose tra i campioni SBA-15_Curc_iwi_IBU e SBA-15_Curc_rota_IBU.

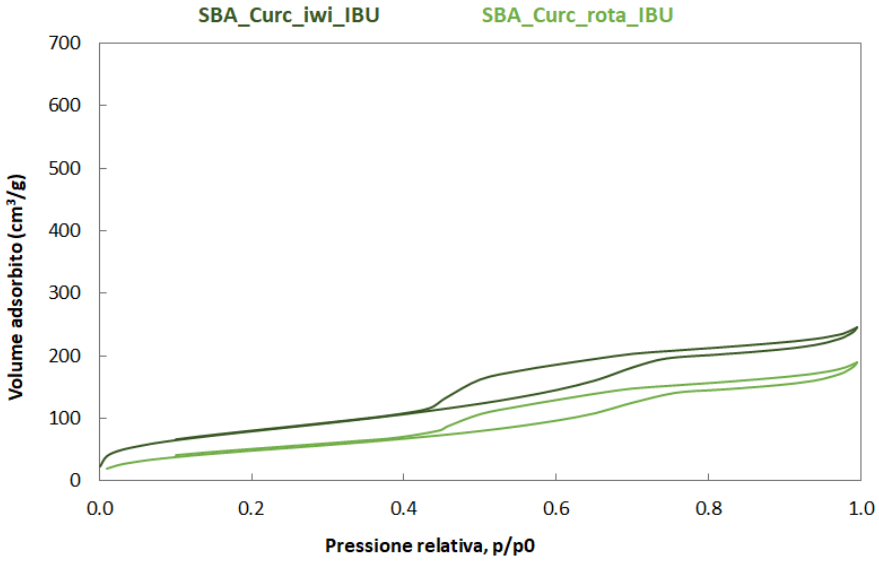

Figura 10.16 *Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU.*

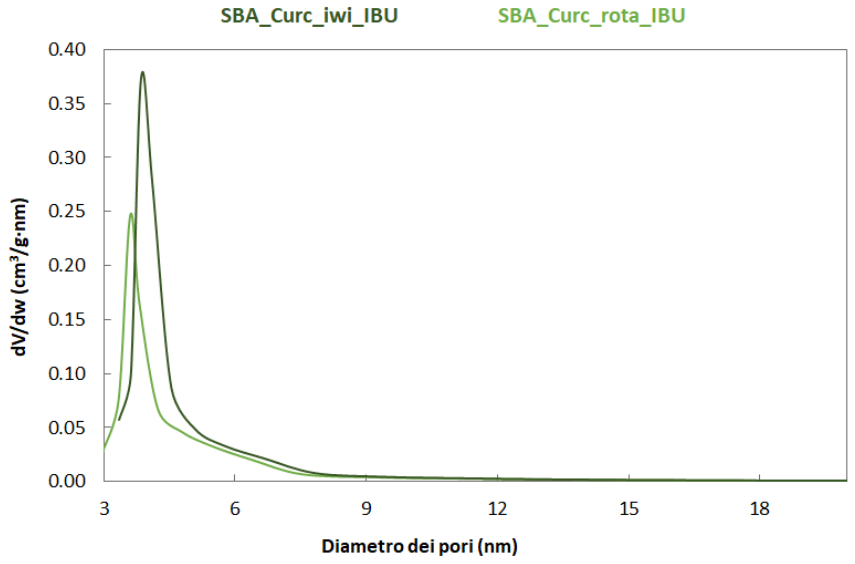

Figura 10.17 *Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU.*

Dal confronto tra le isoterme di adsorbimento è possibile osservare come entrambe le curve abbiano la stessa forma del cappio di isteresi. Per quanto riguarda invece il confronto delle distribuzioni porose, è possibile notare che sono entrambe distribuzioni monomodali.

In tabella 10.4 sono riportati i valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto per i campioni contenenti un solo principio attivo e i campioni contenenti due principi attivi ottenuti mediante due tecniche di impregnazione differenti: IWI e rotavapor. Nel capitolo 9 è già stato messo in evidenza come nel campione SBA-15_Curc_rota, dopo l'impregnazione della curcumina, l'area superficiale specifica sia diminuita maggiormente, rispetto al campione SBA-15_Curc_iwi. Anche in questo caso, dopo l'impregnazione dell'ibuprofene, la diminuzione maggiore di superficie specifica è stata riscontrata nel campione SBA-15_Curc_rota_IBU. In particolare si ha una diminuzione del 58 % nel campione SBA-15_Curc_rota_IBU e una diminuzione del 43 % nel campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. La discriminante sembra essere quindi la tecnica utilizzata per incorporare la curcumina nel supporto. Con l'utilizzo del rotavapor infatti, si riesce ad avere una distribuzione più omogenea delle molecole sulla superficie del carrier. Inoltre i dati mostrati dall'analisi termogravimetrica testimoniano una quantità di ibuprofene maggiore nel campione SBA-15_Curc_rota rispetto al campione SBA-15_Curc_iwi, sebbene quest'ultimo sia caratterizzato da una percentuale in massa minore di curcumina e da una superficie specifica più elevata. L'utilizzo del rotavapor si è dimostrato quindi più efficiente non solo nell'incorporazione di un unico farmaco, ma anche in vista di una doppia impregnazione.

Tabella 10.4 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni con unica e doppia incorporazione.*

	Incorporazione sola curcumina		**Doppia incorporazione**	
	SBA_Curc_iwi	**SBA_Curc_rota**	**SBA_Curc_iwi_IBU**	**SBA_Curc_rota_IBU**
Area superficiale specifica (m^2/g)	520	445	295	190
Volume poroso (cm^3/g)	0,82	0,87	0,37	0,27
Diametro dei pori (nm)	6,3	6,6	3,8	3,6

Analisi termogravimetrica

Dal confronto tra le figure 10.8 e 10.14 è possibile dimostrare come la quantità di ibuprofene incorporata sia differente nei campioni SBA-15_Curc_iwi_IBU e SBA-15_Curc_rota_IBU. Nel primo caso l'ibuprofene incorporato è pari al 6 wt. %, nel secondo caso invece la quantità incorporata è circa pari al 10 wt. %.

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Osservando gli spettri in figura 10.18 è possibile notare come le bande relative alla curcumina e all'ibuprofene, siano alle medesime lunghezze d'onda in entrambi i campioni. Nel caso del campione SBA-15_Curc_rota_IBU, l'intensità relativa di tali picchi è però più elevata, indice di una maggiore quantità di principio attivo all'interno del supporto.

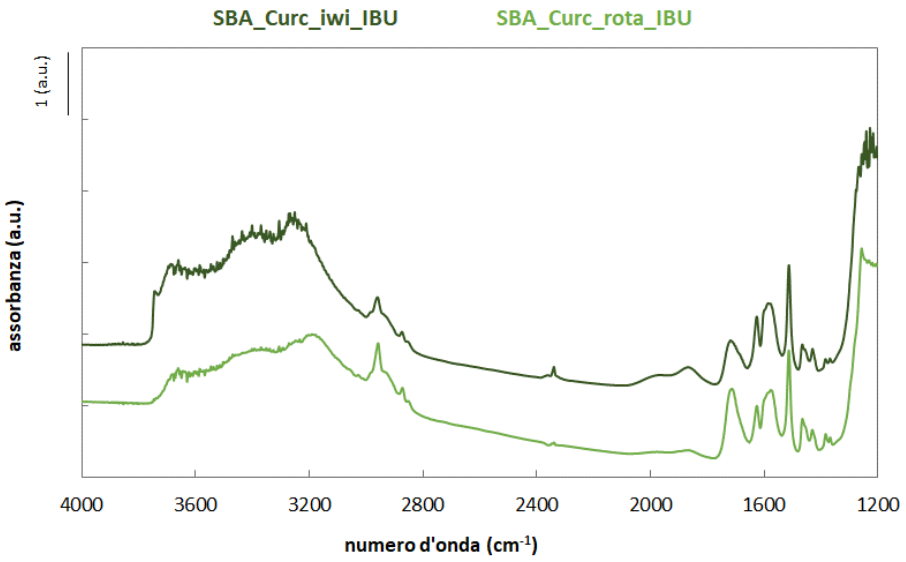

Figura 10.18 *Confronto tra lo spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU.*

Dai risultati analizzati in questo paragrafo è possibile dunque affermare come sia stato possibile effettuare una doppia impregnazione su entrambi i supporti contenenti curcumina. Il campione SBA-15_Curc_rota_IBU, però, ha permesso il *loading* di una maggiore quantità di ibuprofene rispetto al campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. Ciò è dovuto probabilmente al fatto che la curcumina incorporata tramite rotavapor è distribuita in maniera più omogenea e induce quindi meno *pore blocking*, permettendo all'ibuprofene di diffondere all'interno dei mesopori della silice.

11. RILASCIO DELLA CURCUMINA

Nella fase finale del presente lavoro di tesi, è stata valutata la cinetica di rilascio della curcumina in una soluzione modello di H_2O/EtOH [82] dai campioni: SBA-15_Curc_iwi, SBA-15_Curc_rota, SBA-15_Curc_iwi_IBU e SBA-15_Curc_rota_IBU.

Prima di poter eseguire i test di rilascio, è necessario costruire una retta di taratura al fine di associare l'assorbimento UV/Vis della soluzione utilizzata, ad una concentrazione nota di farmaco. Per poter costruire tale retta è necessario preparare una soluzione madre di curcumina nella soluzione scelta per il rilascio (nel presente caso una soluzione di H_2O/EtOH). La concentrazione della soluzione deve essere sufficientemente elevata ma non si deve superare il limite di solubilità del farmaco. La concentrazione viene espressa in *ppm* secondo l'equazione:

$$[curcumina] = \frac{mg_{curcumina}}{kg_{soluzione}}$$

In seguito, vengono preparate le soluzioni figlie, prelevando dalla soluzione madre delle aliquote e portando a volume. È possibile utilizzare la seguente equazione per calcolare i ml di soluzione madre da prelevare:

$$V_{madre} = \frac{[curcumina]_{figlia} \cdot V_{figlia}}{[curcumina]_{madre}}$$

Per ogni soluzione figlia, in questo lavoro di tesi, sono state eseguite tre analisi spettroscopiche UV/Vis ed è stata fatta una media. Il risultato di tale media corrisponderà ad un punto nel grafico "assorbanza vs concentrazione". I punti ottenuti verranno infine interpolati linearmente imponendo un'intercetta nulla.

Modalità di preparazione. Per costruire la retta di taratura è stata preparata una soluzione madre di curcumina in H_2O/EtOH, considerando un rapporto in volume di H_2O/EtOH pari a 75:25. Sono stati disciolti 12 mg di curcumina in 100 ml di soluzione di H_2O/EtOH, facendo disciogliere la curcumina dapprima in 19,73 g di etanolo e aggiungendo in seguito 75 g di H_2O, data la scarsa solubilità della curcumina in H_2O. E' stata ottenuta perciò una soluzione madre con concentrazione pari a 126,7 ppm. In seguito, sono state prelevate delle aliquote dalla soluzione madre, al fine di ottenere le soluzioni figlie e sono state portate a peso con una soluzione di H_2O/EtOH. Nella tabella 11.1 è possibile osservare i valori delle concentrazioni delle figlie ed i relativi volumi di soluzione madre prelevati per ottenerle.

Tabella 11.1 *Taratura della curcumina in H_2O/EtOH.*

Volume madre (ml)	Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[figlia]$_{desiderata}$ (ppm)	[figlia]$_{reale}$ (ppm)
0,4	0,42	47,37	1	1,11
0,4	0,37	23,68	2	1,95
1,4	1,31	23,68	7	6,99
2	1,96	23,68	10	10,49
4	3,81	23,69	20	20,37

In figura 11.1 è rappresentata la retta di taratura ottenuta.

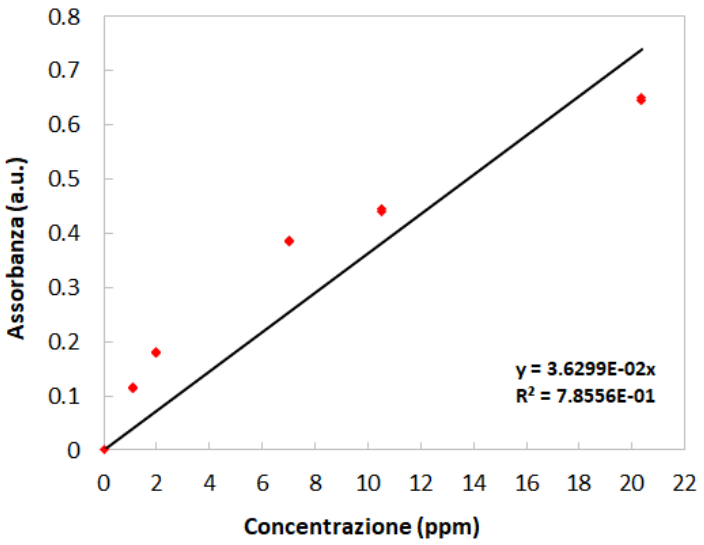

Figura 11.1 *Retta di taratura di curcumina in H_2O/EtOH.*

Il coefficiente R^2 è l'indice della bontà dell'interpolazione lineare e nel presente caso è pari a 0,78556. A causa del basso coefficiente di correlazione, tale retta di taratura non è sufficiente a ottenere risultati attendibili sulla quantità di curcumina rilasciata e sulla cinetica di rilascio. Perciò si è deciso di utilizzare una retta di taratura formata soltanto dai primi tre punti, come osservabile in figura 11.2. Tale retta permette quindi di analizzare in maniera attendibile la parte

iniziale dei test di rilascio e di confrontare le cinetiche di rilascio della curcumina dai diversi campioni.

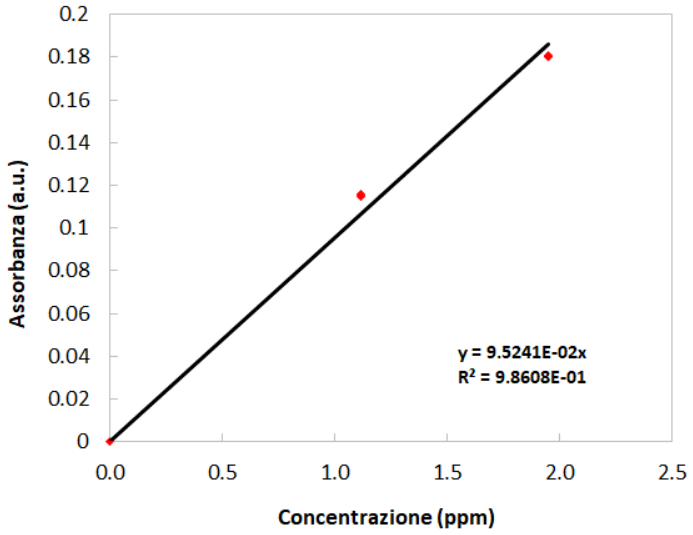

Figura 11.2 *Retta di taratura di curcumina in H_2O/EtOH.*

Per il test di rilascio è stato utilizzato un dissolutore dotato di serbatoio, agitatore meccanico e termometro, come è visibile nella figura 11.3.

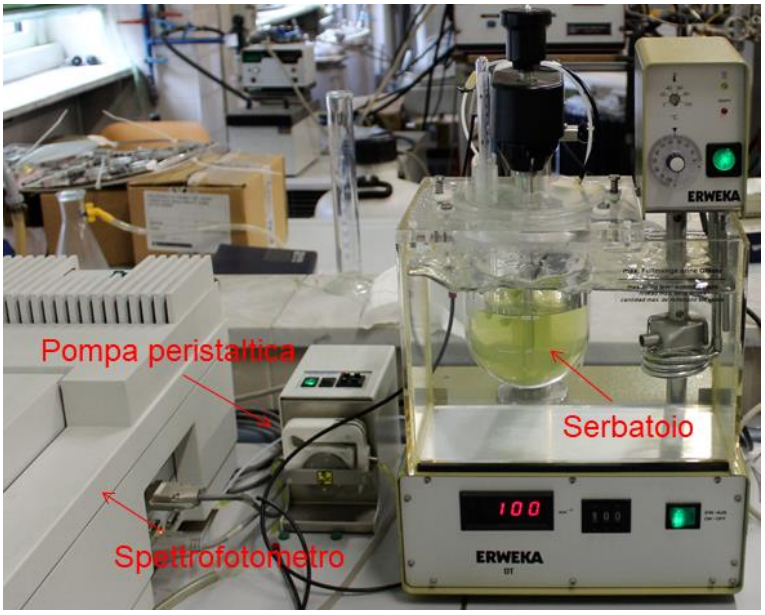

Figura 11.3 *Apparato per il test di rilascio.*

Il serbatoio è immerso in un bagno di acqua termostatata e in esso vengono aggiunti la soluzione e il campione per il rilascio. Per effettuare il test, il serbatoio del dissolutore viene collegato ad uno spettrofotometro tramite un sistema di tubi a circuito chiuso. In tale sistema vi è anche una pompa peristaltica che permette di aspirare la soluzione, farla passare all'interno dello spettrofotometro ed infine reimmetterla nel serbatoio. Ad intervalli regolari di tempo, viene eseguita automaticamente un'analisi spettroscopica alla lunghezza d'onda di maggior assorbimento della curcumina nella soluzione scelta. I parametri di tale test sono:

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

Nel presente lavoro di tesi sono stati effettuati quattro rilasci di curcumina dai campioni: SBA-15_Curc_iwi, SBA-15_Curc_rota, SBA-15_Curc_iwi_IBU e SBA-15_Curc_rota_IBU. Per tutti e quattro i rilasci, l'assorbanza della soluzione è stata misurata alla lunghezza d'onda λ= 425 nm. È stato possibile valutare il rilascio di curcumina solo nei primi minuti di tale prova, a causa del problema relativo alla retta di taratura.

In figura 11.4 è possibile osservare il confronto tra i rilasci di curcumina dai campioni sopra citati. È evidente come la curcumina sia stata rilasciata più lentamente dai campioni contenenti due principi attivi. Il rilascio più lento è dovuto alla parziale occlusione dei pori da parte dell'ibuprofene, occlusione evidenziata dalla misura di adsorbimento di azoto. La curcumina può quindi diffondere dall'interno dei pori alla soluzione di rilascio solo in seguito all'apertura delle porosità occupate dall'ibuprofene.

Inoltre, confrontando il campione SBA-15_Curc_iwi e il campione SBA-15_Curc_rota, si osserva un rilascio di curcumina più lento nel secondo caso. Questo è ben visibile anche nelle curve relative al campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e SBA-15_Curc_rota_IBU. Questo risultato avvalora la tesi che la curcumina sia distribuita in modo più omogeneo sulla superficie della silice utilizzando il rotavapor come tecnica di impregnazione primaria. Inoltre, è ragionevole pensare che la curcumina, essendo distribuita non tanto all'ingresso dei pori quanto piuttosto in profondità nelle porosità, fuoriesca più lentamente da tali campioni.

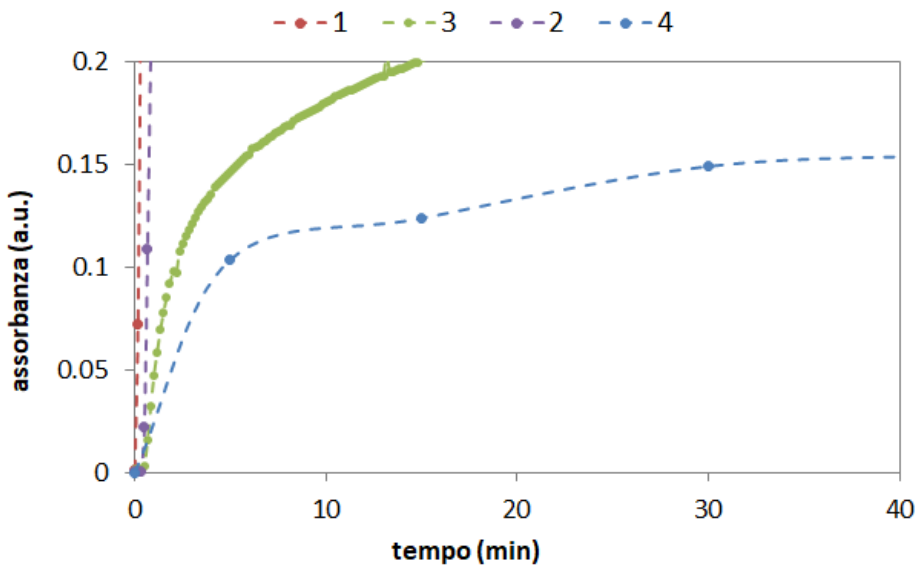

Figura 11.4 *Confronto tra i rilasci di curcumina dal campione SBA-15_Curc_iwi (curva 1), dal campione SBA-15_Curc_rota (curva 2), dal campione SBA-15_Curc_iwi_IBU (curva 3), dal campione SBA-15_Curc_rota_IBU (curva 4).*

Inoltre nei campioni SBA-15_Curc_rota e SBA-15_Curc_iwi_IBU è stato verificato attraverso analisi FTIR se la curcumina e l'ibuprofene fossero stati rilasciati dopo le 20 ore di test. Per

quanto riguarda il campione SBA-15_Curc_rota, dalla figura 11.5 è possibile osservare come non ci sia nessun picco relativo alla curcumina, indice del fatto che questa sia stata rilasciata tutta nella soluzione di H_2O/EtOH.

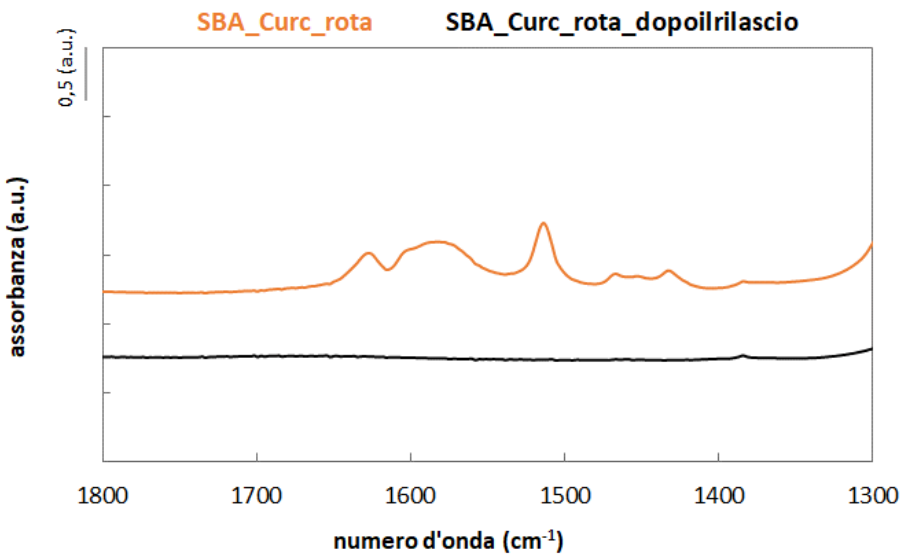

Figura 11.5 *Spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_rota e dello stesso dopo il rilascio.*

Per quanto riguarda invece il campione SBA-15_Curc_iwi_IBU, dalla figura 11.6 è possibile notare come non ci siano né le bande relative alla curcumina, né quelle relative all'ibuprofene, indice del fatto che entrambi i farmaci sono stati rilasciati completamente.

In conclusione, la presenza di un secondo principio attivo inserito in una seconda fase non ha impedito il rilascio della curcumina.

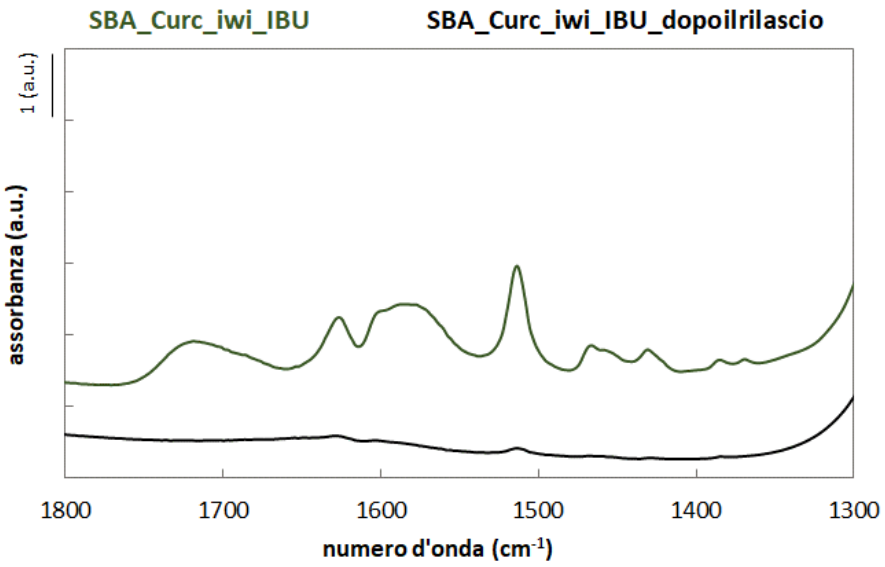

Figura 11.6 *Spettro del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU dopo il rilascio.*

12. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Nel presente lavoro di tesi è stata studiata una silice a mesoporosità ordinata, la SBA-15, come materiale per il rilascio di curcumina.

Nella prima parte del lavoro sperimentale sono stati preparati i campioni contenenti curcumina. A questo scopo, sono stati utilizzati e comparati due metodi di impregnazione: *l'Incipient Wetness Impregnation* (IWI) e l'impregnazione mediante rotavapor.

La seconda parte del lavoro è stata dedicata alla caratterizzazione chimico-fisica dei materiali. Per quanto riguarda il campione impregnato tramite IWI (SBA-15_Curc_iwi), dall'analisi termogravimetrica il contenuto in massa del farmaco è risultato pari al 5 %, inferiore al valore nominale (8 %) calcolato in base alle condizioni di impregnazione. La caratterizzazione mediante XRD ha evidenziato che la curcumina è presente nel materiale, almeno in parte, in forma cristallina. L'analisi FTIR ha fornito evidenze della presenza delle molecole di curcumina nel materiale e della loro interazione con la superficie della silice, attraverso legami a idrogeno che coinvolgono i silanoli. Per quanto riguarda l'impregnazione tramite rotavapor (SBA-15_Curc_rota), è stata mostrata la fattibilità della dispersione di curcumina sulla silice SBA-15. L'analisi termogravimetrica ha fornito un valore di percentuale in massa di curcumina pari al 6 %, di poco superiore al valore misurato per il campione ottenuto tramite IWI. L'analisi XRD non ha evidenziato la presenza di curcumina cristallina nel materiale. I risultati derivanti dall'analisi di adsorbimento di azoto hanno mostrato una diminuzione dell'area superficiale specifica rispetto alla SBA-15 tal quale, a conferma della dispersione delle molecole di curcumina all'interno dei pori. Anche per questo campione, l'analisi FTIR ha confermato la presenza delle molecole di curcumina all'interno dei pori, in interazione con la superficie della silice.

Dopo aver verificato la possibilità di supportare la curcumina nella SBA-15, lo studio è stato esteso a un sistema contenente due principi attivi (in vista di un'azione sinergica dei due farmaci rilasciati dallo stesso supporto). È stato scelto l'ibuprofene, un farmaco modello, come secondo principio attivo, in prospettiva di un'eventuale applicazione topica. Tale principio attivo è stato adsorbito sia nel campione SBA-15_Curc_iwi che nel campione SBA-15_Curc_rota mediante CO_2 supercritica, un solvente non tossico per l'uomo e per l'ambiente. Successivamente, i materiali contenente curcumina e ibuprofene (SBA-15_Curc_iwi_IBU e SBA-15_Curc_rota_IBU) sono stati caratterizzati come i precedenti. Per il campione SBA-

15_Curc_iwi_IBU, la percentuale in massa dell'ibuprofene, misurata mediante analisi TG, è risultata pari al 6,1 %. L'analisi XRD ha mostrato che sia la curcumina che l'ibuprofene sono presenti nel materiale in uno stato amorfo. Le isoterme di adsorbimento di azoto hanno evidenziato una porosità disomogenea e una parziale occlusione dei pori. Infine, la caratterizzazione FTIR ha confermato la presenza di curcumina e ibuprofene all'interno dei pori e in interazione con la superficie della silice attraverso legami a idrogeno con i silanoli. Per quanto riguarda il campione SBA-15_Curc_rota_IBU, l'analisi termogravimetrica ha evidenziato la presenza di una quantità di ibuprofene pari al 10% in massa. Lo spettro XRD ha mostrato che sia la curcumina che l'ibuprofene sono amorfi nel materiale. Anche in questo caso, le isoterme di adsorbimento di azoto hanno evidenziato una porosità disomogenea e una parziale occlusione dei pori. Inoltre la diminuzione significativa dei valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro dei pori, rispetto al campione SBA-15_Curc_rota, è coerente con la presenza di ibuprofene all'interno delle porosità del materiale. Per quanto riguarda l'analisi FTIR, i risultati sono risultati analoghi a quelli del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. L'utilizzo del rotavapor si è dimostrato quindi più efficace sia per l'impregnazione della sola curcumina, che per l'ottenimento del sistema contenente curcumina e ibuprofene.

La parte finale dell'elaborato è stata dedicata allo studio del rilascio di curcumina dai materiali discussi, in una soluzione modello di H_2O/EtOH. Si è deciso di utilizzare una retta di taratura relativa a concentrazioni di curcumina inferiori a 2 ppm, perciò lo studio si è concentrato principalmente sulla parte iniziale dei test di rilascio. I risultati di tali test hanno evidenziato un rilascio di curcumina più lento dai campioni contenenti due principi attivi, rispetto ai sistemi SBA-15_Curc_IWI e SBA-15_Curc_rota. Questo fenomeno è stato imputato alla parziale occlusione dei pori dovuta alla presenza di ibuprofene. Inoltre, confrontando i quattro campioni, è stato osservato un rilascio di curcumina più rapido dai campioni ottenuti tramite IWI rispetto ai campioni ottenuti tramite rotavapor. Questo risultato è tentativamente spiegabile considerando una prevalente distribuzione della curcumina all'imboccatura dei pori della silice impregnata tramite IWI. Inoltre, le analisi FTIR effettuate sui campioni SBA-15_Curc_rota e SBA-15_Curc_iwi_IBU, dopo i test di rilascio, hanno evidenziato che la curcumina è stata rilasciata completamente nella soluzione di H_2O/EtOH.

Partendo da tali risultati, è possibile sviluppare il presente studio ottimizzando i parametri dei vari metodi di incorporazione al fine di introdurre nei supporti una quantità maggiore di farmaco. Nella prospettiva di ottimizzare l'impregnazione tramite rotavapor, è possibile sostituire il metanolo con un solvente come l'etanolo. Inoltre sarebbe utile approfondire gli studi di rilascio in fluidi rappresentativi di situazioni fisiologiche (in particolar modo dell'ambito topico) ed analizzare un tempo di rilascio più lungo.

13. APPENDICE

Il presente lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio di una silice mesoporosa ordinata, la SBA-15, come possibile carrier per curcumina. In letteratura esistono numerosi lavori su tale silice o, in generale, su silici a mesoporosità ordinata, come potenziali sistemi di drug delivery. Sono meno numerosi invece, ma comunque presenti, studi su silici a mesoporosità disordinata [83]. Un esempio di questi è lo studio del gruppo di Kinnari, il quale ha utilizzato due gel di silice amorfa, quali: Syloid AL-1 e Syloid 244, per incorporare itraconazolo, dimostrando una più efficacie dissoluzione del farmaco a pH 1.2 rispetto al farmaco cristallino puro [83]. Limnel et al. hanno invece incorporato indometacina all'interno di una silice a mesoporosità ordinata MCM-41 e all'interno di una Syloid 244 FP EU, comparando tre diverse tecniche di impregnazione e dimostrando una maggiore velocità di rilascio in un tampone sfosfato dalla silice Syloid 244 FP EU [84]. Serpella et al. hanno comparato l'incorporazione di piroxicam in due silici diverse, una SBA-15 (ordinata) e una Syloid (disordinata). In tale lavoro sono stati utilizzati tre metodi di impregnazione: adsorbimento da etanolo, IWI e $scCO_2$ ed è stata dimostrata la maggior efficacia di quest'ultimo metodo [85].

Nel presente lavoro di tesi, benchè lo studio principale riguardi una silice ordinata (SBA-15) è stato scelto di effettuare una ricerca preliminare anche su una silice disordinata, così da valutare l'influenza della morfologia del supporto sull'efficacia dell'impregnazione. In particolare, si è deciso di testare come carrier di curcumina, la silice Syloid® (dell'azienda GRACE), l'unica silice mesoporosa non ordinata di tipo GMP commercializzata.

Le Syloid® sono dei gel di silice amorfa, mesoporosi e micronizzati, caratterizzati da un'elevata purezza. Esempi di queste sono la silice Syloid® FP e la silice Syloid® XDP, le quali, grazie alle loro capacità di adsorbimento, alla taglia dei pori e ad un'elevata area superficiale, favoriscono l'adsorbimento dei principi attivi e un rilascio controllato e consistente di questi ultimi. Tali silici inoltre sono caratterizzate da un'elevata densità che le rende facili da maneggiare e non elettrostatiche [86]. Una rappresentazione delle silici Syloid® è visibile in figura 13.1.

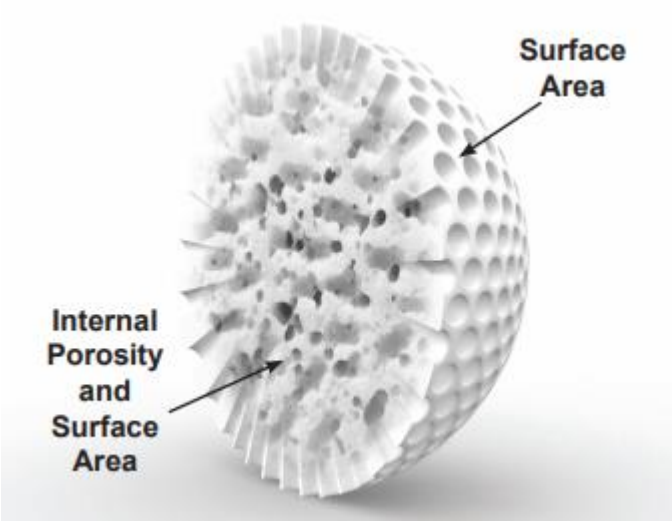

Figura 13.1 *Rappresentazione di una silice Syloid®.*

13.1. Caratterizzazione della silice GRACE impregnata tramite *Incipient Wetness Impregnation*

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata la silice GRACE SP53D-11804, silice appartenente alla classe delle Syloid® XDP. In tale silice è stata incorporata curcumina tramite la tecnica IWI. La modalità di preparazione è la medesima utilizzata con la silice SBA-15 e descritta nel paragrafo 6.2.1, avendo le due silici lo stesso volume poroso. Alla fine del procedimento è stato incorporato un quantitativo teorico di principio attivo pari al 10 wt. %.

Di seguito verranno descritti i risultati di questa impregnazione.

Diffrattometria a raggi X

Lo spettro in figura 13.2 non mostra alcun picco caratteristico, indice del fatto che il principio attivo è in uno stato amorfo all'interno del carrier.

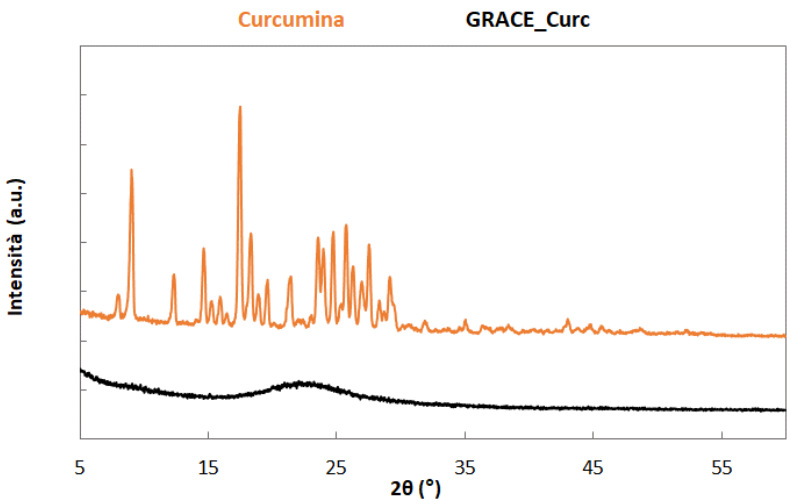

Figura 13.2 *Spettro XRD di GRACE_Curc.*

Adsorbimento di azoto

In figura 13.3 è possibile notare il confronto tra l'isoterma del carrier di riferimento (GRACE) e l'isoterma del campione caricato con curcumina (GRACE_Curc). Le isoterme sono entrambe di tipo IV, non si nota un cambiamento della forma del cappio di isteresi, ma una leggera diminuzione del volume poroso. In particolare il cappio d'isteresi, in entrambe le curve, non presenta una forma comparabile con quelle descritte dalla IUPAC, indice del fatto che i campioni sono caratterizzati da una mesoporosità disordinata.

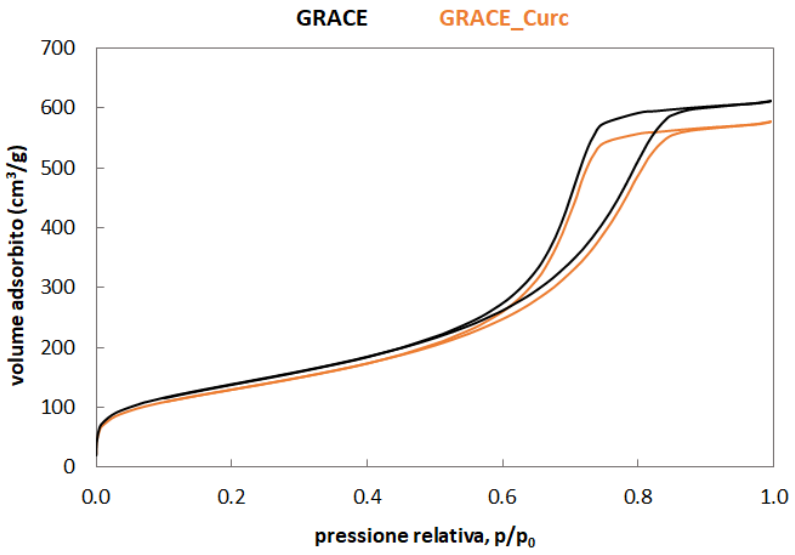

Figura 13.3 *Isoterme di adsorbimento del riferimento GRACE e del campione GRACE_Curc.*

In figura 13.4 invece vi è il confronto tra le due distribuzioni porose, e si può notare come la distribuzione ottenuta incorporando curcumina nella GRACE sia paragonabile a quella del riferimento stesso.

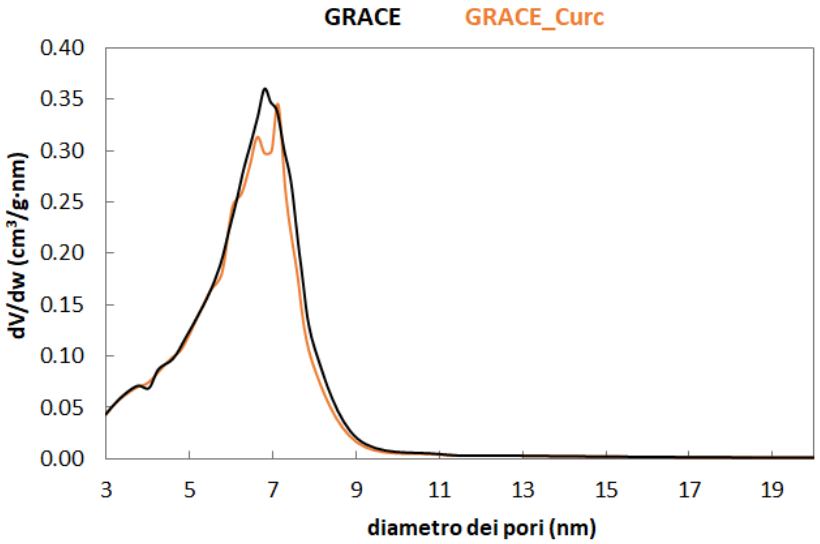

Figura 13.4 *Distribuzioni porose del riferimento GRACE e del campione GRACE_Curc.*

Nella tabella 13.1 è riportato un confronto tra i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione. È osservabile come i valori di superficie specifica e di volume poroso non cambino in modo sostanziale rispetto ai valori del riferimento.

Tabella 13.1 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni GRACE e GRACE_Curc.*

	GRACE	**GRACE_Curc**
Area superficiale specifica (m^2/g)	510	470
Volume poroso (cm^3/g)	0,94	0,88
Diametro dei pori (nm)	6,78	6,78

Analisi termogravimetrica

Dalla curva termogravimetrica osservabile in figura 13.5, è possibile notare dalla temperatura ambiente ad una temperatura di circa 150°C una perdita di peso di circa il 4,5 % associabile ad acqua fisisorbita sulla superficie del campione GRACE_Curc. Successivamente si nota una diminuzione di peso di circa il 3,5 % fino alla temperatura di 800°C. L'1,7 % di questa perdita è dovuto ai silanoli, mentre l'1,8 % alla degradazione della curcumina. Da tale analisi, è quindi possibile concludere come la percentuale in massa di curcumina sia molto più bassa del valore nominale (10 %) e corrisponda all'1,8 %.

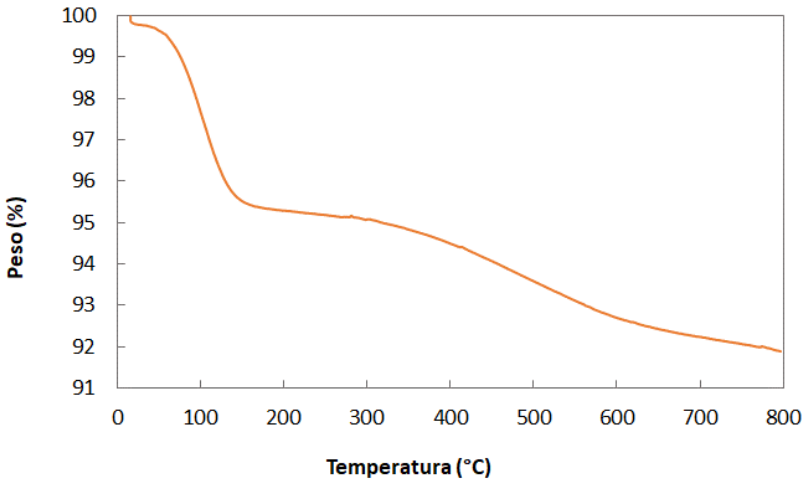

Figura 13.5 *Analisi termogravimetrica del campione GRACE_Curc.*

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 13.6 è osservabile un confronto tra lo spettro FTIR del carrier di riferimento (GRACE) e lo spettro del campione GRACE_Curc. Nello spettro del campione GRACE_Curc è possibile osservare diverse bande relative al principio attivo, benchè questa abbiano un'intensità ridotta. Il picco a 1625 cm^{-1} è caratteristico dello *stretching* C=C e C=O della molecola. Il picco a 1603 cm^{-1} e la spalla a circa 1578 cm^{-1} sono dovuto allo *stretching* C=C degli anelli aromatici, mentre la banda più intensa a 1510 cm^{-1} è caratteristica dello *stretching* C=O e del *bending* di CC=O e CCC [79].

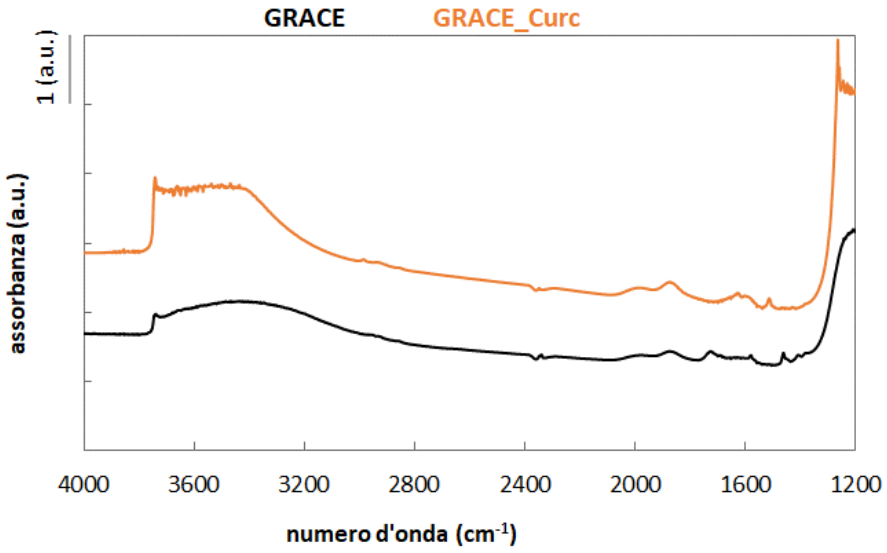

Figura 13.6 *Confronto tra lo spettro FTIR della GRACE e del campione GRACE_Curc.*

I risultati di tali caratterizzazioni, mostrano come l'incorporazione di curcumina all'interno della silice GRACE sia risultata difficoltosa. La quantità di principio attivo incorporata infatti, non è comparabile al valore nominale stimato, bensì molto più bassa.

Perciò, per aumentare la quantità di curcumina all'interno di tale carrier, si è pensato di rendere la silice più idrofoba trattandola termicamente in una muffola. I parametri utilizzati per il trattamento termico sono stati:

- Temperatura: 500°C;
- tempo: 1h;
- rampa di riscaldamento: 5°C/min.

Una volta eseguito il trattamento termico, la GRACE è stata riposta in un essiccatore e di seguito è stata effettuata un'analisi di adsorbimento di azoto e un'analisi FTIR, al fine di capire come fossa cambiata la superficie della silice.

Adsorbimento di azoto

In figura 13.7 è mostrato il confronto tra l'isoterma del carrier di riferimento (GRACE) e l'isoterma della silice trattata termicamente (GRACE_500x1h). Le isoterme sono entrambe di tipo IV e non si nota un cambiamento della forma del cappio di isteresi.

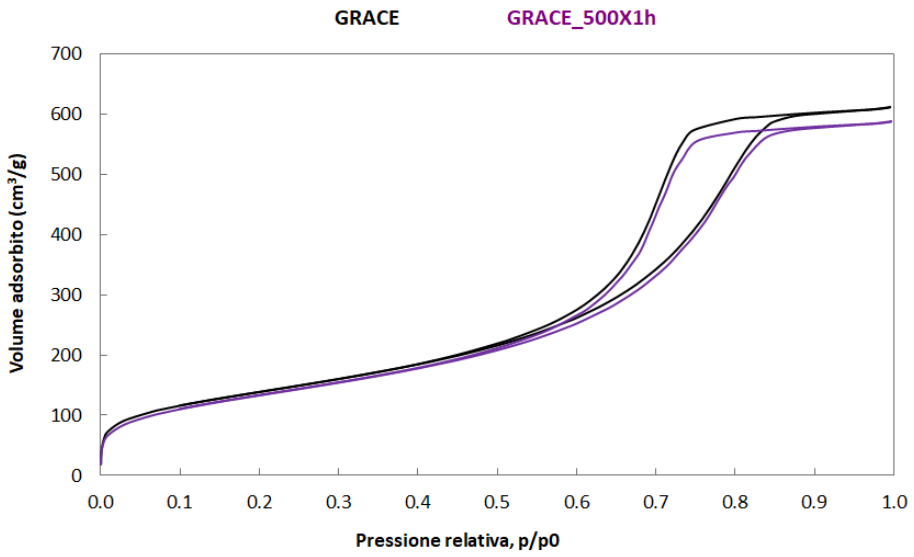

Figura 13.7 *Isoterme di adsorbimento del riferimento GRACE e del campione trattato termicamente.*

Nella tabella 13.2 sono riportati i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione trattato termicamente. Tali valori indicano come non ci sia stato un cambiamento della struttura della silice dopo il trattamento termico.

Tabella 13.2 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni GRACE e GRACE_500x1h.*

	GRACE	**GRACE_500x1h**
Area superficiale specifica (m^2/g)	510	495
Volume poroso (cm^3/g)	0,94	0,90
Diametro dei pori (nm)	6,78	6,78

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 13.8 è osservabile un confronto tra lo spettro FTIR del carrier di riferimento (GRACE) e lo spettro del campione GRACE_500x1h. Nello spettro del campione GRACE_500x1h è possibile osservare un aumento della banda relativa ai silanoli isolati ed una diminuzione invece di quella relativa ai silanoli interagenti. Questo è indice di una maggiore idrofobicità del carrier.

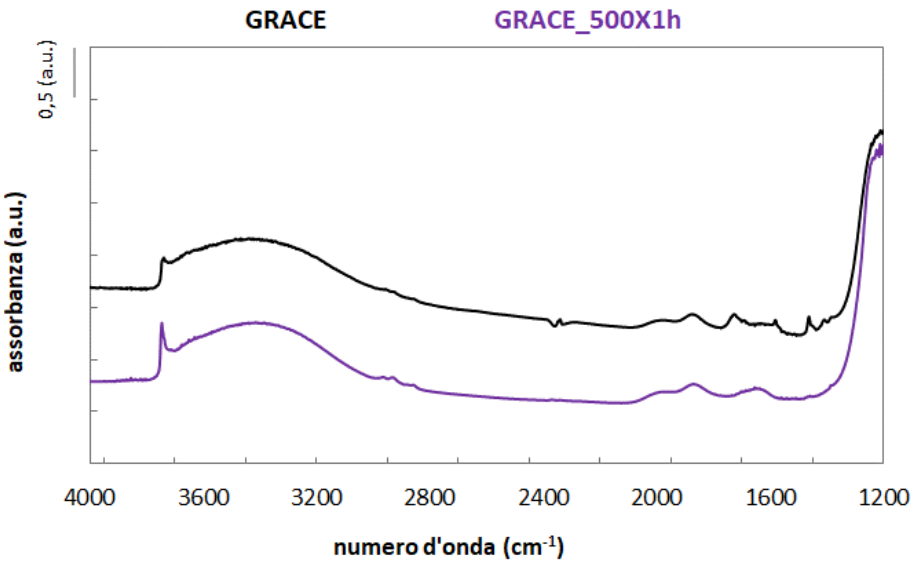

Figura 13.8 *Confronto tra lo spettro FTIR della silice GRACE e del campione GRACE_500X1h.*

Dopo aver reso più idrofobica la superficie della silice GRACE, è stato deciso di riprovare ad adsorbire curcumina all'interno di tale carrier, attraverso la tecnica IWI. La modalità di preparazione è la medesima descritta nel paragrafo 6.2.1. Alla fine del procedimento è stato incorporato un quantitativo teorico di principio attivo pari al 5 wt. %.

Su tale campione sono state effettuate diverse caratterizzazioni descritte di seguito.

Diffrattometria a raggi X

Lo spettro in figura 13.9 mostra un picco a 17.5° relativo alla curcumina cristallina, indice del fatto che il farmaco non è completamente amorfo all'interno della silice (contrariamente a quanto desiderato).

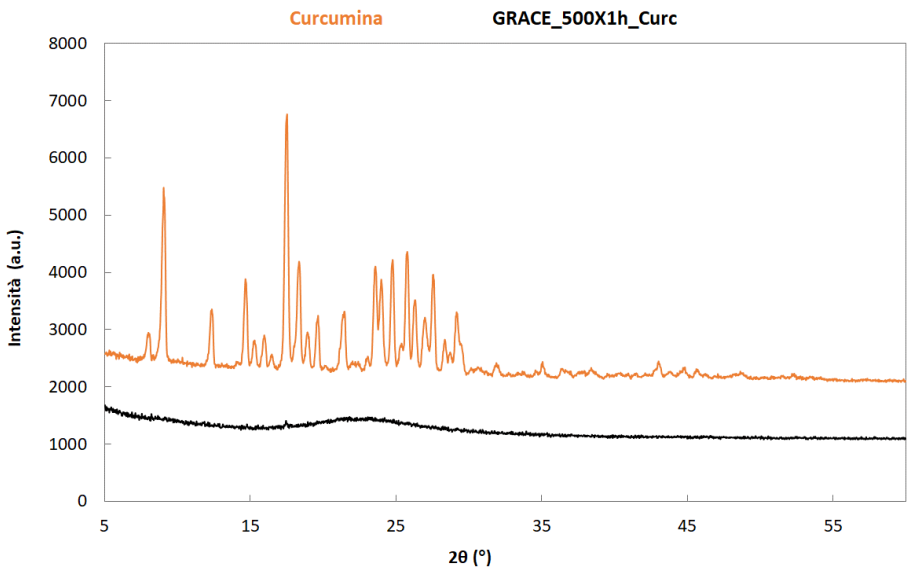

Figura 13.9 *Spettro XRD di GRACE_500x1h_Curc.*

Analisi di adsorbimento di azoto

In figura 13.10 è possibile notare il confronto tra l'isoterma del carrier di riferimento (GRACE_500x1h) e l'isoterma della silice con curcumina (GRACE_500x1h_Curc). Le isoterme sono entrambe di tipo IV e non si nota un cambiamento della forma del cappio di isteresi.

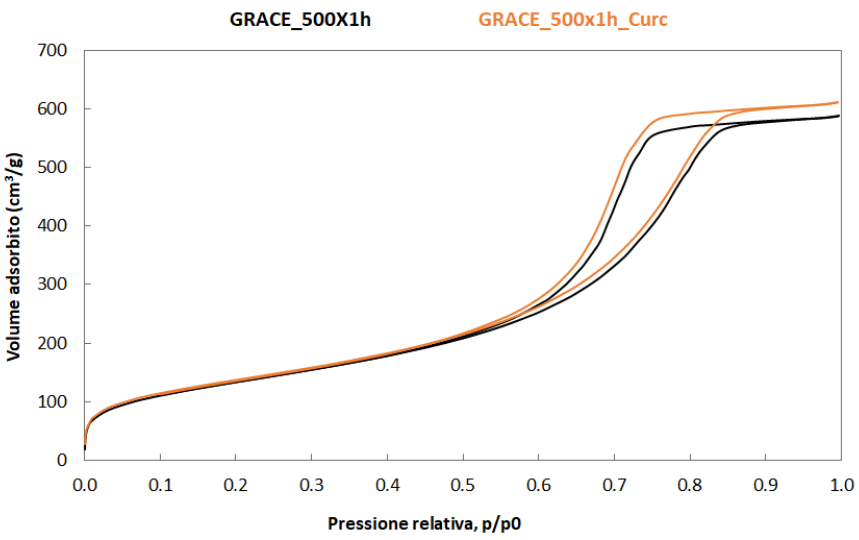

Figura 13.10 *Isoterme di adsorbimento del campione GRACE_500x1h e del campione GRACE_500x1h_Curc.*

Nella tabella 13.3 è riportato un confronto tra i valori di area superficiale specifica, volume poroso e diametro medio dei pori, tra il riferimento e il campione. Tali valori indicano come l'incorporazione di curcumina non sia andata a buon fine, essendo questi uguali al riferimento (GRACE_500x1h).

Tabella 13.3 *Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni GRACE_500x1h e GRACE_500x1h_Curc.*

	GRACE_500x1h	**GRACE_500x1h_Curc**
Area superficiale specifica (m^2/g)	510	500
Volume poroso (cm^3/g)	0,94	0,94
Diametro dei pori (nm)	6,78	6,78

INDICE TABELLE

Tabella 7.1 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15 e SBA-15_Curc_iwi. 42
Tabella 8.1 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15 e SBA-15_Curc_rota. 47
Tabella 9.1 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15, SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_rota. 53
Tabella 10.1 Confronto tra i valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15 e SBA-15_ibu. 57
Tabella 10.2 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_iwi_IBU. 61
Tabella 10.3 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni SBA-15_Curc_rota e SBA-15_Curc_rota_IBU. 67
Tabella 10.4 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni con unica e doppia incorporazione. 72
Tabella 11.1 Taratura della curcumina in H_2O/EtOH. 75
Tabella 13.1 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni GRACE e GRACE_Curc. 88
Tabella 13.2 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni GRACE e GRACE_500x1h. 91
Tabella 13.3 Confronto dei valori ottenuti tramite la tecnica di adsorbimento di azoto nei campioni GRACE_500x1h e GRACE_500x1h_Curc. 94

INDICE FIGURE

Figura 2.1 Parametri che influenzano i drug delivery system [3]. 3
Figura 2.2 Intervallo di concentrazione ottimale del farmaco [4]. 4
Figura 3.1 Sintesi della silice mesoporosa MCM-41 [15]. 7
Figura 3.2 Rappresentazione di diversi tipi di silici mesoporose [14]. 8
Figura 3.3 Rilascio di ibuprofene da MCM-41 [1]. 10
Figura 3.4 Silanoli [18]. 11
Figura 3.5 Schema di un rotavapor [32]. 16
Figura 3.6 Diagramma di fase del biossido di carbonio [38]. 17
Figura 3.7 Apparato del sistema di CO_2 supercritica [40]. 18
Figura 4.1 Numero di pubblicazioni sulla Curcumina [46]. 21
Figura 4.2 Tautomeria cheto-enolica [47]. 22
Figura 4.3 Prodotti di degradazione della curcumina [52]. 23
Figura 5.1 Struttura molecolare dell'ibuprofene [38]. 29
Figura 5.2 Dipendenza della solubilità in soluzioni acquose dell'ibuprofene dal pH [71]. ... 29
Figura 6.1 Composizione cilindro per impregnazione con $scCO_2$. 33
Figura 6.2 Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [75]. 35
Figura 6.3 Classificazione IUPAC dei cappi di isteresi [75]. 36
Figura 6.4 Modi di vibrazione di una molecola [77]. 38
Figura 6.5 Zone dello spettro IR [5]. 38
Figura 6.6 Schema di uno spettrofotometro UV/Vis [78]. 39
Figura 7.1 Spettro XRD di SBA-15_Curc_iwi e curcumina. 40
Figura 7.2 Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_iwi. 41
Figura 7.3 Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_iwi. 41
Figura 7.4 Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_iwi. 43
Figura 7.5 Confronto tra lo spettro FTIR della silice SBA e del campione SBA-15_Curc_iwi. 44
Figura 8.1 Spettro XRD di SBA-15_Curc_rota e curcumina. 45
Figura 8.2 Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_rota. 46

Figura 8.3 Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_rota. 46
Figura 8.4 Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione trattato con metanolo. 48
Figura 8.5 Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione trattato con metanolo. 48
Figura 8.6 Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_rota. 49
Figura 8.7 Confronto tra lo spettro FTIR della silice SBA-15 e del campione SBA-15_Curc_rota. 50
Figura 9.1 Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_rota. 51
Figura 9.2 Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_rota. 52
Figura 9.3 Confronto tra gli spettri FTIR dei campioni SBA-15_Curc_iwi e SBA-15_Curc_rota. 54
Figura 10.1 Spettro XRD di ibuprofene cristallino e del campione SBA-15_ibu. 55
Figura 10.2 Isoterme di adsorbimento del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_ibu. 56
Figura 10.3 Distribuzioni porose del riferimento SBA-15 e del campione SBA-15_ibu. 57
Figura 10.4 Confronto tra lo spettro FTIR della silice SBA-15 e del campione SBA-15_ibu. 58
Figura 10.5 Spettro XRD di SBA-15_Curc_iwi_IBU. 59
Figura 10.6 Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. 60
Figura 10.7 Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. 61
Figura 10.8 Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. 62
Figura 10.9 Confronto tra lo spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_iwi e del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU. 63
Figura 10.10 Spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU con KBr. 64
Figura 10.11 Spettro XRD di SBA-15_Curc_rota_IBU. 65

Figura 10.12 Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_rota e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. 66
Figura 10.13 Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_rota e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. 66
Figura 10.14 Analisi termogravimetrica del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. 68
Figura 10.15 Confronto tra lo spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_rota e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. 69
Figura 10.16 Isoterme di adsorbimento del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. 70
Figura 10.17 Distribuzioni porose del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. 70
Figura 10.18 Confronto tra lo spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU e del campione SBA-15_Curc_rota_IBU. 73
Figura 11.1 Retta di taratura di curcumina in H_2O/EtOH. 75
Figura 11.2 Retta di taratura di curcumina in H_2O/EtOH. 76
Figura 11.3 Apparato per il test di rilascio. 77
Figura 11.4 Confronto tra i rilasci di curcumina dal campione SBA-15_Curc_iwi (curva 1), dal campione SBA-15_Curc_rota (curva 2), dal campione SBA-15_Curc_iwi_IBU (curva 3), dal campione SBA-15_Curc_rota_IBU (curva 4). 78
Figura 11.5 Spettro FTIR del campione SBA-15_Curc_rota e dello stesso dopo il rilascio. . 79
Figura 11.6 Spettro del campione SBA-15_Curc_iwi_IBU dopo il rilascio. 80
Figura 13.1 Rappresentazione di una silice Syloid®. 85
Figura 13.2 Spettro XRD di GRACE_Curc. 86
Figura 13.3 Isoterme di adsorbimento del riferimento GRACE e del campione GRACE_Curc. 87
Figura 13.4 Distribuzioni porose del riferimento GRACE e del campione GRACE_Curc.... 87
Figura 13.5 Analisi termogravimetrica del campione GRACE_Curc. 89
Figura 13.6 Confronto tra lo spettro FTIR della GRACE e del campione GRACE_Curc. 90
Figura 13.7 Isoterme di adsorbimento del riferimento GRACE e del campione trattato termicamente. 91
Figura 13.8 Confronto tra lo spettro FTIR della silice GRACE e del campione GRACE_500X1h. 92

Figura 13.9 Spettro XRD di GRACE_500x1h_Curc. 93
Figura 13.10 Isoterme di adsorbimento del campione GRACE_500x1h e del campione GRACE_500x1h_Curc..... 94

BIBLIOGRAFIA

[1] M. Vallet-Regí, F. Balas, and D. Arcos, "Mesoporous materials for drug delivery," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 40, pp. 7548–7558, 2007, doi: 10.1002/anie.200604488.

[2] A. Benedetti and M. Testi, "Studio Di Sistemi a base silice Per Applicazioni biomediche," *Tesi di laurea*, 2012.

[3] K. Park, "Controlled drug delivery systems: Past forward and future back," *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 3–8, 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.054.

[4] A. Gignone, "Ordered Mesoporous Silica for Drug Delivery in Topical Applications," no. January, p. 137, 2016, doi: 10.6092/polito/porto/2652565.

[5] N. Mazzeo, "Silici mesoporose come carrier di idrocortisone," *Tesi di laurea*, 2018.

[6] S. Wang, "Ordered mesoporous materials for drug delivery," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 117, no. 1–2, pp. 1–9, 2009, doi: 10.1016/j.micromeso.2008.07.002.

[7] M. Vallet-Regí, "Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine," *J. Intern. Med.*, vol. 267, no. 1, pp. 22–43, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02190.x.

[8] C. Argyo, V. Weiss, C. Bräuchle, and T. Bein, "Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery," *Chem. Mater.*, vol. 26, no. 1, pp. 435–451, 2014, doi: 10.1021/cm402592t.

[9] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu, and V. S. Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 11, pp. 1278–1288, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.03.012.

[10] A. Rimola, D. Costa, M. Sodupe, J. F. Lambert, and P. Ugliengo, "Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: Computational modeling and experiments," *Chem. Rev.*, vol. 113, no. 6, pp. 4216–4313, 2013, doi: 10.1021/cr3003054.

[11] E. Juère and F. Kleitz, "On the nanopore confinement of therapeutic drugs into mesoporous silica materials and its implications," *Microporous Mesoporous Mater.*,

vol. 270, no. April, pp. 109–119, 2018, doi: 10.1016/j.micromeso.2018.04.031.

[12] T. Fangqiog, L. Linlin, and C. Dong, "Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery." pp. 1504–1534, 2012.

[13] Z. A. Alothman, "A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials," *Materials (Basel).*, vol. 5, no. 12, pp. 2874–2902, 2012, doi: 10.3390/ma5122874.

[14] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, and S. Garg, "Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–49, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030118.

[15] "Wikizero, MCM-41," 2020. [Online]. Available: https://www.wikizero.com/en/File:MCM-41_Synthesis_English_2014.04.19.svg.

[16] A. L. Doadrio, E. M. B. Sousa, J. C. Doadrio, J. Pérez Pariente, I. Izquierdo-Barba, and M. Vallet-Regí, "Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 97, no. 1, pp. 125–132, 2004, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.03.005.

[17] M. Vallet-Regí, J. C. Doadrio, A. L. Doadrio, I. Izquierdo-Barba, and J. Pérez-Pariente, "Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin," *Solid State Ionics*, vol. 172, no. 1-4 SPEC. ISS., pp. 435–439, 2004, doi: 10.1016/j.ssi.2004.04.036.

[18] R. K. ILER, "The Colloid Chemistry of Silica and Silicates," *Soil Sci.*, vol. 80, no. 1, p. 86, 1955, doi: 10.1097/00010694-195507000-00014.

[19] B. Onida, "Appunti presi a lezione."

[20] K. Thanki, R. P. Gangwal, A. T. Sangamwar, and S. Jain, "Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities," *J. Control. Release*, vol. 170, no. 1, pp. 15–40, 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.020.

[21] G. T. Rengarajan, D. Enke, M. Steinhart, and M. Beiner, "Stabilization of the amorphous state of pharmaceuticals in nanopores," *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 22, pp. 2537–2539, 2008, doi: 10.1039/b804266g.

[22] B. C. Hancock and M. Parks, "What is the true solubility advantage for amorphous

pharmaceuticals?," *Pharm. Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 397–404, 2000, doi: 10.1023/A:1007516718048.

[23] P. Ariano *et al.*, "Interaction of spherical silica nanoparticles with neuronal cells: Size-dependent toxicity and perturbation of calcium homeostasis," *Small*, vol. 7, no. 6, pp. 766–774, 2011, doi: 10.1002/smll.201002287.

[24] S. Giri, B. G. Trewyn, M. P. Stellmaker, and V. S.-Y. Lin, "Stimuli-Responsive Controlled-Release Delivery System Based on Mesoporous Silica Nanorods Capped with Magnetic Nanoparticles.," pp. 5038–5044, 2005.

[25] J. M. Gomez-Vega, A. Hozumi, E. Saiz, A. P. Tomsia, H. Sugimura, and O. Takai, "Bioactive glass-mesoporous silica coatings on Ti6A14V through enameling and triblock-copolymer-templated sol-gel processing," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 56, no. 3, pp. 382–389, 2001, doi: 10.1002/1097-4636(20010905)56:3<382::AID-JBM1107>3.0.CO;2-P.

[26] J. M. Gomez-Vega, H. Sugimura, O. Takai, and A. Hozumi, "Aligned bioactive mesoporous silica coatings for implants," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, no. 10–12, pp. 923–927, 2001, doi: 10.1023/A:1012888410936.

[27] I. Izquierdo-Barba, L. Ruiz-González, J. C. Doadrio, J. M. González-Calbet, and M. Vallet-Regí, "Tissue regeneration: A new property of mesoporous materials," *Solid State Sci.*, vol. 7, no. 8, pp. 983–989, 2005, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2005.04.003.

[28] R. Mellaerts *et al.*, "Physical state of poorly water soluble therapeutic molecules loaded into SBA-15 ordered mesoporous silica carriers: A case study with itraconazole and ibuprofen," *Langmuir*, vol. 24, no. 16, pp. 8651–8659, 2008, doi: 10.1021/la801161g.

[29] T. Lopez, E. Ortiz, R. Alexander-Katz, E. Basaldella, and X. Bokhimi, "Cortisol controlled release by mesoporous silica," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 5, no. 2, pp. 170–177, 2009, doi: 10.1016/j.nano.2008.08.002.

[30] T. Azaïs *et al.*, "Implication of Water Molecules at the Silica-Ibuprofen Interface in Silica-Based Drug Delivery Systems Obtained through Incipient Wetness Impregnation," *J. Phys. Chem. C*, vol. 121, no. 48, pp. 26833–26839, 2017, doi:

10.1021/acs.jpcc.7b08919.

[31] R. J. Ahern, "Application of Mesoporous Silica for the Oral Delivery of Poorly Water – Soluble Drugs," *Tesi di laurea*, 2014.

[32] "Rotovapor_tecniche di laboratorio."

[33] "SlidePlayer." [Online]. Available: https://slideplayer.com/slide/7041103/.

[34] "Chemistry, LibreTexts." [Online]. Available: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary_Materials/Demos%2C_Techniques%2C_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Rotary_Evaporation.

[35] S. Jambhrunkar *et al.*, "Effect of surface functionality of silica nanoparticles on cellular uptake and cytotoxicity," *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 10, pp. 3642–3655, 2014, doi: 10.1021/mp500385n.

[36] F. AA and A. Swiderska-Sroda, "pH-controlled Release System for Curcumin based on Functionalized Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles," *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. 07, no. 01, 2016, doi: 10.4172/2157-7439.1000351.

[37] S. Jambhrunkar, Z. Qu, A. Popat, S. Karmakar, C. Xu, and C. Yu, "Modulating in vitro release and solubility of griseofulvin using functionalized mesoporous silica nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 434, pp. 218–225, 2014, doi: 10.1016/j.jcis.2014.08.019.

[38] R. Cataldo, "Ossido di Zinco nanostrutturato come riserva di Ibuprofene," *Tesi di laurea*, 2017.

[39] P. Girotra, S. K. Singh, and K. Nagpal, "Supercritical fluid technology: A promising approach in pharmaceutical research," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 18, no. 1, pp. 22–38, 2013, doi: 10.3109/10837450.2012.726998.

[40] M. Banchero, L. Manna, S. Ronchetti, P. Campanelli, and A. Ferri, "Supercritical solvent impregnation of piroxicam on PVP at various polymer molecular weights," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 49, no. 2, pp. 271–278, 2009, doi: 10.1016/j.supflu.2009.01.008.

[41] M. Banchero *et al.*, "Supercritical solvent impregnation of different drugs in mesoporous nanostructured zno," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 7, pp. 1–14, 2019, doi:

10.3390/pharmaceutics11070340.

[42] R. J. Ahern, J. P. Hanrahan, J. M. Tobin, K. B. Ryan, and A. M. Crean, "Comparison of fenofibrate-mesoporous silica drug-loading processes for enhanced drug delivery," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 50, no. 3–4, pp. 400–409, 2013, doi: 10.1016/j.ejps.2013.08.026.

[43] A. Patil, U. N. Chirmade, V. Trivedi, D. A. Lamprou, A. Urquhart, and D. Douroumis, "Encapsulation of water insoluble drugs in mesoporous silica nanoparticles using supercritical carbon dioxide," *J. Nanomedicine Nanotechnol.*, vol. 2, no. 3, 2011, doi: 10.4172/2157-7439.1000111.

[44] M. Ni, Q. Q. Xu, and J. Z. Yin, "Preparation of controlled release nanodrug ibuprofen supported on mesoporous silica using supercritical carbon dioxide," *J. Mater. Res.*, vol. 27, no. 22, pp. 2902–2910, 2012, doi: 10.1557/jmr.2012.312.

[45] A. Siviero *et al.*, "Curcumin, a golden spice with a low bioavailability," *J. Herb. Med.*, vol. 5, no. 2, pp. 57–70, 2015, doi: 10.1016/j.hermed.2015.03.001.

[46] S. C. Gupta, S. Patchva, W. Koh, and B. B. Aggarwal, "Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 39, no. 3, pp. 283–299, 2012, doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x.

[47] F. Giudice, "Silici mesostrutturate per il rilascio di curcumina Indice," *Tesi di laurea*, 2019.

[48] K. R. Srinivasan, "a Chromatographic Study of the Curcuminoids in Curcuma Longa, L," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 5, no. 1, pp. 448–457, 1953, doi: 10.1111/j.2042-7158.1953.tb14007.x.

[49] K. I. Priyadarsini, "The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent," *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 20091–20112, 2014, doi: 10.3390/molecules191220091.

[50] G. Grynkiewicz and P. Ślifirski, "Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 59, no. 2, pp. 201–212, 2012, doi: 10.18388/abp.2012_2139.

[51] L. Shen and H. F. Ji, "Theoretical study on physicochemical properties of curcumin," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 67, no. 3–4, pp. 619–623, 2007, doi: 10.1016/j.saa.2006.08.018.

[52] S. Mondal, S. Ghosh, and S. P. Moulik, "Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 158, pp. 212–218, 2016, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004.

[53] R. C. SRIMAL and B. N. DHAWAN, "Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 25, no. 6, pp. 447–452, 1973, doi: 10.1111/j.2042-7158.1973.tb09131.x.

[54] R. K. Maheshwari, A. K. Singh, J. Gaddipati, and R. C. Srimal, "Multiple biological activities of curcumin: A short review," *Life Sci.*, vol. 78, no. 18, pp. 2081–2087, 2006, doi: 10.1016/j.lfs.2005.12.007.

[55] G. S. Sidhu *et al.*, "Enhancement of wound healing by curcumin in animals," *Wound Repair Regen.*, vol. 6, no. 2, pp. 167–177, 1998, doi: 10.1046/j.1524-475X.1998.60211.x.

[56] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, and B. B. Aggarwal, "Bioavailability of curcumin: Problems and promises," *Mol. Pharm.*, vol. 4, no. 6, pp. 807–818, 2007, doi: 10.1021/mp700113r.

[57] V. S. Bollu *et al.*, "Curcumin-loaded silica-based mesoporous materials: Synthesis, characterization and cytotoxic properties against cancer cells," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 63, pp. 393–410, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.03.011.

[58] X. Xu *et al.*, "Facile preparation of pH-sensitive and self-fluorescent mesoporous silica nanoparticles modified with PAMAM dendrimers for label-free imaging and drug delivery," *Chem. Eng. J.*, vol. 266, pp. 171–178, 2015, doi: 10.1016/j.cej.2014.12.075.

[59] N. Li *et al.*, "Curcumin-loaded redox-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted breast cancer therapy," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. sup2, pp. 921–935, 2018, doi: 10.1080/21691401.2018.1473412.

[60] N. S. Elbialy, S. F. Aboushoushah, B. F. Sofi, and A. Noorwali, "Multifunctional

curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles for cancer chemoprevention and therapy," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 291, no. May 2019, 2020, doi: 10.1016/j.micromeso.2019.06.002.

[61] R. Kotcherlakota *et al.*, "Curcumin loaded mesoporous silica: An effective drug delivery system for cancer treatment," *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 448–459, 2016, doi: 10.1039/c5bm00552c.

[62] X. Xu *et al.*, "Self-fluorescent and stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles using a double-role curcumin gatekeeper for drug delivery," *Chem. Eng. J.*, vol. 300, pp. 185–192, 2016, doi: 10.1016/j.cej.2016.04.087.

[63] J. Wang *et al.*, "Rational Design of Multifunctional Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles to Load Curcumin and Enhance Efficacy for Breast Cancer Therapy," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 40, pp. 26511–26523, 2016, doi: 10.1021/acsami.6b08400.

[64] D. Jin *et al.*, "The selective immobilization of curcumin onto the internal surface of mesoporous hollow silica particles by covalent bonding and its controlled release," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 11, pp. 3641–3645, 2011, doi: 10.1039/c0jm03846f.

[65] A. M. Chen *et al.*, "Co-delivery of Doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells," *Small*, vol. 5, no. 23, pp. 2673–2677, 2009, doi: 10.1002/smll.200900621.

[66] F. Leone *et al.*, "Nanostructured zno as multifunctional carrier for a green antibacterial drug delivery system—a feasibility study," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 3, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3390/nano9030407.

[67] P. I. Morgado, S. P. Miguel, I. J. Correia, and A. Aguiar-Ricardo, "Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing," *Carbohydr. Polym.*, vol. 159, pp. 136–145, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.12.029.

[68] J. Irvine, A. Afrose, and N. Islam, "Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 44, no. 2, pp. 173–183, 2018, doi: 10.1080/03639045.2017.1391838.

[69] M. Delle Piane, M. Corno, and P. Ugliengo, "Does dispersion dominate over H-bonds in drug-surface interactions? the case of silica-based materials as excipients and drug-delivery agents," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 9, no. 5, pp. 2404–2415, 2013, doi: 10.1021/ct400073s.

[70] Pubchem, "PubChem, Ibuprofen," 2019. [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen.

[71] S. Reiser, "Investigation on the Influence of Porous Carrier Materials on the Loading and Dissolution Behavior of R / S-Ibuprofen," *Tesi di dottorato*, 2018.

[72] S. W. Song, K. Hidajat, and S. Kawi, "Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: Influence of surface properties on matrix-drug interactions," *Langmuir*, vol. 21, no. 21, pp. 9568–9575, 2005, doi: 10.1021/la051167e.

[73] E. Ahmadi, N. Dehghannejad, S. Hashemikia, M. Ghasemnejad, and H. Tabebordbar, "Synthesis and surface modification of mesoporous silica nanoparticles and its application as carriers for sustained drug delivery," *Drug Deliv.*, vol. 21, no. 3, pp. 164–172, 2014, doi: 10.3109/10717544.2013.838715.

[74] I. 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," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 50, no. 3, pp. 421–429, 2009, doi: 10.1007/s10971-009-1932-3.

[75] M. Thommes *et al.*, "Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 87, no. 9–10, pp. 1051–1069, 2015, doi: 10.1515/pac-2014-1117.

[76] M. Thommes, "Physical adsorption characterization of nanoporous materials," *Chemie-Ingenieur-Technik*, vol. 82, no. 7, pp. 1059–1073, 2010, doi: 10.1002/cite.201000064.

[77] M. Di Foggia, "STUDIO DI BIOMATERIALI USATI COME SCAFFOLD PER TISSUE ENGINEERING E LORO CARATTERIZZAZIONE CON TECNICHE SPETTROSCOPICHE VIBRAZIONALI E DI ANALISI TERMICA.," *Tesi di dottorato*, 2008.

[78] "SlideShare." [Online]. Available: https://www.slideshare.net/mariomS7/uvvis-

spectroscopy.

[79] C. S. Mangolim *et al.*, "Curcumin-β-cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application," *Food Chem.*, vol. 153, pp. 361–370, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.067.

[80] T. M. Kolev, E. A. Velcheva, B. A. Stamboliyska, and M. Spiteller, "DFT and Experimental Studies of the Structure and Vibrational Spectra of Curcumin," vol. 102, pp. 1069–1079, 2005, doi: 10.1002/qua.20469.

[81] P. Horcajada, C. Márquez-Alvarez, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, and M. Vallet-Regí, "Controlled release of Ibuprofen from dealuminated faujasites," *Solid State Sci.*, vol. 8, no. 12, pp. 1459–1465, 2006, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2006.07.016.

[82] A. Jain, S. Doppalapudi, A. J. Domb, and W. Khan, "Tacrolimus and curcumin co-loaded liposphere gel: Synergistic combination towards management of psoriasis," *J. Control. Release*, vol. 243, pp. 132–145, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.10.004.

[83] P. Kinnari, E. Mäkilä, T. Heikkilä, J. Salonen, J. Hirvonen, and H. A. Santos, "Comparison of mesoporous silicon and non-ordered mesoporous silica materials as drug carriers for itraconazole," *Int. J. Pharm.*, vol. 414, no. 1–2, pp. 148–156, 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.021.

[84] T. Limnell, H. A. Santos, E. Makila, T. Heikkila, and J. Salonen, "Drug delivery Formulations of ordered and nonordered mesoporous silica: Comparison of three drug loading methods," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 8, pp. 3294–3306, 2011, doi: 10.1002/jps.

[85] L. Serpella, O. Barbara, and S. Ronchetti, "Silice mesoporosa come carrier di Piroxicam," *Tesi di laurea*, 2017.

[86] "SYLOID ® Silicas Pharmaceutical Excipient Multifunctional Excipients for the Pharmaceutical Industry." [Online]. Available: https://grace.com/pharma-and-biotech/en-us/Documents/Syloid/M309c_Syloid_FP_XDP_Tech_Note_0915.pdf.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Prof. Onida per il lavoro di ricerca assegnatomi, durante il quale, non sono mai mancati la sua disponibilità e soprattutto i suoi preziosi e saggi consigli, che hanno sempre stimolato la mia curiosità permettendomi di ampliare le mie conoscenze e di apprezzare maggiormente il mondo della ricerca. Un ulteriore ringraziamento va alla Dottoressa Marta Gallo, che con i suoi incoraggiamenti, con la fiducia dimostratami, con la sua sensibilità e con il suo affettuoso sostegno, mi ha accompagnata durante tutto il mio percorso. Percorso che non si è esaurito nello studio di silici e curcumina, ma si è nutrito anche di complici chiacchierate, pause caffè (rigorosamente al bar!), scambi di ricette, forzate gite in altri atenei, crisi isteriche dovute al funzionamento ballerino di alcuni strumenti (vedi bilancia!), condivisione di colazioni (viva i cereali!) e non per ultimo tante risate. Vorrei ringraziare inoltre i miei compagni di ufficio, Sonia, Fabio, Nicholas. Non c'è stato un giorno in cui non mi avete accompagnata a prendere un caffè, nonostante nessuno di voi ne sia un amante (pazzi!!).

E' arrivato il momento di ringraziare il mio FRA. Stiamo condividendo da più di 5 anni lo stesso percorso, fatto di studio, di tante CREESE e caffè. Ormai non ti reputo solo un collega, ma un amico fidato che è sempre pronto ad ascoltarmi e a darmi consigli sinceri.

Grazie ai miei polentoni preferiti: Mik, Ale, Gus, Matti e Bob. Siete dei pazzi psicopatici e per questo vi adoro! Non mi avete mai fatta sentire sola in questa città forse un po' troppo grande per me. Grazie per le risate, le serate di karaoke, le feste di compleanno, e i numerosi aperitivi. Non avrei mai pensato di poter incontrare dei polentoni così simpatici (xD). Un ringraziamento anche a Lucianino, che con i suoi sorrisi, le sue battute idiote e le numerose tavolette di cioccolata regalatemi, mi ha sempre strappato un sorriso.

Grazie alle mie grits (fiocchi d'avena), Alberta e Brunella. Le mie donnine che sono state amiche, colleghe e anche mamme quando è stato necessario!! Condividere questi due anni (intensi) con voi è stato fantastico; mi avete supportata e SOPPORTATA, in qualsiasi momento. La mia difficoltà nel fare amicizia con le ragazze è sempre stata nota a tutti, ma con voi, ogni cosa è stata molto semplice, sincera e spontanea.

Ringrazio Lollo, Sofi, Martina, Marco e Giorgia. Siete la mia famiglia e nessun "grazie" sarai mai abbastanza per voi; vi amo infinitamente.

Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia, che ha sempre creduto in me durante tutto il percorso di studio, anche quando io stessa non ci credevo. Siete stati fondamentali e non è MAI mancato il vostro supporto, soprattutto quando durante il primo mese di lontananza le nostre chiamate erano costellate di pianti e crisi isteriche (sono sempre stata di lacrima facile). Infine, ma non per importanza, c'è una persona di cui non ricordo precisamente il nome che voglio ringraziare. Mi pare si chiami Flavio, anzi no! Fulvio!! Dire che sei stato fondamentale in questa esperienza, è dire veramente poco. Durante questi due anni, ti sei improvvisato dottore, cuoco, "donna delle pulizie" e psicologo e di certo non è stato semplice combattere con le mie crisi. Perciò grazie davvero, sei diventato la mia FAMIGLIA.