

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

Silici nanoporose come carrier di vitamina D₃



Relatore

Prof.ssa Barbara Onida

Correlatori

Prof.ssa Silvia Maria Ronchetti

Dott.ssa Marta Gallo

Candidato

Giulia Palestrini

Dicembre 2020

Indice

ELENCO DELLE TABELLE.....	III
ELENCO DELLE FIGURE	IV
ACRONIMI.....	VII
INTRODUZIONE	IX
1 VITAMINA D	1
1.1 INTRODUZIONE	1
1.2 STRUTTURA CHIMICA	3
1.3 METABOLISMO E FUNZIONI	5
1.4 FONTI E FABBISOGNO	7
1.5 CARENZA	8
1.6 TOSSICITÀ	8
1.7 SOMMINISTRAZIONE VITAMINA D ₃	9
1.7.1 Sistemi per rilascio di farmaci	9
1.7.2 Metodi di somministrazione.....	10
1.7.3 Somministrazione topica	12
1.8 TECNOLOGIE PER LA SOMMINISTRAZIONE DI VITAMINA D ₃	14
1.8.1 Microparticelle e microsfele.....	15
1.8.2 Nanoemulsioni.....	16
1.8.3 Nanomicelle.....	17
1.8.4 Nanoparticelle polimeriche	18
1.8.5 Nanoparticelle inorganiche	20
1.9 PSORIASI E VITAMINA D ₃	20
2 SILICI MESOSTRUTTURATE	22
2.1 INTRODUZIONE	22
2.2 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE DI MATERIALI POROSI	24
2.3 SINTESI DELLE MCM-41	27
2.3.1 Processo Sol-Gel	30
2.3.2 Ruolo Del Tensioattivo.....	32
2.3.3 Rimozione Del Tensioattivo	35
2.4 SILICI MESOPOROSE COME SISTEMI PER IL RILASCIO DI FARMACO	38
2.4.1 Dimensione delle particelle	39
2.4.2 Area superficiale.....	40

2.4.3	<i>Taglia dei pori</i>	40
2.4.4	<i>Volume poroso</i>	41
2.5	FUNZIONALIZZAZIONE DEI MESOPORI	42
2.6	TECNICHE DI IMPREGNAZIONE.....	45
2.6.1	<i>Adsorbimento da soluzione</i>	45
2.6.2	<i>Incipient Wetness Impregnation</i>	46
2.6.3	<i>Metodo di fusione</i>	46
2.6.4	<i>CO₂ supercritica</i>	47
3	MATERIALI E METODI	50
3.1	MATERIALI.....	50
3.2	SUPPORTI UTILIZZATI.....	51
3.3	TECNICA DI IMPREGNAZIONE	51
3.4	TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE	52
3.4.1	<i>Diffrazione a raggi X</i>	52
3.4.2	<i>Analisi termogravimetrica</i>	54
3.4.3	<i>Spettroscopia FT-IR</i>	55
3.4.4	<i>Analisi di adsorbimento di azoto</i>	56
3.4.5	<i>Spettroscopia UV/Visibile</i>	57
4	CARATTERIZZAZIONE DI SILICI NANOPOROSE CONTENENTI VITAMINA D₃	59
4.1	DIFFRAZIONE A RAGGI X.....	59
4.2	ANALISI TERMOGRAVIMETRICA	61
4.3	SPETTROSCOPIA FT-IR	64
4.4	ANALISI DI ADSORBIMENTO DI AZOTO.....	66
5	RILASCIO DELLA VITAMINA D₃	71
5.1	RETTE DI TARATURA.....	71
5.2	RILASCIO IN SUDORE ARTIFICIALE	72
5.2.1	<i>Test di rilascio</i>	75
5.3	ESTRAZIONE IN ETANOLO	78
6	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	81
	BIBLIOGRAFIA	85
	RINGRAZIAMENTI.....	91

Elenco delle tabelle

Tabella 1: Composizione di miscele sintetiche con differenti rapporti molari Sur/Si per la formazione di varie fasi di M41S [43].....	29
Tabella 2: Panoramica dei valori di g e la mesofase prevista [35].....	34
Tabella 3: Range di valori di diverse proprietà chimico-fisiche di gas, liquidi e fluidi supercritici [48].	36
Tabella 4: Condizioni operative del test XRD ad alti angoli.	54
Tabella 5: Pertite di peso percentuali.	63
Tabella 6: Confronto dei parametri superficiali tra SBA_8 e SBA_8_vitD3.	68
Tabella 7: Confronto dei parametri superficiali tra SBA_4 e SBA_4_vitD3.	70
Tabella 8: Composizione sudore artificiale.	72
Tabella 9: Soluzioni per la retta di taratura della vitamina D ₃ in sudore artificiale.....	73
Tabella 10: Taratura della vitamina D ₃ in etanolo.	79

Elenco delle figure

Figura 1.1: Processo di formazione della vitamina D ₃ tramite l'irradiazione UV del 7-deidrocolesterolo[3].	2
Figura 1.2: Aree di ricerca riguardanti la vitamina D [4].	3
Figura 1.3: Struttura delle vitamina D ₃ o colecalciferolo [2].	4
Figura 1.4: Trasformazione della vitamina D ₃ in 1,25-diidrossi-D ₃ [2].	4
Figura 1.5: Struttura del calcitriolo [4].	5
Figura 1.6: : Trasformazione da 7-deidrocolesterolo a colecalciferolo [8].	6
Figura 1.7: Formazione e idrossilazione della vitamina D ₃ .	7
Figura 1.8: : Profili per un rilascio costante e non del farmaco mediante sistemi di drug delivery [15].	10
Figura 1.9: Struttura pluristratificata della cute [23].	13
Figura 1.10: Differenti materiali che sono stati finora esplorati come agenti di trasporto per vitamine [19].	14
Figura 1.11: Microsfere di PLA caricate con 25(OH)D ₃ per il trattamento di paradontite diabetica [19].	16
Figura 1.12: Nanoemulsioni [28].	17
Figura 1.13: Schema di produzione di micelle di caseina che incorporano vit D ₃ nel loro nucleo [19].	18
Figura 1.14: Morfologia di una nanosfera e una nanocapsula [32].	18
Figura 1.15: La complessa interazione dei diversi tipi di cellule cutanee durante i cambiamenti patologici nella pelle psoriasica [34].	21
Figura 2.1: Le differenti strutture della famiglia M41S [38].	23
Figura 2.2: Rappresentazione dei differenti tipi di nanoparticelle di silice mesoporosa (MSNs) [37].	24
Figura 2.3: Distribuzione della dimensione dei pori per differenti materiali porosi [38].	25
Figura 2.4: : Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [38].	26
Figura 2.5: Rappresentazione schematica della formazione di MCM-41 [42].	28
Figura 2.6: Effetto della temperatura del trattamento idrotermale e della lunghezza della catena alchilica del tensioattivo sul materiale prodotto [44].	29
Figura 2.7: Schema generale delle reazioni sol-gel [45].	30
Figura 2.8: Reazioni di idrolisi e condensazione utilizzando catalizzatore basico [38].	31
Figura 2.9: Effetto del pH sulla velocità della reazione di idrolisi e di condensazione [38].	32

Figura 2.10: Molecole di tensioattivo, micelle sferiche e micelle cilindriche.	33
Figura 2.11: Meccanismo di formazione delle MCM-41 [37].	35
Figura 2.12: Diagramma di fase dell'anidride carbonica [49].	37
Figura 2.13: Apparato sperimentale per l'estrazione tramite scCO ₂ : (1) bombola di CO ₂ ; (2) chiller per il raffreddamento; (3) pompa del liquido; (4) valvola di commutazione; (5) bobina di premiscelazione; (6) recipiente di estrazione; (7) forno; (8) regolatore di contropressione; (9) tubo di raccolta; (10) serbatoio del modificatore; (11) pompa a siringa del modificatore [50].	38
Figura 2.14: Immagini di MSN nella direzione (a) parallela e (b) perpendicolare all'asse lungo dei mesocanali [16].	41
Figura 2.15: Funzionalizzazione della parete in materiali mesoporosi di silice e strutture di diversi farmaci utilizzati in questi sistemi [51].	43
Figura 2.16: Funzionalizzazione post-sintesi [54].	44
Figura 2.17: Rappresentazione schematica delle tre fasi del processo di impregnazione [32].	48
Figura 2.18: Apparato sperimentale [58].	48
Figura 3.1: Disposizione delle molecole di farmaco all'interno dei pori [62].	51
Figura 3.2: Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg [64].	53
Figura 3.3: : Regioni dello spettro IR [65].	55
Figura 3.4: La relazione tra la forma dei pori e l'isoterma di adsorbimento-desorbimento [38].	56
Figura 3.5: : Schematizzazione di uno spettrofotometro UV/Vis [66].	58
Figura 4.1: Spettro diffrattometrico della vitamina D ₃ [67].	60
Figura 4.2: Spettro XRD – Confronto sui campioni con pori di 8 nm.	60
Figura 4.3: Spettro XRD – Confronto sui campioni con pori di 4 nm.	61
Figura 4.4: Curva termogravimetrica della vitamina D ₃ [69].	61
Figura 4.5: Curva TGA – Confronto sui campioni con pori da 8 nm.	62
Figura 4.6: Curva TGA – Confronto sui campioni con pori da 4 nm.	63
Figura 4.7: Curva TGA – Confronto tra campioni impregnati e con diametro poroso differente.	64
<i>Figura 4.8: Spettro FTIR del colecalciferolo.</i>	<i>64</i>
Figura 4.9: Spettro FTIR – Confronto tra campioni con pori da 8 nm.	65
Figura 4.10: Spettro FTIR – Confronto tra campioni con pori da 4 nm.	66
Figura 4.11: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_8 e SBA_8_vitD3.	67
Figura 4.12: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_8 e SBA_8_vitD3.	67
Figura 4.13: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_4 e SBA_4_vitD3.	69
Figura 4.14: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_4 e SBA_4_vitD3.	69
Figura 5.1: Soluzioni figlie a concentrazione crescente.	74
Figura 5.2: Retta di taratura – Vitamina D ₃ in sudore artificiale.	74

Figura 5.3: Strumentazione per il test di rilascio.	76
Figura 5.4: Filtrazione della soluzione post rilascio.	76
Figura 5.5: Spettro UV/Vis – Confronto tra la soluzione filtrata e la soluzione figlia in AS di 3,5 ppm.	77
Figura 5.6: Spettro FTIR – Confronto campione SBA_8_vitD ₃	78
Figura 5.7: Retta di taratura – Vitamina D ₃ in etanolo.	79
Figura 5.8: Spettro UV/Vis – Confronto tra la soluzione estratta e la soluzione figlia da 5 ppm.	80

Acronimi

Vit D₃	Vitamina D ₃ ;
DDS	Drug Delivery System;
CMC	Concentrazione micellare critica;
NP	Nanoparticelle;
MSN	Mesoporous Silica Nanoparticles;
TEOS	Tetraetossisilano;
SFE	Supercritical Fluid Extraction;
scCO₂	Anidride carbonica supercritica;
OMS	Ordered Mesoporous Silica;
IWI	Incipient Wetness Impregnation;
EtOH	Etanolo;
XRD	X-ray diffraction;
TGA	Analisi termogravimetrica;
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy;
UV/Vis	Spettroscopia Ultravioletto/Visibile;
SBA_8	Silice SBA-15 con diametro poroso di 8 nm;
SBA_4	Silice SBA-15 con diametro poroso di 4 nm;
SBA_8_vitD3	Silice SBA-15 con diametro poroso di 8 nm contenente vitamina D ₃ ;
SBA_4_vitD3	Silice SBA-15 con diametro poroso di 4 nm contenente vitamina D ₃ ;
AS	Artificial sweat;

Introduzione

La vitamina D₃, forma biologicamente importante della vitamina D, è una molecola liposolubile che può essere sia assorbita tramite ingestione sia sintetizzata nella pelle per azione dei raggi solari. È stato dimostrato che la vitamina D₃, detta anche colecalciferolo, è una molecola associata a numerose funzioni nel corpo umano, tra cui rimodellamento osseo, attività antitumorale, malattie autoimmuni e trattamento di diversi disturbi della pelle, come ad esempio la psoriasi. Tra i vari potenziali campi di applicazione della vitamina D₃, l'interesse scientifico si sta concentrando sullo sviluppo di nuovi farmaci e sistemi di rilascio all'interno dell'organismo. Infatti, grazie alla sua struttura chimica, la vitamina D₃ è un eccellente candidato per il trasporto transdermico, fatta eccezione per la sua elevata lipofilia che ne riduce la biodisponibilità. Per ovviare a questo problema è possibile ricorrere a sistemi di drug delivery.

Lo sviluppo di sistemi per il rilascio di farmaco basati su micro e nanoparticelle rappresenta uno dei campi di ricerca di maggiore interesse in ambito biomedico e farmaceutico. Tra i materiali più promettenti per questo utilizzo si trovano le silici mesoporose (pori da 2 nm a 50 nm) con porosità ordinata, poiché possiedono un'elevata area superficiale specifica, un elevato volume poroso, la possibilità di funzionalizzazione e la biocompatibilità. Le caratteristiche di questi sistemi risultano particolarmente rilevanti per le applicazioni topiche, in cui il principio attivo agisce solo a livello locale sul sito di interesse consentendo un adeguato dosaggio del farmaco e limitandone gli effetti collaterali.

La finalità di questa tesi è lo studio di una silice commerciale a mesoporosità ordinata (SBA-15) come sistema per il rilascio di vitamina D₃, in vista di un'applicazione in campo topico. Dopo un'approfondita analisi bibliografica sulla vitamina D₃, le sue applicazioni e i sistemi per somministrarla, è stata effettuata una parte sperimentale in cui il farmaco è stato incorporato su due campioni commerciali di silice SBA-15 con diametro dei pori differente, tramite la tecnica Incipient Wetness Impregnation (IWI). È stata eseguita su tutti i campioni una caratterizzazione chimico-fisica per valutare gli effetti dell'incorporazione del farmaco. Infine, è stato studiato il rilascio di vitamina D₃ in una soluzione di sudore artificiale e l'estrazione del farmaco tramite solvente.

Il primo capitolo di questo elaborato è dedicato allo studio del principio attivo utilizzato, la vitamina D₃, sulle sue caratteristiche, le proprietà antipsoriasiche e le differenti strategie di somministrazione descritte in letteratura. Nel secondo capitolo sono prese in esame le silici

mesostrutturate, elencandone le proprietà e i meccanismi che portano al solo ottenimento. Inoltre, vengono analizzate le principali tecniche di incorporazione di farmaci all'interno delle silici.

Il terzo capitolo tratta dei materiali e dei metodi di impregnazione e caratterizzazione utilizzati durante il lavoro sperimentale di questa tesi. Mentre nel quarto capitolo vengono mostrati i risultati ottenuti dalle tecniche di caratterizzazione. I campioni sono stati caratterizzati tramite diffrazione a raggi X, analisi termogravimetrica, spettroscopia FTIR, analisi di adsorbimento di azoto e spettroscopia UV/Vis.

Il quinto capitolo si concentra sul rilascio di vitamina D₃ dai campioni impregnati in una soluzione acquosa salina che simula il sudore della pelle. Infine, nel sesto capitolo vengono commentati i risultati ottenuti e i possibili sviluppi futuri.

Capitolo 1

Vitamina D

1.1 Introduzione

La vitamina D è stata descritta come “(. . .) una vitamina imposta all'uomo dalla civiltà ”, questo perché, sebbene necessaria per una buona salute, la vitamina D può essere sintetizzata nella pelle dei mammiferi dall'azione della luce solare [1]. Pertanto, non soddisfa la definizione standard di una vitamina quale nutriente essenziale che l'organismo non è in grado di sintetizzare. La vitamina D è un ormone steroideo, correlato al colesterolo, che attraverso un incidente storico è stata classificata appunto come vitamina.

Prima del ventesimo secolo non era possibile descrivere gli elementi essenziali di una dieta che potesse sostenere la vita, la crescita e la riproduzione degli animali superiori.

Dai primi studi di McCollum e Davis nel 1913, quando fu scoperta la prima vitamina, fino al 1940, il lavoro che ha portato all'identificazione della vitamina D ha incluso molti contributi eccezionali. Infatti, la scoperta della vitamina D e l'eliminazione del rachitismo come grave problema medico devono essere considerati uno dei grandi risultati della medicina [2].

Sir Edward Mellanby, nel 1919-1920 in Gran Bretagna (luogo con la più alta incidenza di rachitismo), interessato al lavoro di McCollum, ipotizzò che il rachitismo potesse essere una malattia da carenza alimentare. Lavorando con cani allevati esclusivamente in interni (in assenza di luce solare o ultravioletta), Mellanby mise a punto una dieta che gli permise di stabilire inequivocabilmente che il rachitismo era causato da un deficit di una componente presente in tracce nella dieta. Inoltre, poteva curare la malattia fornendo olio di fegato di merluzzo, quindi ipotizzò che la vitamina A, la cui presenza nell'olio era nota, fosse responsabile della prevenzione del rachitismo [3]. Poco dopo E.V. McCollum e colleghi, decisi a verificare l'ipotesi, fecero gorgogliare ossigeno attraverso l'olio di fegato di

merluzzo e in questo modo furono in grado di distinguere tra la vitamina A (ora inattiva) e un fattore antirachitico, una nuova vitamina che chiamarono vitamina D [3].

Nel frattempo, Huldshinsky e Chick scoprirono che i bambini affetti da rachitismo potevano essere curati esponendoli alla luce solare o alla luce UV prodotta artificialmente. In seguito, Harry Steenbock all'Università del Wisconsin iniziò ad irradiare i ratti, il loro cibo e l'aria nelle loro gabbie con la luce UV e scoprì che questa irradiazione avrebbe potuto prevenire o curare il rachitismo. Inoltre, concluse correttamente che un lipide inattivo nella dieta e nella pelle potesse essere convertito dalla luce UV in una sostanza antirachitica attiva [3].

Tuttavia, a causa del contemporaneo rapido avanzamento della scienza della nutrizione e la scoperta delle famiglie di vitamine idrosolubili e liposolubili, fu rapidamente stabilito che il fattore antirachitico dovesse essere classificato come una vitamina.

Tra i diversi vitameri della vitamina D (composti chimicamente diversi, ma con la stessa funzione vitaminica), la vitamina D₂ è stata la prima ad essere isolata e identificata. L'altro vitamero, la vitamina D₃, non fu caratterizzato chimicamente fino al 1936, quando fu identificato come forma naturale della vitamina D formata nella pelle a seguito dell'irradiazione UV di 7-deidrocolesterolo (Figura 1.1).

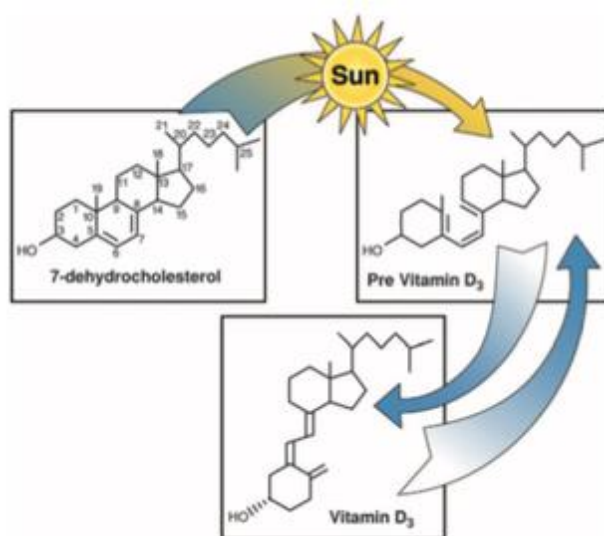


Figura 1.1: Processo di formazione della vitamina D₃ tramite l'irradiazione UV del 7-deidrocolesterolo[3].

Ciò ha quindi sollevato la questione se la vitamina D fosse una vera vitamina o se fosse normalmente prodotta nella pelle e non si trovasse negli alimenti naturali. Sebbene si ipotizzasse già il meccanismo di formazione della vitamina D₃, questo è stato dimostrato nel 1978 da Esvelt che ha effettivamente isolato e identificato la vitamina D₃ mediante spettrometria di massa [3].

La vitamina D è praticamente assente nell'alimentazione. Non si trova nei materiali vegetali ed è in bassa quantità in carni e altre fonti animali, tranne in rari casi come oli di fegato di pesce e piante come la belladonna waxyleaf [2].

Questa sostanza organica è necessaria lungo tutto il corso della vita, non soltanto per la formazione dell'osso, ma anche in molti altri processi fisiologici. Il suo uso può prevenire diverse malattie degenerative e può anche svolgere un ruolo come agente antitumorale [2]. Grazie a queste proprietà, la vitamina D è attualmente oggetto di diversi lavori di ricerca, sia di base che applicata, in numerose aree (Figura 1.2). In particolare, tra i vari potenziali campi di applicazione della vitamina D, l'interesse scientifico si sta concentrando sullo sviluppo di nuovi farmaci e sistemi di rilascio all'interno dell'organismo [4].

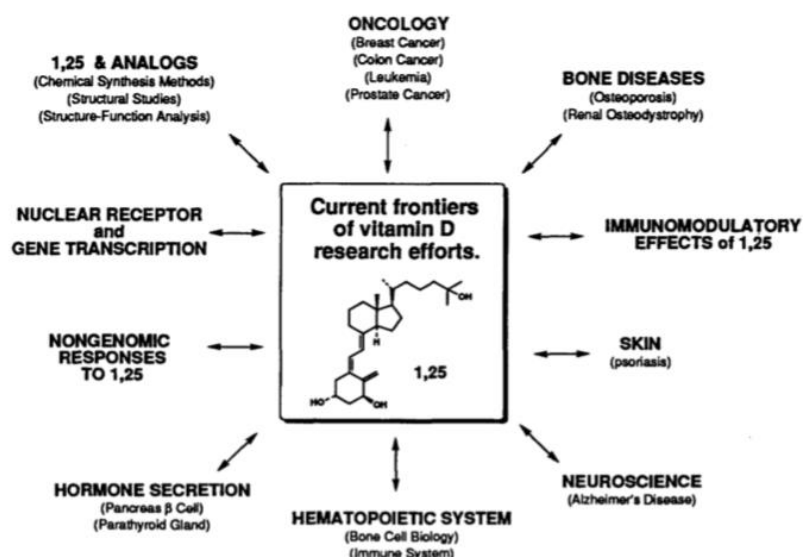


Figura 1.2: Aree di ricerca riguardanti la vitamina D [4].

1.2 Struttura chimica

Sebbene la vitamina D presenti due vitameri, soltanto uno di essi, la vitamina D₃, risulta essere di particolare interesse biologico. Le proprietà chimico-fisiche della vitamina D₃ sono da ricercarsi nella particolare struttura della sua molecola (Figura 1.3). Il nome chimico della molecola definito dalla IUPAC è: (1S,3Z)-3-{2-[(1R,3aS,4E,7aR)-7a-methyl-1-[(2R)-6-methylheptan-2-yl]-octahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene}-4-methylidenecyclohexan-1-ol ma è nota più semplicemente come colecalciferolo. La sua formula chimica è C₂₇H₄₄O, ha un peso molecolare di 384.6 g/mol e una temperatura di fusione di 83 °C.

La vitamina D₃ è altamente idrofobica e sensibile a diversi fattori esterni, quali umidità calore e luce, che possono indurre isomerizzazione o ossidazione della sua struttura e influire negativamente sulla sua bioattività [5].

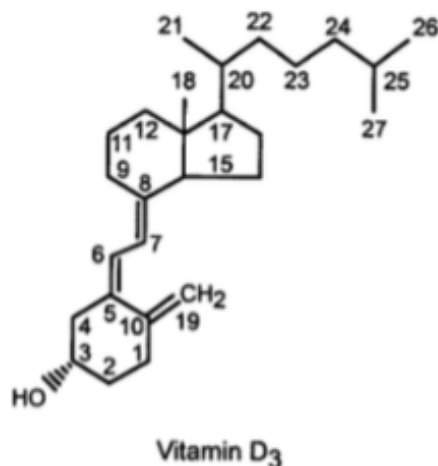


Figura 1.3: Struttura delle vitamina D₃ o colescalciferolo [2].

La vitamina D₃ viene successivamente idrossilata nel fegato e nel rene per produrre l'ormone calcitriolo; quest'ultimo migra poi verso una miriade di tessuti bersaglio in cui si verificano interazioni specifiche per produrre una serie di risposte biologiche.

Nel fegato la vitamina subisce una prima idrossilazione in corrispondenza del C-25 per formare la 25-idrossi-D₃, denominata anche calcidiolo. La 25(OH)D₃ lascia il fegato legata alla "vitamin D binding protein" e il complesso viene captato dal rene per endocitosi. Nel rene il calcidiolo viene idrossilato in posizione 1 per formare la 1,25-diidrossi-D₃ (Figura 1.4) [6].

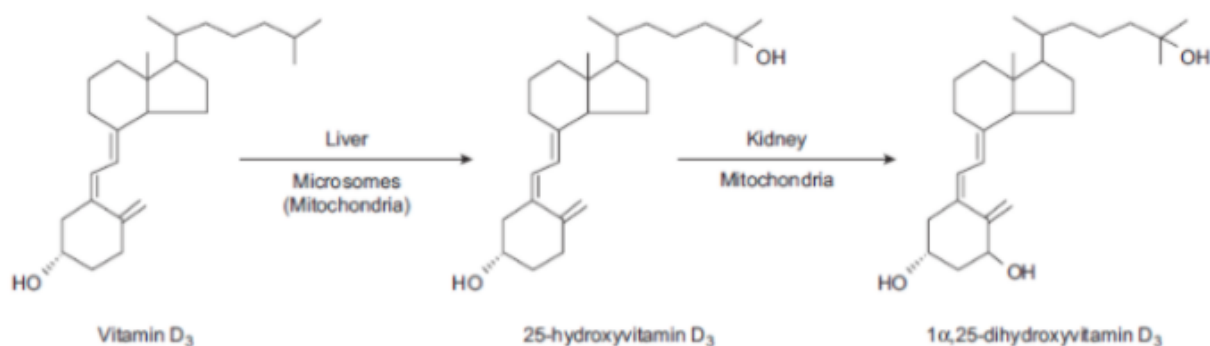


Figura 1.4: Trasformazione della vitamina D₃ in 1,25-diidrossi-D₃ [2].

Queste molecole sono flessibili e possono esistere in molte conformazioni in soluzione a temperatura ambiente. Il calcitriolo ha una struttura con capacità di cambiare dinamicamente la sua forma attraverso un'isomeria conformazionale o geometrica.

Le formule strutturali rivelano 4 gruppi distinti all'interno della molecola: un anello A, un triene, due anelli C e D e una catena laterale (Figura 1.5) [7].

L'anello A (cicloesano) può esistere come equilibrio tra conformeri a sedia. Queste conformazioni sono importanti per l'attività biologica e il meccanismo d'azione delle vitamine del gruppo D, tuttavia rimangono alcune incertezze relative ai conformeri predominanti. Il triene seco-B-ring può esistere nelle forme 6-s-trans e 6-s-cis (meno stabile) mediante rotazione del legame singolo 6,7. L'anello CD è un'unità di trans-idrindano (diciclononano), è relativamente rigido e infatti si comporta come un'*ancora*.

Infine, la catena laterale è praticamente libera di ruotare attorno a sei singoli legami [4].

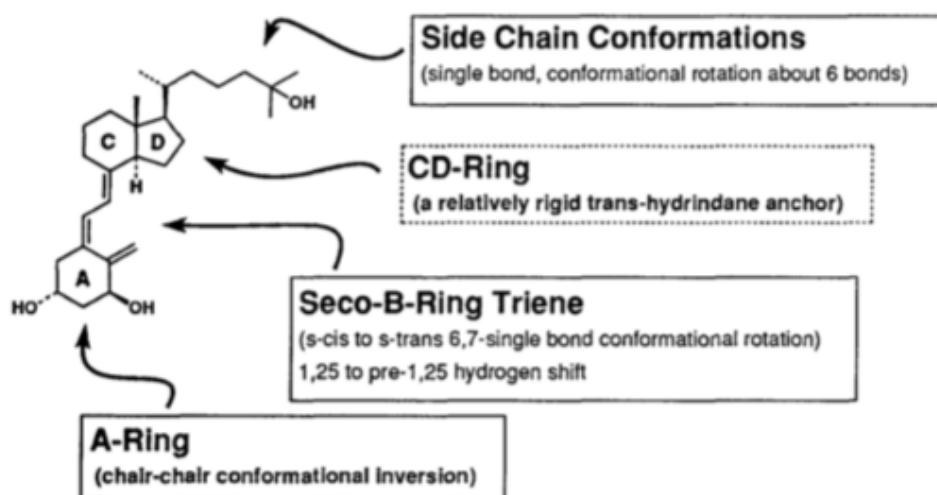


Figura 1.5: Struttura del calcitriolo [4].

Dal punto di vista chimico la vitamina D₃ può essere considerata un acido debole di Brønsted con pK_a pari a 18.38.

Gli anelli rendono la molecola della vitamina D₃ idrofobica (LogP≈9) con una solubilità in acqua (a pH neutro o acido) pressoché nulla mentre in soluzioni acquose basiche la solubilità della molecola aumenta [7].

1.3 Metabolismo e funzioni

La vitamina D è classificata come vitamina liposolubile e può essere assorbita sia con l'ingestione sia con l'esposizione ai raggi solari. Il termine vitamina D è comune a due

vitameri: la vitamina D₃ (vit D₃) o colecalciferolo, di origine animale, che deriva dal 7-deidrocolesterolo, e la vitamina D₂ (vit D₂) o ergocalciferolo che deriva dall'ergosterolo sintetizzato da lieviti e piante.

Oltre a questi composti esistono altre sostanze con attività simile chiamate provitamine ma le più importanti restano la vitamina D₃ e la D₂. I due vitameri differiscono per la struttura della catena laterale: questa è satura nella D₃, mentre è insatura nella D₂. Nel passato si riteneva che le due forme avessero attività biologica paragonabile, ma adesso è noto che la vitamina D₂ viene rapidamente catabolizzata dal fegato ed è una forma poco abbondante; per cui la vitamina D₃ viene considerata la sola forma biologicamente importante [6].

La vitamina D₃ non è una vitamina in senso stretto in quanto può essere sintetizzata nella pelle per azione dei raggi solari.

Il colesterolo presente nell'organismo è trasportato dalle lipoproteine a bassa densità (LDL) nel torrente ematico e arriva in larga misura ai centri della steroidogenesi. Tuttavia, una parte di colesterolo si deposita nella pelle e viene utilizzata per la sintesi della vitamina D [6].

Una volta nella pelle, il colesterolo (in particolare il 7-deidrocolesterolo) assorbe luce di lunghezza d'onda tra 280 e 315 nm (radiazione B ultravioletta, UVB) e subisce una reazione di ossidazione, catalizzata da una deidrogenasi, trasformandosi in D₃ (Figura 1.6). La previtamina D₃, alla temperatura corporea, va incontro ad un cambiamento conformazionale, poiché l'anello B della molecola ora è aperto e libero di ruotare attorno al legame semplice. Avviene così un'isomerizzazione che porta alla formazione della vitamina D₃ inattiva, che ne facilita il passaggio in circolo [6][7].

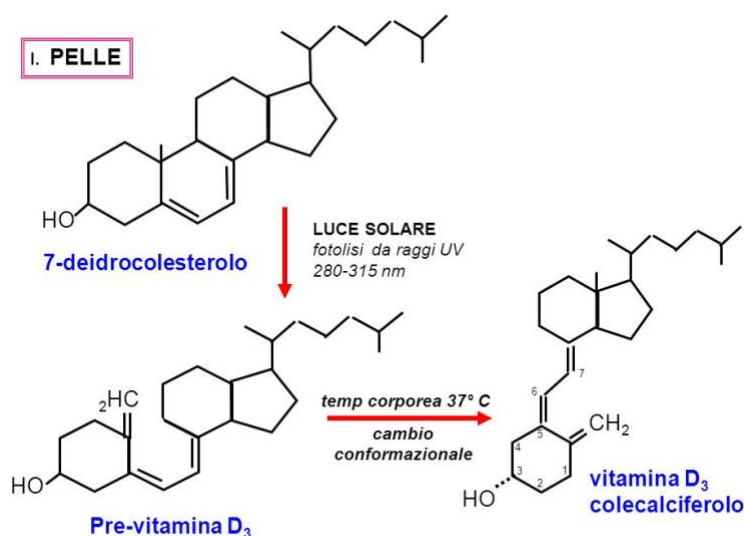


Figura 1.6: : Trasformazione da 7-deidrocolesterolo a colecalciferolo [8].

La 25 α -idrossilasi, enzima presente nel fegato, trasforma il colecalciferolo o vitamina D₃ in 25-idrossicolecalciferolo. Successivamente, a opera dell'1 α -idrossilasi renale, viene

trasformato nella forma attiva della vitamina D₃, rappresentata dall'ormone calcitriolo [1,25(OH)₂D₃] [8].

Il calcitriolo viene rilasciato in circolo, si lega ad una specifica α-globulina e viene trasportato ai tessuti bersaglio (Figura 1.7).

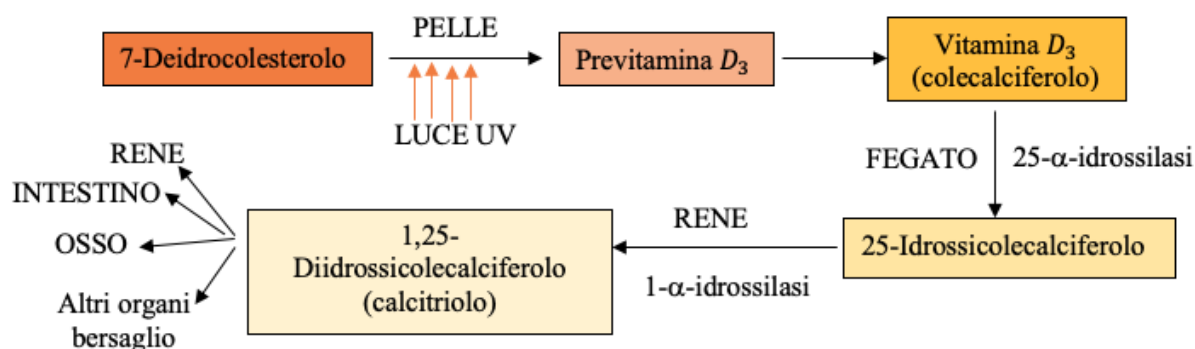


Figura 1.7: Formazione e idrossilazione della vitamina D₃.

Il calcitriolo esercita i suoi effetti legandosi a uno specifico recettore nucleare della vitamina D (VDR), un fattore di trascrizione ligando-dipendente che riconosce specifiche sequenze di DNA note come elementi di risposta alla vitamina D [9].

La principale funzione di questo ormone steroideo riguarda il mantenimento della concentrazione fisiologica ematica di calcio e di fosfato. Queste concentrazioni devono essere mantenute entro un intervallo di valori tali da permettere la mineralizzazione scheletrica: infatti il calcitriolo aumenta l'attività degli osteoclasti, le cellule del tessuto osseo capaci di solubilizzare l'idrossiapatite [6].

Inoltre, il calcitriolo aumenta l'efficienza dell'assorbimento del calcio a livello intestinale e a livello dei tubuli renali distali [10].

Un risultato importante dopo la scoperta del recettore VDR è stato che quest'ultimo è presente non solo sulle cellule bersaglio di enterociti, osteoclasti e cellule tubulari renali, ma anche in cellule della ghiandola paratiroidea, cheratinociti cutanei, promielociti, linfociti, cellule del colon, cellule della ghiandola pituitaria e cellule ovariche [11]. Questo suggerisce che la vitamina non è associata soltanto al rimodellamento osseo, ma anche ad altre funzioni nel corpo. Infatti le aree di ricerca riguardanti la vitamina D₃ includono sia l'osteoporosi che il diabete di tipo 1, l'attività antitumorale del calcitriolo, malattie autoimmuni e il trattamento di diversi disturbi della pelle come, ad esempio, la psoriasi [2][12].

1.4 Fonti e fabbisogno

Le fonti alimentari della vitamina D sono costituite da pesci di acqua salata e oli di pesce, inoltre è anche presente in basse quantità in uova, carne e burro [6].



La principale fonte di vitamina D₃, prima della diffusione degli integratori orali, era la sintesi naturale della pelle in seguito all'esposizione alla luce ultravioletta. A causa dell'attuale stile di vita della maggior parte delle persone, oggi, la principale fonte di vitamina D₃ è diventata l'integrazione nutrizionale. In caso di mancata/insufficiente esposizione alla luce solare o di aumentato fabbisogno (gravidanza, allattamento) l'assunzione giornaliera raccomandata per bambini e adulti dovrebbe essere di 400-600 UI¹/giorno (10-15 µg/giorno) [13].

Studi recenti collegano i livelli plasmatici di vitamina D₃ e dei suoi metaboliti con cancro, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni e infezioni.

L'approccio migliore per valutare lo stato della vitamina D è misurare il livello di 25-idrossicolecalciferolo (25(OH)D₃, calcidiolo) nel siero. Secondo molti studi, bassi livelli di calcidiolo sono associati ad un aumentato rischio di molte malattie croniche come ipertensione, infiammazione, diabete e cancro, mentre livelli elevati sono stati recentemente associati ad un aumentato rischio di cancro al pancreas. Pertanto, a ciascun paziente deve essere raccomandata una dose ottimale per l'assunzione di integratori [14].

1.5 Carenza

L'insufficienza di vitamina D è una condizione medica comune. Le conseguenze di una deficienza di vitamina D si manifestano maggiormente sul sistema muscoloscheletrico, provocando rachitismo nei bambini ed osteomalacia negli adulti. Il rachitismo colpisce i bambini nei primi anni di vita e la lesione caratteristica è la carente calcificazione delle ossa con conseguente formazione di strutture ossee cedevoli che, sottoposte a carico, tendono a deformarsi. Nell'osteomalacia non si ha deformità ossea, ma osteopenia con aumentato rischio di fratture e diffuso dolore osseo [6].

Esistono anche forme familiari di rachitismo, resistenti alla vitamina D, dovute all'incapacità di convertire la vitamina D₃ in calcitriolo a causa di un'alterazione congenita dell'1α-idrossilasi renale [6].

1.6 Tossicità

Un'assunzione eccessiva di vitamina D₃ (che viene smaltita molto lentamente) risulta tossica. Il limite tollerabile di assunzione è stato fissato a 50 µg/giorno per l'adulto (Institute of Medicine, IOM, 1997) [6].

¹ IU sta per unità internazionale ed è definita come "una quantità di una sostanza biologicamente attiva (come una vitamina) che produce un particolare effetto biologico concordato come standard internazionale"



L'intossicazione da vitamina D porta ad un elevato livello ematico di 25-idrossicolecalciferolo, questo metabolita può competere con il calcitriolo per i recettori nell'intestino e nelle ossa e può indurre effetti generalmente attribuiti al calcitriolo [2]. Pertanto, si ritiene che la 25-idrossi vitamina D₃ sia il fattore critico nell'intossicazione da vitamina D. L'aumento di livelli sierici di calcio nei casi più gravi porta a calcificazione anomala di tessuti molli (rene, cuore) [6]. La disfunzione renale diventa quindi il principale contributo alla perdita dell'omeostasi del calcio e alla conseguente ipercalcemia durante l'intossicazione da vitamina D. Perdita di appetito, disturbi gastrointestinali, dolore alla testa e alle articolazioni e debolezza muscolare sono sintomi clinici tipici. La morte per ipervitaminosi D è generalmente causata da insufficienza renale [8].

Quantità tossiche non vengono raggiunte con una dieta normale, ma sono conseguenza di un eccessivo uso di supplementi vitaminici [6].

1.7 Somministrazione vitamina D3

I metodi di somministrazione di un principio attivo nell'organismo sono differenti. Tuttavia, prima di analizzarli nello specifico, è opportuna una breve descrizione dei sistemi per rilascio di farmaci (*drug delivery systems*, DDS), dispositivi su cui si concentra tale lavoro di tesi.

1.7.1 Sistemi per rilascio di farmaci

Un sistema per il rilascio di farmaco, o *drug delivery system* (DDS), è definito come una formulazione o dispositivo che consente l'introduzione di una sostanza terapeutica nel corpo umano o animale, con l'obiettivo di migliorarne l'efficacia e la sicurezza controllando la velocità, il tempo e il luogo del rilascio.

Lo sviluppo di qualsiasi DDS richiede diversi anni di studio dati gli innumerevoli fattori da considerare. Innanzitutto, è necessario conoscere il tipo di principio attivo che si vuole trasportare all'interno dell'organismo, sia dal punto di vista della formulazione sia gli effetti terapeutici e collaterali. Quindi, occorre comprendere il metodo di somministrazione ottimale (orale, nasale, topico...) e il carrier più adatto per il trasporto, nonché il meccanismo di incorporazione e di rilascio del farmaco e la cinetica di rilascio [15].

Uno dei parametri più importanti da studiare per la progettazione di un dispositivo per il rilascio di farmaco è la farmacocinetica. Un DDS ottimale deve garantire che il principio attivo sia disponibile nel sito di azione mediante una corretta tempistica della somministrazione e una cinetica controllata del rilascio. Inoltre, la concentrazione del farmaco nel sito deve essere compresa in un intervallo, definito intervallo terapeutico, che va dalla concentrazione minima efficace alla concentrazione minima tossica (Figura 1.8). Pertanto, il rilascio controllato del farmaco regola la velocità, la posizione e mira a ottimizzare l'efficienza del farmaco riducendo contemporaneamente gli effetti collaterali negativi [15].

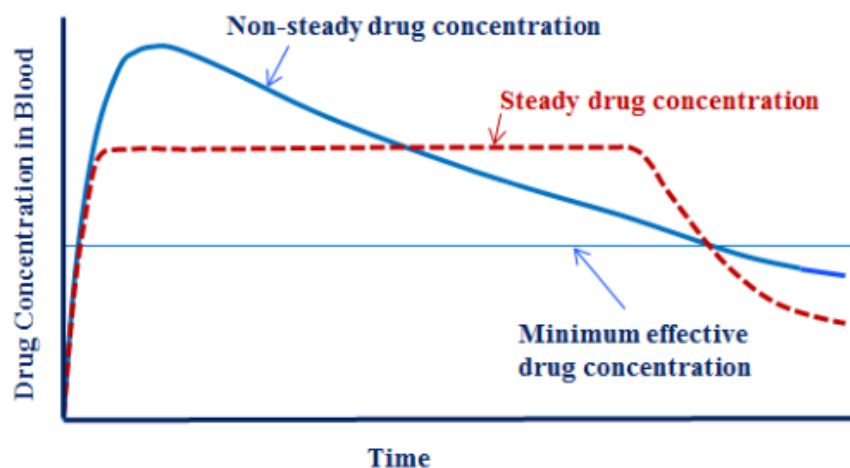


Figura 1.8: : Profili per un rilascio costante e non del farmaco mediante sistemi di drug delivery [15].

Il successo di questo approccio dipende dalla capacità di costruire un vettore biocompatibile che consenta un elevato carico di molecole di farmaco, senza alcun rilascio prematuro del carico prima di raggiungere la destinazione. Di seguito, sono riassunti i vantaggi che è necessario incorporare in tale materiale per poter fungere da DDS efficiente:

- Il materiale di supporto deve essere biocompatibile;
- Alto carico delle molecole di farmaco desiderate;
- Zero rilascio prematuro, ovvero nessuna fuoriuscita, di molecole di farmaco;
- Specificità del tipo di cellula/tessuto e capacità di direzionamento del sito;
- Rilascio controllato di molecole con una cinetica adeguata ad ottenere una concentrazione locale efficace [16].

1.7.2 Metodi di somministrazione

L'assorbimento della vitamina D₃ è un fattore importante da considerare nel calcolo di una dose appropriata [14].

La somministrazione di un farmaco è quel processo che porta una sostanza estranea all'organismo a raggiungere il sito d'azione, all'interno dell'organismo, a cui esso è destinato. Per raggiungere l'obiettivo lo stesso farmaco può seguire varie vie e in base alla via scelta può avere effetti molto diversi, un effetto topico (o locale) oppure un effetto sistemico. Il primo si riferisce all'azione della molecola solo a livello locale, quindi non entra nel sistema circolatorio, mentre per effetto sistemico si intende che il farmaco entra nel torrente circolatorio per arrivare poi al sito di interesse che può essere anche molto distante



dal sito di applicazione [17]. Questo processo prevede la preparazione del farmaco in una forma adatta, come ad esempio una compressa per la somministrazione orale o una soluzione per la somministrazione endovenosa.

La via orale è sicuramente la meno invasiva e la più usata per la maggior parte dei farmaci esistenti data la maggiore praticità.

La vitamina D viene ottenuta nella dieta principalmente da alimenti arricchiti con vitamina D o mediante l'uso di integratori ed è disponibile sul mercato come soluzione orale, capsule, polvere e compresse. Quando la vitamina D₃ viene somministrata per via orale, l'assorbimento avviene nell'intestino tenue prossimale con l'aiuto di acidi biliari.

Esistono molti fattori che influenzano l'assorbimento della vitamina D₃, qualsiasi malattia che comporti un malassorbimento del grasso intestinale ridurrà l'assorbimento della vitamina [18].

Ad esempio, nei pazienti con celiachia, ostruzione biliare e pancreatite cronica l'assorbimento della vitamina D₃ è significativamente inferiore rispetto l'assorbimento in un soggetto sano, che varia dal 62 al 91% [14].

La somministrazione orale di vitamine liposolubili risulta spesso più complessa di quella delle vitamine idrosolubili, a causa della difficoltà nel creare formulazioni che ne mantengono la funzionalità e la biodisponibilità [19].

La biodisponibilità di un integratore dipende in parte dalla dissoluzione della compressa o capsula, che ne aumenta l'assorbimento, e dalla solubilità della formulazione dell'integratore stesso. La formulazione del supplemento comprende anche i veicoli, ossia delle sostanze inattive che servono a stabilizzare il principio attivo di un integratore e ne aiutano la somministrazione e l'assorbimento [18].

È importante considerare come i diversi veicoli possono influenzare la biodisponibilità della vitamina [20], infatti, veicoli come oli, polveri o etanolo possono essere utilizzati negli integratori di vitamina D. Tuttavia, non ci sono sufficienti studi per determinare il veicolo più efficace [18].

La vitamina D può richiedere altri lipidi per stimolare il rilascio di acidi biliari con i quali associarsi in micelle per facilitarne l'assorbimento da parte della mucosa intestinale [18]. Pertanto, l'assorbimento della vitamina è differente se solubilizzata in olio, polveri di lattosio, polveri di cellulosa o etanolo.

L'iniezione endovenosa fa parte delle vie parentali, ossia tutte quelle vie di somministrazione diverse da quella gastro-intestinale. Queste vie endovasali presentano il vantaggio di evitare la fase di assorbimento, aumentando la biodisponibilità del farmaco. Tuttavia, è stata riscontrata la presenza di gravi limitazioni in termini di maggiore richiesta di dosaggio, tossicità ed effetti collaterali negativi, tra cui l'interazione del farmaco con parti del corpo che non sono il bersaglio [17].

Per affrontare questi problemi, possono essere studiate altre vie di somministrazione, quali, ad esempio, la via topica o trasporto transdermico. Consiste nel contatto diretto dell'agente terapeutico con il sito d'azione, generalmente cute o mucose, garantendo un adeguato dosaggio del farmaco senza però intaccare altre parti dell'organismo [17].



La somministrazione transdermica presenta molti vantaggi rispetto alla somministrazione orale o per iniezione, come appunto evitare effetti collaterali sul tratto gastrointestinale, fornire un rilascio continuo di farmaci ed essere facile da applicare o rimuovere [14].

Tuttavia, la somministrazione di quantità terapeutiche tramite questa modalità di trasporto è molto difficile da ottenere per alcuni composti a causa delle proprietà selettive della pelle. Per passare attraverso la barriera cutanea, infatti, una molecola deve rispettare i seguenti requisiti specifici: piccolo peso molecolare (< 600 Da), un'adeguata solubilità sia nei lipidi che nell'acqua e un coefficiente di ripartizione² bilanciato ($\log P$ da -1 a 4) [14].

Il peso molecolare della vitamina D₃ è di $384,64$ g/mol (cioè $384,64$ Da), ne è necessaria una dose giornaliera limitata, è solubile in etanolo, acetone, etere e cloroformio e insolubile in acqua, presenta un coefficiente di ripartizione lipidico / acqua pari a $10,2$ [14]. Quindi, fatta eccezione per la sua altissima lipofilia, la vitamina D₃ è un candidato eccellente per il trasporto transdermico.

La via di somministrazione topica è stata ulteriormente approfondita nel successivo paragrafo.

1.7.3 Somministrazione topica

La pelle è il più grande organo del corpo umano, del quale copre l'intera superficie di esso; costituisce un'importante barriera verso l'ingresso di sostanze estranee al corpo ed ostacola la crescita di batteri a causa della sua acidità [21]. Inoltre, la cute svolge molte altre funzioni: protegge dall'assorbimento della luce ultravioletta, previene la perdita di acqua ed elettroliti, regola la temperatura corporea e funge anche da organo di sensazione attraverso le numerose terminazioni nervose che si trovano in essa [22].

È formata, procedendo dall'esterno verso l'interno, dall'epidermide e dal derma.

L'epidermide è un epitelio pavimentoso pluristratificato che nel suo insieme può essere considerato come una membrana semipermeabile estremamente selettiva. Lo spessore differisce nelle diverse aree del corpo, variando da $0,05$ mm a $1,5$ mm [22]; gli strati si distinguono in: strato corneo, strato lucido, strato granuloso, strato spinoso o di Malpighi, strato basale o germinativo (Figura 1.9).

Il principale tipo di cellula che si trova nell'epidermide sono i cheratinociti, un tipo specifico di cellula epiteliale [22]. I cheratinociti sono in continuo stato di proliferazione per produrre nuovi elementi che si spostano dallo strato basale, dove inizia il loro processo di differenziazione, verso la superficie per sostituire le cellule eliminate. Infatti, lo strato più

² Il coefficiente di ripartizione o rapporto di ripartizione P è il parametro che misura la lipofilia di una sostanza, viene misurato utilizzando due solventi tra loro non miscibili ed è definito come il rapporto tra la concentrazione della sostanza nella soluzione organica e la concentrazione della sostanza nella soluzione acquosa.

$$\log P = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{soluz.organica}}}{[\text{solute}]_{\text{soluz.acquosa}}} \right)$$

esterno, lo strato corneo, è costituito da cellule chiamate corneociti, cellule anucleate e ridotte a lamelle che si disidratano progressivamente fino a desquamare ed essere eliminate [21].



Figura 1.9: Struttura pluristratificata della cute [23].

Il corneocita è privo di lipidi, ma ricco di proteine. I lipidi sono contenuti all'interno degli spazi extracellulari e questa matrice extracellulare lipidica è la causa della bassissima permeabilità dello strato corneo a sostanze idrosolubili [21].

Con l'applicazione sulla pelle, la penetrazione di una preparazione topica può avvenire attraverso gli annessi ghiandolari (via di assorbimento marginale perché ricoprono il 0,1-0,5% della superficie corporea) e per via transepidermica, attraverso un percorso intercellulare e/o transcellulare [24].

Il trasporto attraverso lo strato corneo è fondamentalmente un processo di diffusione passiva, pertanto sono determinanti le proprietà fisico-chimiche e strutturali della sostanza attiva, come anche la sua solubilità e diffusibilità [21].

L'equilibrio tra la solubilità della sostanza nello strato corneo relativamente a quella del veicolo considerato determina il suo coefficiente di ripartizione e indica la capacità della sostanza di separarsi dal veicolo ed essere assorbita dalle cellule del corneo [21].

Esistono numerosi studi focalizzati sulla somministrazione topica della vitamina D₃ e sono stati adottati diversi metodi chimici e fisici per superare il problema della bassa permeabilità dello strato corneo, inclusi i potenziatori della penetrazione (acidi grassi, esteri e alcoli, azoni, ammidi, oli essenziali, polioli e alcuni polimeri) [14].

Negli ultimi anni, infine, è stato studiato il potenziale utilizzo delle nano-formulazioni per il trasporto di vitamine, in modo da ottenere un rilascio controllato attraverso lo strato corneo [19].

1.8 Tecnologie per la somministrazione di vitamina D₃

In seguito, sono riportati alcuni dei nuovi sistemi di somministrazione (Figura 1.10) presenti in letteratura che prevedono l'utilizzo di carrier per migliorare l'efficacia dell'integrazione vitaminica, andando a conferire ulteriore permeabilità, stabilità o biodisponibilità al composto nativo. Vengono descritte prima le formulazioni strutturate sulla micro-scala per poi passare alla nano-scala.

Nello studio di carrier per la consegna controllata e su misura di farmaci, i vettori colloidali polimerici rappresentano una quota importante. Quest'ultimi contengono polimero naturale o sintetico come eccipienti principali e la matrice polimerica incapsula la porzione di farmaco all'interno di micro o nano sistemi [25]. Il rilascio controllato di farmaco può avvenire per diffusione, gonfiore e/o erosione.

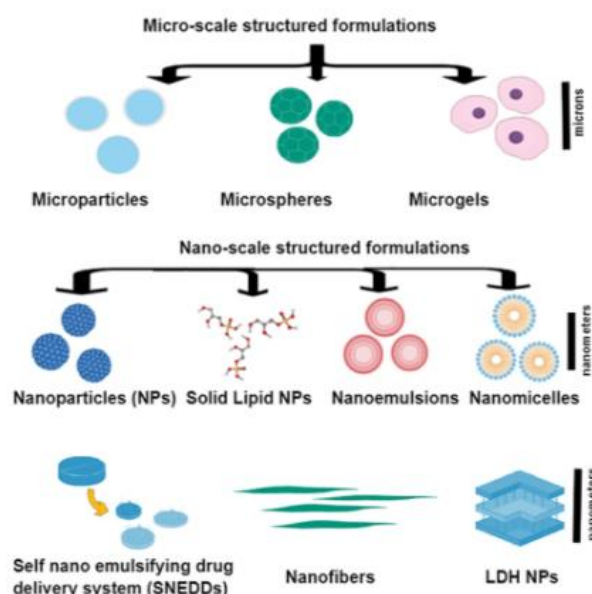


Figura 1.10: Differenti materiali che sono stati finora esplorati come agenti di trasporto per vitamine [19].



1.8.1 Microparticelle e microsfeere

Le microparticelle sono generalmente definite come particelle delle dimensioni del micron e differiscono dalle nanoparticelle in base alla loro dimensione. Le microparticelle per applicazioni topiche possono essere disperse in micro emulsioni, microgel, unguenti e creme [19].

In letteratura sono presenti diversi studi che si avvalgono di microparticelle per somministrare vitamina D₃. Ad esempio, lo studio di Lewis *et al.* [26] ha utilizzato Vit D₃ per il potenziale trattamento del diabete in una combinazione di terapia immunosoppressiva specifica dell'antigene. In tale studio, le microparticelle di poli(lattico-co-glicolico) o PLGA, sono state sfruttate grazie alla loro multifunzionalità e alla loro capacità di mirare specificatamente le cellule dendritiche. In particolare, le microparticelle hanno permesso di trasportare agenti immunomodulatori come la vitamina D₃.

La somministrazione sottocutanea delle microparticelle in un modello murino diabetico non obeso di 4 settimane di età ha ridotto il diabete di tipo 1 dal 90 al 60% nella popolazione trattata con la combinazione di 4 componenti, tra cui Vit D₃ [26].

Le microsfeere hanno una forma sferica più regolare rispetto alle microparticelle.

Forniscono un rilascio costante e prolungato riducendo la frequenza di dosaggio con un migliore effetto terapeutico [25]. Il rilascio da microsfeere può avvenire con meccanismi come la diffusione dei pori, erosione dei polimeri o rapido rilascio guidato osmoticamente. I principali fattori che influenzano il rilascio sono le proprietà dei polimeri, la quantità di farmaco incorporato, il rapporto farmaco/polimero, le dimensioni e la tecnica di preparazione [25].

Le microsfeere sono state utilizzate con successo per la somministrazione di numerosi farmaci, inclusi farmaci antipsoriativi. Ad esempio, sono state prodotte delle microsfeere di acido polilattico-co-glicolico (PLGA), contenenti clobetasolo propionato, tramite un'emulsione olio-in-acqua ed evaporazione del solvente e si è osservato che il rilascio da questa formulazione era significativamente più elevato rispetto al prodotto commerciale [25]. Per quanto riguarda il rilascio di vit D₃ e suoi analoghi, la letteratura riporta, ad esempio, un lavoro in cui sono state prodotte delle microsfeere di acido polilattico (PLA) per sostenere il rilascio di 25(OH)D₃ per la parodontite da complicanze diabetiche [19]. Uno studio preclinico, condotto su un modello di ratto di parodontite diabetica, ha dimostrato una riduzione dei segni della parodontite con un rilascio prolungato per un periodo di 10 settimane (Figura 1.11) [19].

In un lavoro più recente sono state testate le proprietà farmacocinetiche di microsfeere di PLGA caricate con colecalciferolo; queste hanno mostrato una migliore biodisponibilità della vitamina D₃ e un rilascio più prolungato [27].

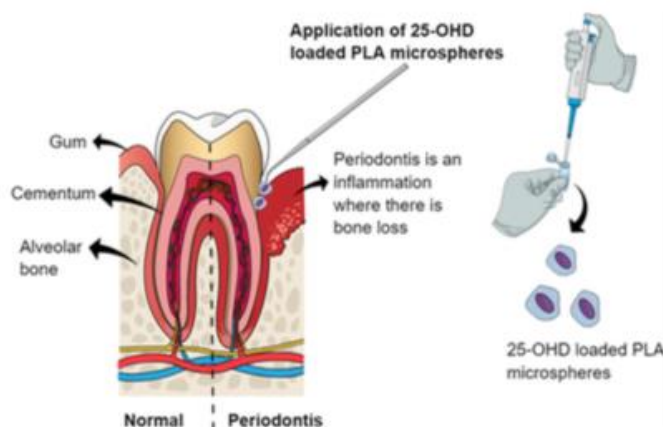


Figura 1.11: Microsfere di PLA caricate con 25(OH)D₃ per il trattamento di paradontite diabetica [19].

1.8.2 Nanoemulsioni

Le nanoemulsioni (Figura 1.12) sono sistemi eterogenei polifasici, in cui almeno una fase è dispersa sotto forma di nanoparticelle nella fase esterna continua, normalmente costituiti da un sistema oleoso disperso in un sistema acquoso, o viceversa. Queste fasi immiscibili sono stabilizzate da un tensioattivo che crea principalmente una repulsione fisica tra le goccioline in modo da evitare la coalescenza. Sono dei sistemi micellari che si possono formare spontaneamente quando i singoli componenti vengono incorporati in un rapporto appropriato. Il diametro delle micelle è variabile da 100 a 500 nm.

Le nanoemulsioni hanno spesso una maggiore capacità di carico per i principi attivi lipofili rispetto alle microemulsioni, il che può essere un vantaggio in alcune applicazioni, inclusa la somministrazione di farmaci [28].

Presentano le proprietà di facilità di formazione, facilità di sterilizzazione mediante filtrazione, dimensioni ridotte delle goccioline, elevata area superficiale, non tossicità e non irritabilità. Il rilascio dalle nanoemulsioni è controllato dalle interazioni tra farmaco e tensioattivo [25].

I sistemi di emulsione sono stati utilizzati sia per l'applicazione topica sia per la somministrazione orale e la fortificazione degli alimenti.

La fortificazione alimentare è stata indicata come strategia chiave per il controllo della malnutrizione da micronutrienti nei paesi a medio-basso reddito, poiché è l'approccio preferito in termini di sostenibilità ed efficacia in termini di costi. Lo studio di Cashman *et al.* [29] del 2019 mostra come, nel contesto della carenza di vitamina D, l'identificazione di veicoli alimentari idonei, culturalmente appropriati, fabbricati industrialmente e che sono consumati in quantità sufficienti dalle popolazioni a rischio sia di grande importanza.

In un lavoro del 2015 [30], in cui sono state utilizzate delle nanoemulsioni che comprendono la vitamina D₃, un tensioattivo naturale e una varietà di olii portanti, si è verificato che la

bioaccessibilità della vitamina varia in modo significativo nei diversi olii a causa di variazioni della solubilizzazione e della cinetica di rilascio da goccioline lipidiche. Infatti, le nanoemulsioni basate su trigliceridi a catena lunga (LCT), come olio di mais o olio di pesce, sono risultate particolarmente efficaci per aumentare la bioaccessibilità vitaminica e quindi migliorare l'efficacia di cibi e bevande funzionali arricchiti con vitamine [30].

La somministrazione transdermica mediante nanoemulsioni è diminuita a causa di problemi di stabilità inerenti a questa forma di dosaggio. Alcuni esempi di farmaci che utilizzano nanoemulsioni per la somministrazione transdermica sono gamma tocoferolo, caffeina, DNA plasmidico, aspirina, metil salicilato, insulina e nimesulide [28].

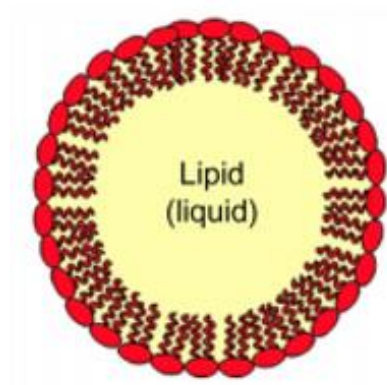


Figura 1.12: Nanoemulsioni [28].

1.8.3 Nanomicelle

Le molecole anfifiliche (i tensioattivi) a concentrazioni superiori alla concentrazione micellare critica (CMC) si aggregano formando delle micelle. Una delle proprietà di questi sistemi è la capacità di solubilizzare tra le code del surfattante i farmaci idrofobici altrimenti insolubili in acqua.

Pertanto, le nanomicelle sono delle particelle colloidali autoassemblanti di dimensioni nanometriche che consentono un elevato carico di farmaci, una maggiore biodisponibilità e una riduzione della degradazione dei farmaci e degli effetti collaterali [25].

Hanham et al. [31], hanno studiato micelle di nano caseine naturali di dimensioni pari a ~ 90 nm come nanoveicoli per la vitamina D₃. Le micelle di caseina prodotte sono state elaborate in modo da migliorare la farmacocinetica del principio attivo (Figura 1.13); la perdita di vitamina D₃ è risultata minima, con una buona stabilità termica e una migliore biodisponibilità.

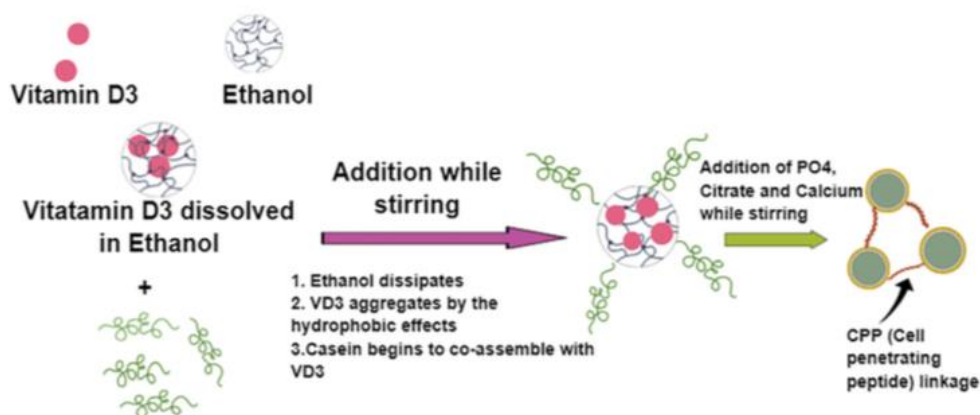


Figura 1.13: Schema di produzione di micelle di caseina che incorporano vit D₃ nel loro nucleo [19].

1.8.4 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle (NP) sono sistemi colloidali con dimensioni variabili da 10 a 1000 nm, generalmente formate da polimeri. I principi attivi incapsulati sono per lo più dispersioni o miscele in olio [25].

Le NP polimeriche sono sistemi colloidali formati dall'aggregazione di polimeri biocompatibili e biodegradabili, ad esempio acido polilattico (PLA) o policaprolattone (PCL). Alcuni gruppi di ricerca per aumentare la biocompatibilità prediligono utilizzare materiali organici per generare NPs, ad esempio fosfolipidi, PEG, e polisaccaridi presenti in natura come chitosano e alginato. Questi sistemi si possono presentare sotto forma di nanosfere, nanocapsule o in micelle e i farmaci possono essere incapsulati al loro interno oppure agganciati alla particella.

Nelle nanosfere il farmaco viene intrappolato o disperso uniformemente nella matrice polimerica (Figura 1.14). Le nanocapsule invece, sono una classe di nanoparticelle costituita da uno o più materiali attivi (core) e una matrice protettiva (shell) in cui la sostanza terapeutica può essere confinata [25].

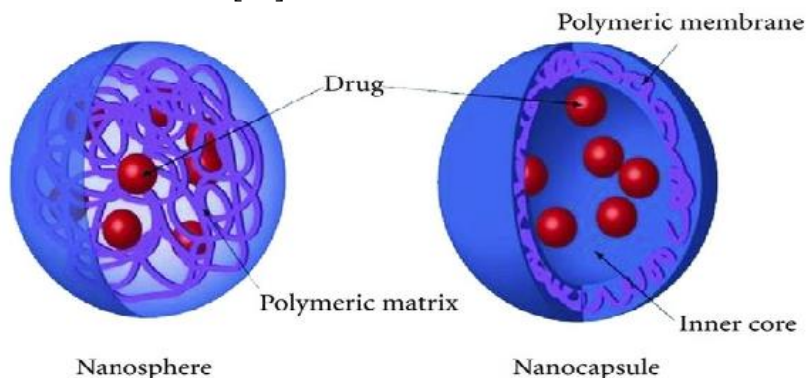


Figura 1.14: Morfologia di una nanosfera e una nanocapsula [32].



Di seguito sono riportati i più importanti vantaggi che offre l'uso delle nanoparticelle:

- Incremento della selettività e dell'efficienza degli agenti terapeutici;
- Incremento del quantitativo di farmaco caricato;
- Il farmaco può essere incorporato nel sistema senza alcuna reazione chimica, questo permette di preservare la bioattività del farmaco stesso;
- Il sistema può essere somministrato tramite vie differenti;
- Rilascio del farmaco controllato e prolungato;
- Riduzione degli effetti collaterali;
- Manipolazione della dimensione e delle caratteristiche superficiali delle particelle [28].

I farmaci contenuti nelle nanoparticelle vengono rilasciati, attraverso la membrana polimerica, mediante meccanismi di diffusione o erosione, a seconda della natura del polimero e della tecnica di fabbricazione. La membrana funge da barriera al rilascio del farmaco; pertanto, la solubilità e la diffusibilità del farmaco nella membrana sono fattori decisivi per il processo di rilascio. I farmaci giungono ai siti di interesse nei tessuti mediante uno dei tre seguenti meccanismi fisico-chimici generali:

1. le nanoparticelle di polimero vengono idratate, provocandone il rigonfiamento e il successivo rilascio del farmaco per diffusione;
2. reazione enzimatica con conseguente rottura, scissione o degradazione del polimero, che consente il rilascio del farmaco intrappolato nel nucleo interno;
3. dissociazione del farmaco dal polimero e suo desorbimento dalle nanoparticelle rigonfie [28].

Uno degli approcci, presenti in letteratura, per migliorare la biodisponibilità e per controllare il rilascio di vitamine liposolubili utilizzando NP, comprende l'uso di estere alginato d'oleile (OAE) per incapsulare la vitamina D₃, in questo modo si formano nanoparticelle OAE-vit D₃. Questo sistema è stato studiato in vitro su cellule CaCo-2 (linea cellulare derivante dall'adenocarcinoma coloretale umano e quando coltivate in condizioni specifiche il loro fenotipo assomiglia agli enterociti che rivestono l'intestino tenue) e viene fatta una valutazione preclinica su modello murino di rachitismo correlato all'insufficienza di vitamina D. L'analisi farmacocinetica dimostra un miglioramento dell'assorbimento della vitamina D₃ in vivo con OAE [19].

Un'applicazione topica di colecalciferolo basata sul rilascio da nanosfere polimeriche è stata proposta da Ramezanli *et al.* [5]: una famiglia di copolimeri a tre blocchi biocompatibili si autoassemblano in ambiente acquoso per formare micelle polimeriche denominate TyroSpheres, questa classe unica di nanosfere polimeriche è in grado di proteggere l'attività del farmaco dall'idrolisi e dalla fotodegradazione, migliorando significativamente la stabilità della vitamina D₃ nella formulazione topica e il suo rilascio attraverso lo strato corneo.



1.8.5 Nanoparticelle inorganiche

Le nanoparticelle inorganiche, date le loro proprietà fisiche, chimiche, biologiche e superficiali, hanno suscitato enorme interesse per quanto riguarda le applicazioni nanomediche e somministrazione di farmaci. Le NP inorganiche più utilizzate sono i quantum dots (DQs), nanoparticelle di argento, titanio, ossido di zinco e silici.

Dei recenti studi si sono concentrati sulla progettazione di nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN), con pori mesoporosi (2-50 nm), come promettenti piattaforme per la consegna di vitamine lipofile a causa di alcune loro proprietà: l'elevata area superficiale, la distribuzione controllabile della dimensione dei pori, elevati volumi dei pori e capacità di essere modificate da diversi gruppi funzionali. Inoltre, rispetto ad altri portatori di farmaci a base di polimeri, gli MSN risultano più resistenti a pH, calore, tensione meccanica e degradazione indotta dall'idrolisi [33]. Modificando selettivamente la superficie con gruppi funzionali adeguati, è possibile intrappolare più molecole di farmaco all'interno dei pori e si può ottenere il rilascio di farmaci in risposta agli stimoli. Tramite questo nuovo modo di incapsulare farmaci si possono massimizzare gli effetti terapeutici e ridurre gli effetti collaterali [33].

Nel capitolo successivo, verranno descritte in dettaglio le caratteristiche e le applicazioni delle silici, in quanto sono i supporti di interesse di tale lavoro di tesi.

1.9 Psoriasi e vitamina D₃

Formulazioni topiche di vitamina D₃ attiva (calcitriolo) e dei suoi analoghi sono state utilizzate in modo localizzato per trattare le condizioni della pelle, come la psoriasi a placche. La psoriasi è una malattia genetica immuno-mediata che si manifesta nella pelle o nelle articolazioni, o in entrambi. Gli individui con questo disturbo cutaneo hanno un aumentato rischio di sviluppare altre malattie croniche e gravi per la salute, come sindrome metabolica o malattie cardiovascolari, ma anche ansia e depressione. È una malattia multiforme che è ugualmente prevalente in entrambi i sessi e i sintomi segnalati dai pazienti includono dolore, prurito e sanguinamento [34].

Esistono cinque tipi diversi di psoriasi ma la psoriasi a placche, chiamata anche psoriasi vulgaris, è la forma più comune della malattia. Le lesioni tipiche sono placche eritematose monomorfe e nettamente delimitate, possono essere poche o estendersi su aree più grandi fino a presentarsi come eritroderma che colpisce l'intera superficie corporea.

In contrasto con la pelle normale, la malattia mostra dei tratti caratteristici ossia dei cambiamenti istopatologici nelle cellule cutanee, come l'acantosi epidermica (ispessimento degli strati vitali), ipercheratosi (strato corneo ispessito) e paracheratosi (nuclei cellulari presenti nello strato corneo)[34]. Le creste della rete epidermica sono marcatamente allungate, inoltre si rilevano molte cellule T nel derma e nell'epidermide con un aumento del numero di macrofagi, mastociti e granulociti neutrofili. Queste cellule si accumulano all'interno dell'epidermide formando le pustole di Kogoj o micro ascessi subcorneali, detti anche micro ascessi di Munro (Figura 1.15) [34].

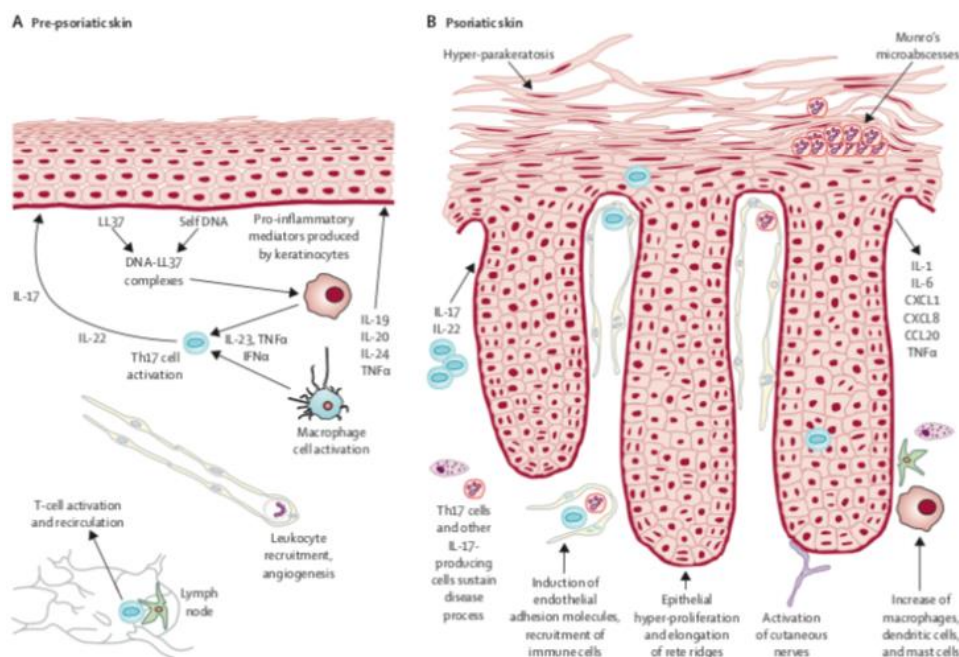


Figura 1.15: La complessa interazione dei diversi tipi di cellule cutanee durante i cambiamenti patologici nella pelle psoriasica [34].

L'interesse per l'uso della vitamina D per la psoriasi deriva dallo sviluppo di analoghi della vitamina, come il 1,25-diidrossi-22-ossacalcitriolo o maxacalcitolo [12]. Le proprietà antipsoriasiche sono suggerite dai loro effetti nel promuovere la differenziazione dei cheratinociti, ridurre la proliferazione cellulare e l'angiogenesi e nella modulazione della produzione di citochine [5].

Terapie topiche come glucocorticosteroidi, derivati della vitamina D₃ o combinazioni di entrambi sono di solito sufficienti per gestire la malattia da lieve a moderata [12].

Capitolo 2

Silici mesostrutturate

2.1 Introduzione

Negli ultimi decenni, i setacci molecolari inorganici hanno acquisito un'importanza fondamentale nell'ambito della scienza dei materiali. La classe di setacci molecolari più conosciuta è quella delle zeoliti, allumino-silicati con una struttura cristallina tridimensionalmente aperta. Questi materiali sono caratterizzati da una microporosità³ ben organizzata e interconnessa, sfruttata appunto per separare le molecole sulla base della loro dimensione [35].

La necessità di ottenere prodotti con una larghezza dei pori maggiore rispetto alle zeoliti fa sì che la maggior limitazione al loro utilizzo sia proprio la ridotta dimensione dei canali (~0.8 nm) e delle cavità (~1.3 nm) [36]. In un primo momento si è cercato di risolvere tale problema modificando il metodo di sintesi di materiali che mantenessero le caratteristiche catalitiche dei silicati e allumino-silicati microporosi, ma la difficoltà nell'ottenere fasi stabili con questi metodi ha spinto la ricerca verso la sintesi di materiali nuovi, costituiti da una struttura mesoporosa ben definita [36].

La svolta si ebbe nel 1992, quando la Mobil Research and Development Corporation fu la prima a sintetizzare una nuova famiglia di solidi mesoporosi a base silice, denominata M41S [37]. La sintesi di questi materiali si basa sulla combinazione di due strategie principali, la scienza sol-gel e la scienza dei tensioattivi per la creazione di "template" (modelli). La creazione di modelli è stata definita come un processo in cui una specie organica funziona come una struttura centrale, attorno alla quale le frazioni di ossido si organizzano in un reticolo cristallino, in modo che alla rimozione della struttura del modello, le sue caratteristiche geometriche ed elettroniche siano replicate dal materiale inorganico [38].

³ I materiali porosi possono essere classificati in base alle dimensioni dei pori: microporosi con pori di diametro < 2,0 nm, mesoporosi con pori di diametro compreso tra 2,0 nm e 50,0 nm, macroporosi con pori di diametro > 50,0 nm.

Per questo, i ricercatori della Mobil hanno introdotto, tra i reagenti, molecole di tensioattivo autoassemblanti che permettono di dirigere la formazione della struttura delle silici mesostrutturate [35]. Seguendo il loro procedimento di sintesi si potevano produrre materiali porosi altamente ordinati con porosità di dimensione > 2 nm e con aree superficiali specifiche di circa $800/1500 \text{ m}^2/\text{g}$ [39].

M41S è il termine generico per i vari tipi di materiali MCM (Mobil Composition of Matter) nella gamma mesoporosa. Tutti i materiali M41S hanno pori uniformi ben definiti che determinano l'ordine a lungo raggio, nonostante le pareti dei pori siano costituite da silice amorfa [35]. La silice, o diossido di silicio (SiO_2), è uno degli ossidi più abbondanti nella crosta terrestre. SiO_2 è il componente essenziale di tutti i materiali silicati e può presentarsi sia nella forma cristallina sia amorfa in base ai legami tra i tetraedri SiO_4 .

Modificando le condizioni di sintesi, è possibile influenzare le dimensioni dei pori e la loro disposizione spaziale, creando differenti tipologie di strutture appartenenti alla famiglia M41S (Figura 2.1). Le principali sono MCM-41 costituita da una struttura porosa esagonale unidimensionale, MCM-48 che ha una struttura porosa cubica tridimensionale, e MCM-50 organizzata secondo una struttura lamellare instabile [40].

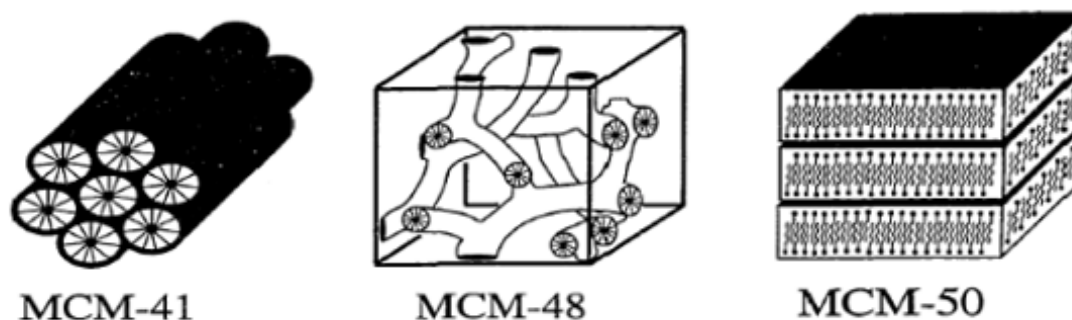


Figura 2.1: Le differenti strutture della famiglia M41S [38].

La forma esagonale MCM-41, è senza dubbio il composto più conosciuto e studiato di questa famiglia di materiali, poiché gli altri membri sono termicamente instabili o difficili da ottenere [38]. Questo composto possiede matrici molto regolari con dei canali di dimensioni uniformi, i cui diametri sono compresi tra 1,5 nm e 10 nm a seconda dei modelli utilizzati e dai parametri di reazione. I pori di questo nuovo materiale sono quindi notevolmente più grandi rispetto a quelli presenti nei materiali cristallini come le zeoliti, offrendo così nuove opportunità per applicazioni come catalisi, separazione chimica, mezzi di adsorbimento e materiali compositi avanzati [38].

Con l'introduzione di questi materiali all'inizio degli anni '90, la sintesi di solidi mesoporosi, basati su un simile meccanismo di formazione, ha subito una crescita esplosiva. Variando le condizioni di sintesi, la fonte di silice o il tipo di tensioattivo utilizzato, sono stati sintetizzati molti altri materiali mesoporosi (Figura 2.2), classificati con gli acronimi dei relativi istituti

di ricerca e aziende: Santa Barbara Amorphous (SBA), Korea Advanced Institute of Science and Technology (KIT), Michigan State University (MSU) e molti altri.

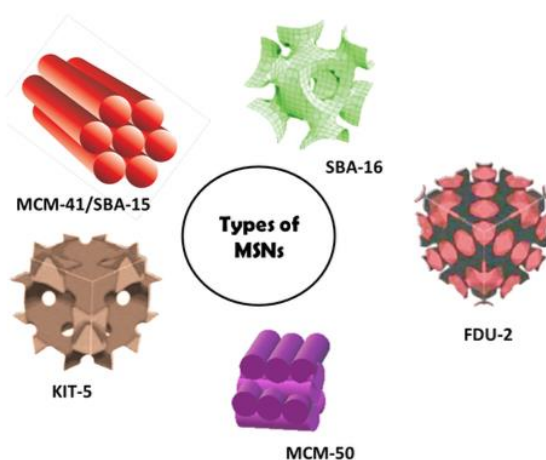


Figura 2.2: Rappresentazione dei differenti tipi di nanoparticelle di silice mesoporosa (MSNs) [37].

Nel 1998, un'importante ricerca ha prodotto un altro tipo di matrice porosa esagonale, denominata SBA-15. Questo materiale non solo è caratterizzato da pori uniformi con dimensioni maggiori, da 4,6 a 30 nm, ma anche da ottime proprietà di resistenza termica, meccanica e chimica, e questo lo rende una scelta preferibile per l'applicazione come catalizzatore [38].

Per quanto riguarda le applicazioni nel campo biomedico, negli ultimi anni le micro e nanoparticelle di silice mesoporosa hanno suscitato grande interesse, in modo particolare come *drug delivery systems*. Di queste, MCM-41, MCM-48, SBA-15 e SBA-16, grazie alle loro caratteristiche, quali elevato volume dei pori e area superficiale specifica, sono ampiamente utilizzate per la somministrazione di farmaci. Mentre MCM-50, SBA-11 e SBA-12 sono utilizzate in processi di catalisi e si comportano come eccellenti adsorbenti [37].

2.2 Definizione e classificazione di materiali porosi

I materiali porosi naturali o sintetici hanno trovato grande utilità in tutti gli aspetti delle attività umane. La loro struttura dei pori si forma solitamente nelle fasi di cristallizzazione o mediante successivo trattamento, ed è costituita da pori isolati o interconnessi che possono avere forme e dimensioni simili o differenti. La forma dei pori può essere approssimata da uno dei seguenti tre modelli di pori di base: pori cilindrici, sferici e a forma di fessura.

A seconda delle dimensioni dei pori predominanti, i materiali solidi porosi sono classificati dalla IUPAC (Figura 2.3): materiali microporosi, con diametri dei pori fino a 2,0 nm;

materiali mesoporosi, aventi dimensioni dei pori intermedie tra 2,0 e 50,0 nm; e materiali macroporosi, aventi dimensioni dei pori superiori a 50,0 nm [38].

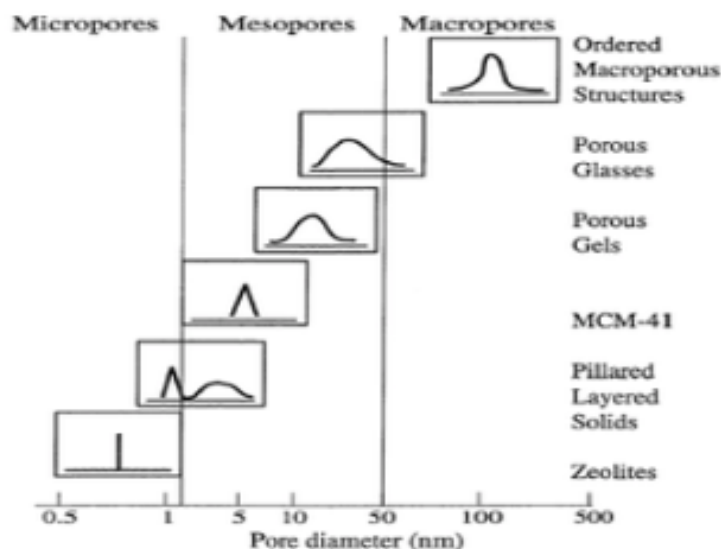


Figura 2.3: Distribuzione della dimensione dei pori per differenti materiali porosi [38].

La dimensione dei pori, generalmente indicata come diametro dei pori, ha un significato preciso solo quando la forma geometrica è ben definita. La porosità di un materiale è solitamente definita come il rapporto tra il volume dei vuoti e dei pori (aperti e chiusi) e il volume occupato dal solido [41].

I materiali porosi sono definiti anche in termini di proprietà di adsorbimento. Il termine adsorbimento indica la condensazione del gas su una superficie libera in contrapposizione al suo ingresso nella massa, come nell'assorbimento [41].

L'adsorbimento di un gas da parte di un materiale poroso è descritto quantitativamente da un'isoterma di adsorbimento, in cui si misura la quantità di gas adsorbita dal materiale a una temperatura fissa in funzione della pressione relativa. Riferendosi al fisisorbimento, le isoterme di adsorbimento/desorbimento permettono di ottenere informazioni sulla superficie specifica del materiale, sul diametro e il volume dei pori. Secondo la classificazione IUPAC (Figura 2.4), esistono sei tipi di isoterme di assorbimento caratteristici degli adsorbenti microporosi (tipo I), non porosi o macroporosi (tipi II, III e VI) o mesoporosi (tipi IV e V) [38].

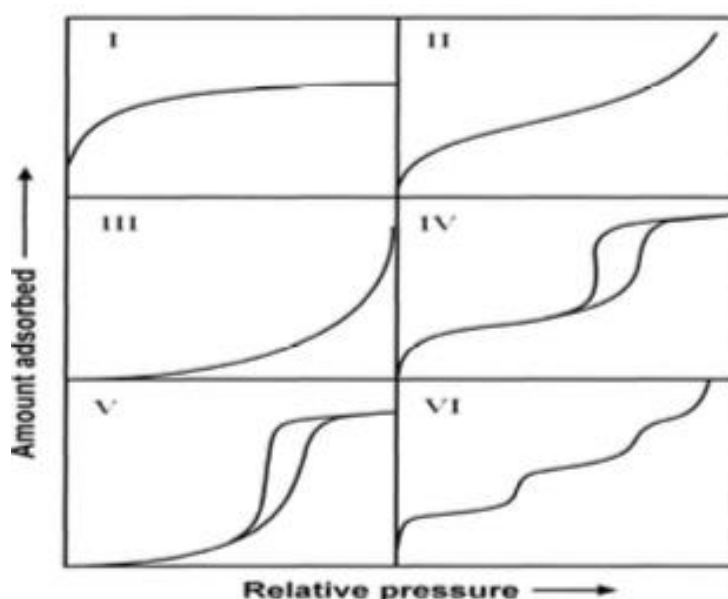


Figura 2.4: : Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [38].

- L'isoterma di **tipo I** è caratteristica dei materiali microporosi. Per bassi valori di pressione relativa si osserva un aumento rapido della curva, a cui corrisponde il riempimento dei micropori del materiale da parte dell'adsorbato. A pressioni più elevate, l'isoterma presenta un plateau indicante che il materiale non è più in grado di adsorbire nonostante l'aumento di pressione.
- L'isoterma di **tipo II** è caratteristica dei materiali macroporosi o non porosi. Nella curva è presente un punto di flesso in corrispondenza della formazione del monostrato di adsorbato; da qui, a differenza dell'isoterma di tipo I, continua a crescere all'aumentare della pressione indicando la formazione di un multistrato sulla superficie.
- Le isoterme di **tipo III e V** sono poco comuni, entrambe convesse e caratteristiche di interazioni deboli tra adsorbente e adsorbato. Inoltre, l'isoterma di tipo V presenta un'isteresi associata alla condensazione capillare nei pori.
- L'isoterma di **tipo IV** è caratteristica dei materiali mesoporosi. La proprietà principale di questa curva è il rapido tratto verticale dovuto alla condensazione capillare nei mesopori, ad una pressione di equilibrio minore della tensione di vapore dell'adsorbato. Spesso in questo tipo di isoterma si osserva la presenza di un ciclo di isteresi (come per l'isoterma di tipo V), dovuto al fatto che la curva di desorbimento non corrisponde a quella di adsorbimento. Inizialmente segue lo stesso profilo dell'isoterma di tipo II e tende a stabilizzarsi per alti valori di pressione relativa, in cui si verifica la formazione del monostrato e a seguire l'adsorbimento multistrato sulle pareti dei mesopori. Aumentando ancora il valore della pressione si verifica il fenomeno di condensazione capillare, ossia il gas adsorbito all'interno dei mesopori



non è più stabile in fase di vapore e condensa. Questa tipologia di curva è propria di molti adsorbenti industriali mesoporosi.

- L'isoterma di **tipo VI** è molto rara ed è caratteristica di materiali con superfici altamente uniformi ma prive di porosità. Presenta un andamento a scalini indicante la formazione di singoli monostrati.

2.3 Sintesi delle MCM-41

La conoscenza dei metodi di sintesi e dei parametri che influenzano il materiale finale consente l'ingegnerizzazione delle dimensioni dei pori e il controllo della morfologia e delle proprietà strutturali del materiale ottenuto.

I quattro componenti principali nella sintesi della famiglia di materiali M41S sono un tensioattivo, una sorgente di silice, un solvente e un catalizzatore basico. Quest'ultimo, oltre ad accelerare la reazione, viene utilizzato poiché il precursore di silice, essendo talvolta instabile per semplici variazioni di pH, può portare a significativi cambiamenti della struttura, e per evitare questo, è opportuno utilizzare dei modificatori.

Nel lavoro pionieristico svolto dai ricercatori della Mobil, è stato proposto un meccanismo di sintesi denominato *liquid-crystal templating* (LCT), in cui il materiale silicato occupa la regione continua del solvente (acqua) per creare pareti inorganiche tra i cilindri del tensioattivo [42]. Lo studio di Kresge *et al.* [39], per la sintesi della silice mesoporosa MCM-41, prevede l'utilizzo di alogenuri di alchiltrimetilammonio (un sale di ammina quaternaria) quale agente templante, sodio silicato (ad esempio tetraetilortosilicato TEOS) come sorgente di silice e idrossido di sodio o tetrametilammonio come additivi basici delle soluzioni acquose.

Inizialmente il processo produce un materiale mesostrutturato, ossia un composito "ibrido" organico-inorganico in cui i pori della silice sono occupati dalle micelle di tensioattivo (Figura 2.5). La sua formazione, che avviene a condizioni di pH elevato fino al raggiungimento di valori intorno a 10,5-11, è basata sulle interazioni elettrostatiche tra le molecole di tensioattivo caricate positivamente S^+ e la sorgente di silice I^- caricata negativamente presenti in soluzione [35] (le singole reazioni verranno descritte più approfonditamente nei paragrafi successivi). Per ottenere la fase esagonale, il gel ottenuto viene posto in autoclave statica a 150° C per 48 ore, favorendo la riorganizzazione micellare e la polimerizzazione del silicato di sodio. Il prodotto solido viene poi filtrato, lavato abbondantemente con acqua ed essiccato in aria a temperatura ambiente [39]. Lo step finale della sintesi consiste nella rimozione dell'agente templante, mediante un successivo trattamento termico ossia calcinazione in flusso di gas (N_2 , O_2 o aria) a 540° C per 6 ore [39]. In questo modo la fase esagonale viene privata dell'agente orientatore di struttura e resa stabile.

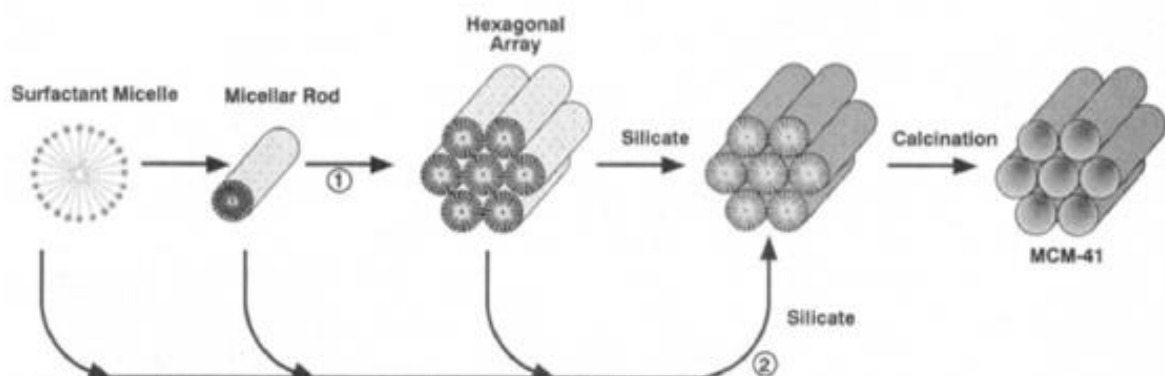


Figura 2.5: Rappresentazione schematica della formazione di MCM-41 [42].

Come si può vedere dalla figura sovrastante, i ricercatori hanno suggerito due diversi meccanismi coinvolti nel processo sintetico. Il primo è chiamato True Liquid-Crystal Templating (TLCT), avviene quando la concentrazione del tensioattivo è sufficientemente alta da consentire la formazione della fase di cristallo liquido senza richiedere la presenza del precursore inorganico. L'altro percorso indica un meccanismo di autoassemblaggio cooperativo, considerato quando la concentrazione del tensioattivo è insufficiente e la formazione della fase di cristallo liquido può essere favorita dal precursore inorganico [43]. Per entrambi i percorsi, la composizione risultante produce un materiale inorganico che imita le fasi di cristallo liquido note.

La formazione di una fase esagonale regolare dipende da molteplici parametri tra cui [35]:

- Il rapporto tensioattivo/silice (Sur/Si)
- La concentrazione di tensioattivo in soluzione
- La lunghezza della catena alchilica dell'alchiltrimetilammina
- La temperatura a cui si effettua il trattamento idrotermale
- Il tempo del trattamento idrotermale

Vartuli *et al.* [43] hanno dimostrato l'influenza delle concentrazioni relative delle specie presenti in soluzione e del rapporto molare Sur/Si sulla sintesi dei materiali M41S. Infatti, combinando TEOS e una soluzione di $C_{16}H_{33}(CH_3)_3N^+OH/Cl^-$ in varie proporzioni è possibile ottenere prodotti con fasi mesoporese differenti. La Tabella 1 riassume i risultati ottenuti dallo studio.

Tabella 1: Composizione di miscele sintetiche con differenti rapporti molari Sur/Si per la formazione di varie fasi di M41S [43].

Prodotto	Sur/Si
MCM-41	< 1 (0,6)
MCM-48	1 – 1,5
MCM-50	1,5 - 2

Nello studio di Beck *et al.* [44] del 1994, effettuato nei laboratori Mobil, è stato osservato che la combinazione di specifiche condizioni di reazione e lunghezze della catena alchilica del tensioattivo, determina la natura del prodotto silicato ottenuto. Nell'intero intervallo di temperature esaminate per il trattamento idrotermale (100-200 °C), il tensioattivo con catena alchilica più corta C₆, ha prodotto materiali zeolitici amorfi o microporosi. A 100 °C, all'aumentare della lunghezza della catena (C_n con n=8, 10, 12, 14, 16), è stata osservata la formazione di setacci molecolari mesoporosi MCM-41. In particolare, le composizioni C₁₂, C₁₄ e C₁₆ hanno prodotto materiali MCM-41 che presentano dei modelli di diffrazione a raggi X ben definiti, in cui sono presenti tre o quattro picchi (Figura 2.6). A 150 °C solo le composizioni C₁₄ e C₁₆ mostrano un discreto pattern di diffrazione esagonale, mentre non vi è evidenza di materiali MCM-41 per nessuna delle varie lunghezze della catena del tensioattivo a 200 °C.

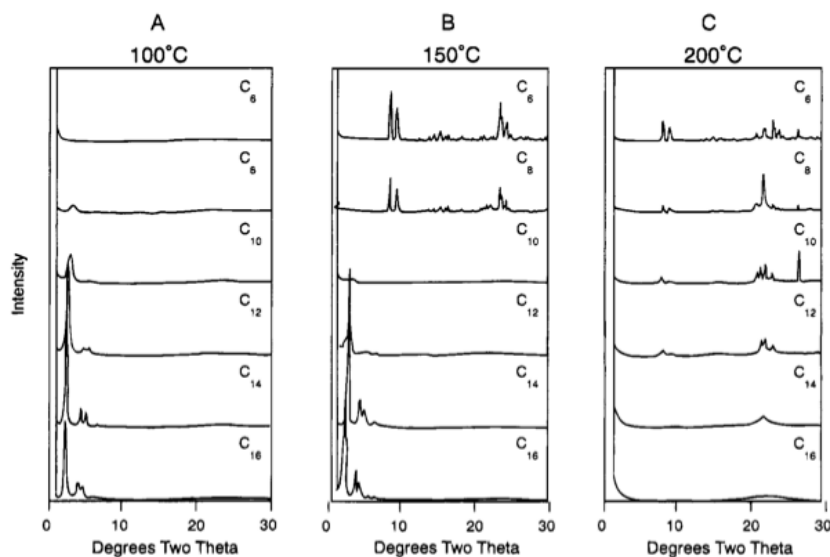


Figura 2.6: Effetto della temperatura del trattamento idrotermale e della lunghezza della catena alchilica del tensioattivo sul materiale prodotto [44].



2.3.1 Processo Sol-Gel

Uno dei percorsi consolidati per sintetizzare i materiali ibridi organici/inorganici è l'approccio sol-gel: una serie di reazioni che portano alla trasformazione di un sol in un gel. Un sol è definito come dispersione colloidale di particelle in un liquido. Un gel, al contrario, è una sostanza contenente uno scheletro solido continuo che racchiude una fase liquida continua: il liquido impedisce al solido di collassare; il solido impedisce, o ritarda, la fuoriuscita del liquido [45].

Generalmente le reazioni sol-gel sono divise in due fasi, la prima è l'idrolisi di alcossidi metalli $[Me^+(OR)_n]$ per produrre gruppi idrossilici, seguita dalla policondensazione dei gruppi idrossilici e dei gruppi alcossilici residui, per formare una rete inorganica tridimensionale [38].

La sintesi chimica sol-gel è stata ampiamente studiata dagli anni '70, quando venne utilizzata per la preparazione di materiali inorganici come vetri e ceramiche. Infatti, con questo metodo è possibile produrre vetri di ossido inorganico omogenei e di elevata purezza a temperatura ambiente, molto inferiore rispetto alle temperature richieste dai processi convenzionali di produzione del vetro [38].

Gli alcossidi metallici sono i reagenti più utilizzati per sintetizzare i colloidi, data la loro facilità di idrolisi in presenza di acqua. Tra loro, gli alcossidi di silicio, o alcossisilani, quali il tetrametossisilano $Si(OCH_3)_4$ (TMOS) e il tetraetossisilano $Si(OCH_2CH_3)_4$ (TEOS), sono ampiamente utilizzati per la produzione di gel di silice.

La Figura 2.7 mostra le reazioni di idrolisi e condensazione che subisce il TEOS. La fase di idrolisi avviene mediante l'aggiunta di acqua alla soluzione di TEOS in condizioni neutre, acide o basiche.

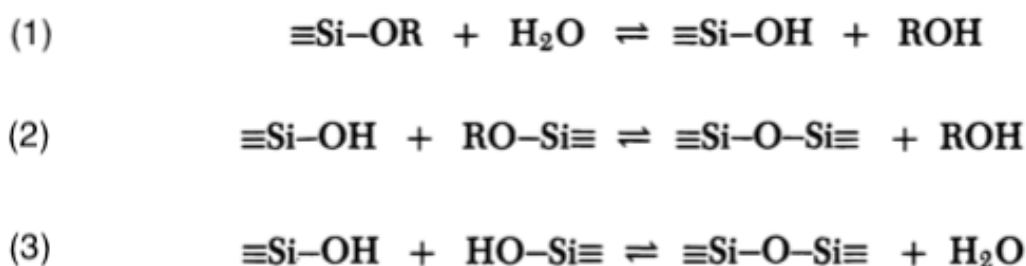


Figura 2.7: Schema generale delle reazioni sol-gel [45].

La reazione di idrolisi (1) avviene mediante l'aggiunta di acqua alla soluzione di TEOS, si sostituiscono i gruppi alcossidi con gruppi ossidrilici e questo porta alla formazione di una molecola di silanolo ($Si-OH$) e una di alcol.

Nelle successive reazioni di condensazione il gruppo silanolo si condensa con un gruppo alcossido (2) o un altro gruppo silanolo (3), producendo forti legami silossanici (Si-O-Si) più i sottoprodotti, rispettivamente un alcol o una molecola d'acqua.

Generalmente, sia le reazioni di idrolisi che di condensazione si verificano simultaneamente una volta che la reazione di idrolisi è iniziata.

All'aumentare del numero di ponti Si-O-Si, le particelle di silossano possono aggregarsi in un sol, che si disperde nella soluzione in piccoli ammassi di silicato. La condensazione di quest'ultimi porta alla formazione di un gel, che intrappola i sottoprodotti a basso peso molecolare come alcol e acqua. Queste piccole molecole devono essere rimosse dal sistema e tale rimozione porta a una rete tetraedrica di silice. La rimozione di questi sottoprodotti può avvenire tramite trattamento termico o lavaggi in acqua e/o solventi e contribuisce anche all'elevata contrazione che si verifica durante il classico processo sol-gel [45].

Le reazioni di idrolisi e condensazione possono avvenire in condizioni neutre, acide o basiche. Il meccanismo e la velocità di reazione sono fortemente influenzati dal tipo di catalizzatore, e quindi dal pH, oltre che dal rapporto acqua/TEOS e dal solvente impiegato.

La Figura 2.8 sottostante riporta le reazioni catalizzate in ambiente basico:

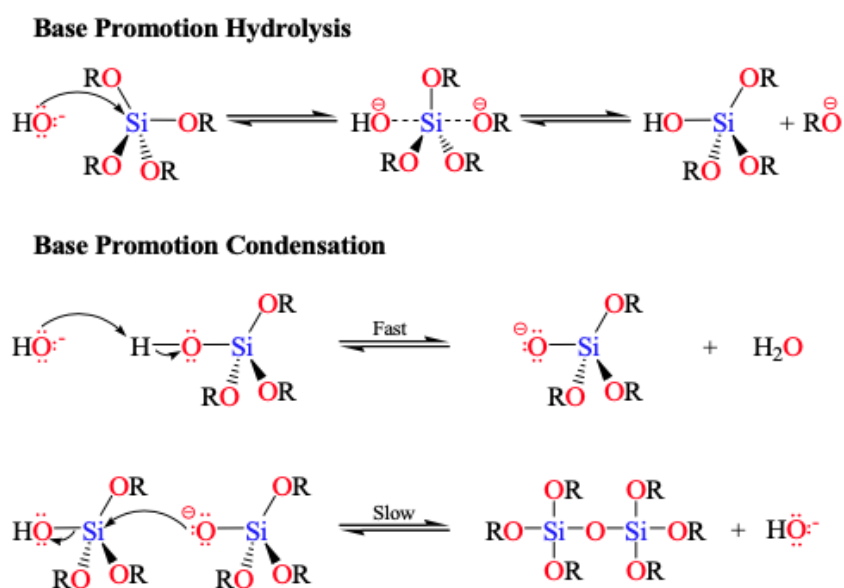


Figura 2.8: Reazioni di idrolisi e condensazione utilizzando catalizzatore basico [38].

In questo caso il catalizzatore basico che viene utilizzato per la formazione della silice è uno ione ossidrile. Quest'ultimo funge da nucleofilo che attacca il centro dell'atomo di silicio del TEOS. Il risultato di questa fase di idrolisi è la formazione di un silanolo e uno ione alcossido. Il primo passo nel processo di condensazione è l'estrazione del protone del silanolo da parte dello ione idrossido, che porta alla formazione dello ione silossido e acqua. Successivamente, viene formato un legame silossanico attraverso l'attacco dello ione silossido sul silicio centrale di un'altra molecola di silanolo. Questa fase rigenera il catalizzatore ione idrossido

e determina complessivamente la velocità delle reazioni di condensazione in quanto, è uno stadio lento rispetto all'attacco nucleofilo [38].

Le velocità di entrambe le reazioni di idrolisi e condensazione dipendono fortemente dal pH, come mostrato nella Figura 2.9. Ad esempio, a $\text{pH} \approx 7$, l'idrolisi molecolare avviene a una velocità lenta, mentre la condensazione molecolare si verifica a una velocità rapida. Questa relazione inversa tra le velocità delle due fasi controlla sia la cinetica della reazione che la struttura e morfologia della rete finale.

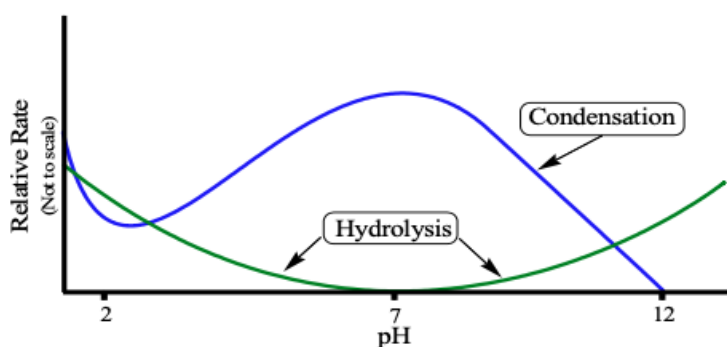


Figura 2.9: Effetto del pH sulla velocità della reazione di idrolisi e di condensazione [38].

Osservando il grafico, si può capire che l'idrolisi sembra ben catalizzata sia in ambiente acido che in ambiente basico e ha minima velocità di reazione in corrispondenza di $\text{pH} = 7$, mentre la reazione di condensazione intorno a $\text{pH} = 4,5$. La cinetica della reazione quindi varia con il completarsi del processo.

In condizioni acide, per $\text{pH} < 5$ è favorita l'idrolisi e la condensazione rappresenta lo stadio cineticamente determinante. Questo porta alla produzione di reti più lineari con meno legami silossanici e un'alta concentrazione di gruppi silano. Al contrario, a $\text{pH} > 5$ l'idrolisi è lo stadio cineticamente determinante. In queste condizioni le specie idrolizzate vengono immediatamente consumate a causa di una condensazione più veloce, ottenendo materiali altamente densi con meno gruppi silano nella rete complessiva [38].

2.3.2 Ruolo Del Tensioattivo

Il processo di sintesi dei materiali mesoporosi si basa sul fatto che le molecole di tensioattivo si comportano come componenti attive che generano strutture variabili in base alla loro concentrazione [38].

I tensioattivi sono grandi molecole organiche con carattere anfifilico, formate da componenti idrofile (testa polare) e idrofobiche (catena idrocarburica non polare), che a basse concentrazioni esistono in soluzione principalmente come mono-molecole. Con l'aumentare della concentrazione, al di sopra della Concentrazione Micellare Critica (CMC), le molecole anfifiliche si aggregano tra loro formando micelle isotropiche (Figura 2.10). Quindi, viene

raggiunta la configurazione energetica minima e le micelle prodotte sono in equilibrio con le molecole di tensioattivo in soluzione.

Man mano che la concentrazione del tensioattivo aumenta, è possibile indurre la formazione di altre mesofasi; infatti, al di sopra della seconda concentrazione micellare critica (CMC2), le micelle sferiche iniziano a trasformarsi in micelle cilindriche [38].



Figura 2.10: Molecole di tensioattivo, micelle sferiche e micelle cilindriche.

Tali micelle, a loro volta, possono auto-organizzarsi in strutture supramicellari e, a seconda dei parametri già citati, quali la natura del tensioattivo utilizzato, la sua concentrazione, la lunghezza della catena idrofobica, la temperatura e il pH della soluzione, si possono ottenere tre diverse fasi di aggregati: esagonale, cubica e lamellare. In tal modo, variando i parametri di sintesi, si ottengono differenti forme di *templating agent* [38].

Questo tipo di approccio si basa sul *self-assembly* o *auto-assemblaggio* molecolare, un processo in cui le molecole (o parti di molecole) formano spontaneamente aggregati ordinati senza l'influenza di azioni esterne.

Il *templating* è stato definito, in senso generale, come un processo in cui una specie organica funge da struttura centrale, attorno alla quale le frazioni di ossido si organizzano in un reticolo cristallino. Questa definizione è stata elaborata anche per racchiudere il ruolo delle molecole organiche come (1) specie che riempiono lo spazio; (2) agenti che direzionano la formazione della struttura; e (3) modelli [44].

Nel caso più semplice di riempitivo per i pori (ruolo 1), la specie organica serve a generare lo spazio di quelli che saranno i futuri pori, attorno al quale si cristallizza l'ossido. Pertanto, la stessa molecola organica può essere utilizzata per sintetizzare differenti strutture. Nel caso di direzione strutturale (ruolo 2) la struttura di ossido risultate non imita necessariamente in modo identico la forma della molecola organica. Infatti, oltre alla componente di direzione strutturale, nelle silici mesoporose in cui le molecole organiche fungono da vero modello (ruolo 3) è necessaria una stretta interazione tra il reticolo di ossido e la forma organica, in modo tale che il reticolo sintetizzato contenga la fase organica bloccata in posizione [44].

Il tipo di mesofase ottenuto può essere previsto in una certa misura dal rapporto di impacchettamento molecolare del tensioattivo, definito dall'equazione seguente:



$$g = \frac{V}{a_0 l}$$

Dove V rappresenta il volume totale delle catene idrocarburiche, a_0 l'area effettiva del gruppo di testa sulla superficie delle micelle e l la lunghezza effettiva della catena del tensioattivo [40]. Il fattore g comprende l'equilibrio idrofobico-idrofilico, quindi descrive la tendenza delle catene alchiliche a minimizzare il loro contatto con l'acqua e massimizzare le loro interazioni inter-organiche. Quando il valore di g aumenta al di sopra di un valore critico si verificano transizioni di mesofase che possono essere riassunte nella Tabella 2 [35]:

Tabella 2: Panoramica dei valori di g e la mesofase prevista [35].

Fattore g	Mesofase
1/3	cubica
1/2	esagonale
1	lamellare

L'interazione tra le molecole del tensioattivo e quelle delle specie inorganiche guida la formazione della mesofase. Esiste quindi un'interfaccia chiaramente definita tra le parti organiche e inorganiche del materiale, dovuta a diversi tipi di interazioni, come le interazioni elettrostatiche, legami a idrogeno o forze di Van der Waals, che si instaurano tra le strutture supramolecolari del tensioattivo e le molecole del precursore [38]. A pH basico l'interazione è tra la testa cationica del tensioattivo S^+ e la sorgente di silice caricata negativamente I^- presenti in soluzione, il meccanismo di formazione (Figura 2.11) può essere riassunto nei seguenti punti:

1. Le molecole di tensioattivo si dispongono in micelle e, a seconda della concentrazione, assumono forma sferica o a bastoncino (rod-shaped). Dopodiché, si organizzano in una struttura supramicellare esagonale, senza però condensare tra loro a causa della carica superficiale.
2. Il TEOS, precursore della silice, viene aggiunto alla miscela di reazione e, in condizioni specifiche di pH e temperatura, subisce le prime reazioni di idrolisi e condensazione attorno agli stampi degli aggregati supramicellari. In questo modo, si riduce la carica superficiale e le micelle si avvicinano.
3. Al termine delle reazioni di reticolazione si ottiene un materiale solido mesostrutturato, composto da ossido di silicio e micelle di tensioattivo.
4. I materiali mesoporosi finali sono ottenuti per successiva rimozione del tensioattivo mediante un processo termico ad alta temperatura (calcinazione) o estrazione con solventi adeguati.

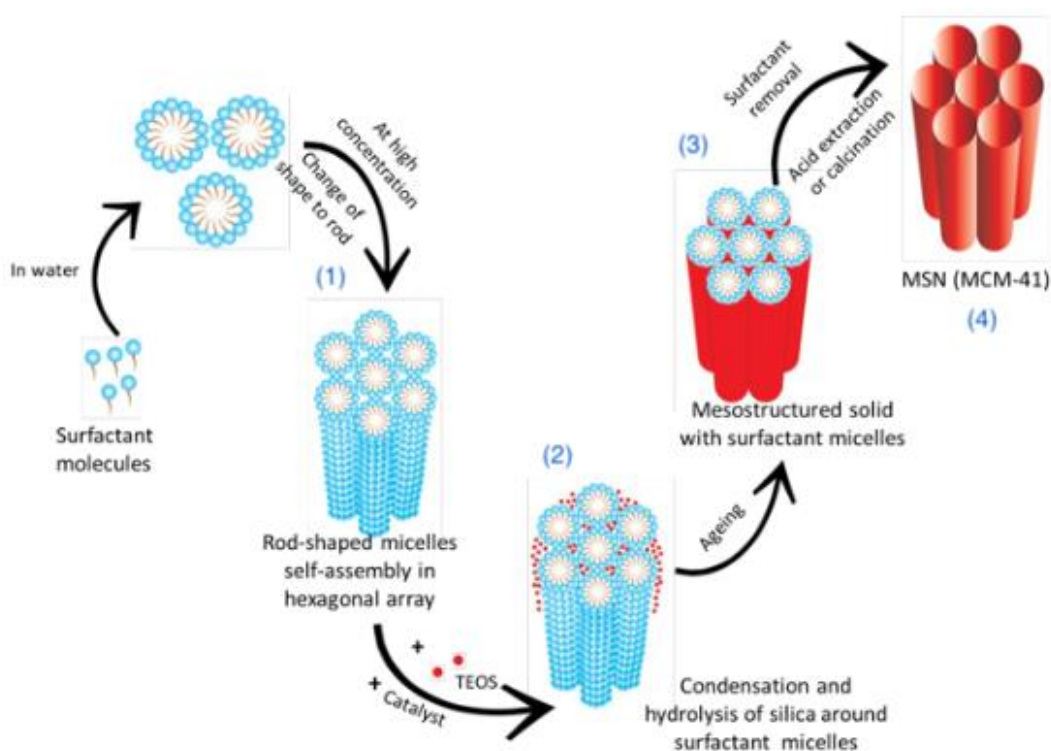


Figura 2.11: Meccanismo di formazione delle MCM-41 [37].

2.3.3 Rimozione Del Tensioattivo

La strategia di sintesi conduce ad un materiale solido mesostrutturato, consistente in un composito silice-tensioattivo. A questo punto, è necessario realizzare un processo di rimozione del tensioattivo, in modo da rendere accessibili le porosità della silice completamente occupate dalle micelle.

Il metodo utilizzato per la rimozione dei modelli gioca un ruolo significativo nel determinare le caratteristiche della silice mesoporosa finale.

Generalmente, la rimozione del tensioattivo viene effettuata tramite calcinazione, ossia un trattamento termico condotto ad una temperatura uguale o superiore a 500 °C per 4-6 ore.

Questo metodo di rimozione svolge la funzione di consolidare il materiale poiché incrementa il cross-linking della silice, ma può influenzare l'area superficiale, la dimensione e il volume dei pori dei materiali M41S, inoltre è stata riscontrata una contrazione volumica del 14-20% della struttura a causa della differenza nelle proprietà termiche tra le due fasi [46].

Nonostante la calcinazione rimuova più efficacemente il tensioattivo, per evitare gli inconvenienti che ne conseguono, possono essere impiegati altri metodi, tra cui l'estrazione con solvente e l'estrazione con fluidi supercritici. L'estrazione con solvente viene condotta in presenza di solvente (etanolo, metanolo) o con una miscela di HCl e solvente, alla temperatura di riflusso (ad esempio 30-100 °C) per il tempo richiesto e rappresenta



un'alternativa valida alla classica rimozione perché permette di mantenere facilmente l'integrità della silice mesoporosa. Tuttavia, con questo processo, nella superficie interna dei pori resta una frazione di tensioattivo residua, nonché di gruppi etossilici. Per questo motivo l'estrazione deve comunque essere seguita da uno stadio di calcinazione [46].

Un metodo nuovo e alternativo per allontanare il tensioattivo è l'estrazione con fluidi supercritici, con cui si può recuperare più del 90% del tensioattivo. Ciò dovrebbe comportare risparmi significativi poiché i modelli recuperati possono essere riutilizzati in sintesi future, senza subire fenomeni di degradazione. Rispetto al materiale MCM-41 calcinato, il prodotto che si ottiene presenta delle proprietà fisiche superiori, con una distribuzione della dimensione dei pori più uniforme e un raggio medio dei pori superiore. Inoltre, questo metodo consente di utilizzare temperature molto più basse sui materiali mesoporosi sintetizzati, i cui mesopori potrebbero facilmente collassare sotto calcinazione a temperature troppo elevate o per tempi troppo lunghi [47].

▪ Supercritical fluid extraction

La 'supercritical fluid extraction' o SFE è un metodo rapido ed efficiente di estrazione che non utilizza un solvente organico, bensì un fluido supercritico. Generalmente, viene utilizzato nell'estrazione di prodotti alimentari e nutraceutici (es. caffè) [48].

Secondo la definizione IUPAC, un fluido supercritico è qualsiasi elemento, sostanza o miscela che presenta valori di pressione e temperatura al di sopra dei valori "critici". Superato il punto critico, esiste un'unica fase con caratteristiche fisiche intermedie tra quelle di un liquido e quelle di un gas: la viscosità e le proprietà di trasferimento di massa sono simili a quelle di un gas, ma la densità e le caratteristiche di solvatazione sono simili a quelle di un solvente liquido.

Tabella 3: Range di valori di diverse proprietà chimico-fisiche di gas, liquidi e fluidi supercritici [48].

Stato del fluido	Densità (ρ , g/cm ³)	Diffusività (D_{AB} , cm ² /s)	Viscosità (μ , g s/cm)
Gas (P=1 atm, T=21 °C)	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Liquido (P=1 atm, T= 15-30 °C)	1	< 10 ⁻⁵	10 ⁻²
Supercritico (P _c , T _c)	0,3 – 0,8	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ – 10 ⁻³

Variando opportunamente temperatura e/o pressione, si possono modificare la densità e il potere solvente del fluido, in modo da adattarle alla solubilità del componente di interesse, rendendo l'estrazione altamente selettiva.

Nella pratica, l'anidride carbonica supercritica (scCO_2) è uno dei fluidi supercritici maggiormente utilizzati poiché risulta avere le seguenti proprietà: inodore, incolore, non tossico, non infiammabile, non corrosivo, riciclabile, poco costoso e facile da maneggiare. Inoltre, presenta parametri critici relativamente bassi, quindi facilmente raggiungibili. La temperatura critica $T_c = 31,1^\circ\text{C}$ è molto vicina alla temperatura ambiente, mentre la pressione critica è mediamente alta $P_c = 73,8\text{ bar}$ (Figura 2.12). Abbassando la pressione a condizioni ambientali il biossido di carbonio è un gas, condizione che lo rende facilmente separabile dal soluto. Tutti questi vantaggi hanno reso l'estrazione tramite scCO_2 un'alternativa promettente per separare i componenti termicamente sensibili da stampi organici [47].

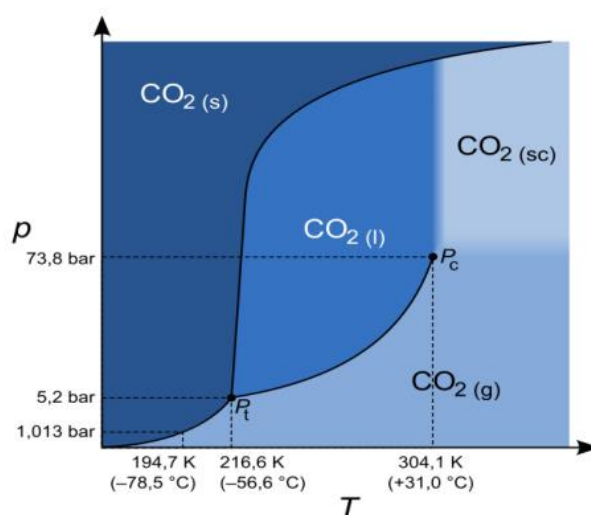


Figura 2.12: Diagramma di fase dell'anidride carbonica [49].

Tuttavia, la scCO_2 presenta alcune limitazioni, legate alle sue proprietà fisico-chimiche e alla sua configurazione. Infatti, essendo una molecola lineare con nessun momento dipolo netto, possiede un potere dissolvente piuttosto limitato verso specie polari e ioniche. Di conseguenza, non è utilizzabile come unico solvente con tutti i composti, ma è possibile aumentare la sua polarità e la gamma di materiali che possono essere estratti aggiungendo un co-solvente. Per tale scopo, l'etanolo e il metanolo sono i co-solventi maggiormente utilizzati [50].

Nello lavoro di Huang *et al.* [50], le silici mesoporose esagonali sintetizzate sono state successivamente sottoposte ad estrazione utilizzando scCO_2 potenziata con metanolo, come modificatore polare per aumentare il potere solvatante del fluido, per rimuovere il tensioattivo. Uno schema della configurazione sperimentale è rappresentato in Figura 2.13.

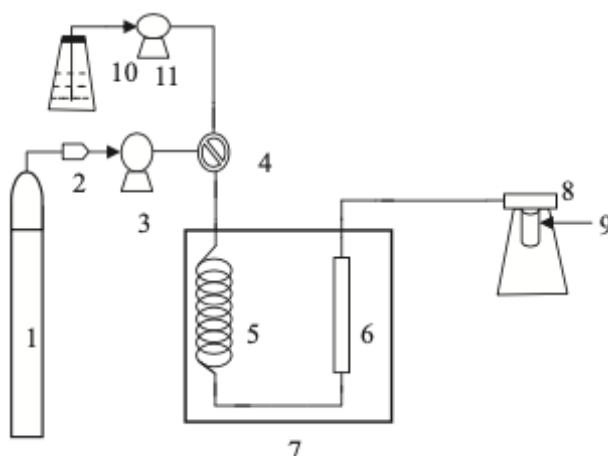


Figura 2.13: Apparato sperimentale per l'estrazione tramite $scCO_2$: (1) bombola di CO_2 ; (2) chiller per il raffreddamento; (3) pompa del liquido; (4) valvola di commutazione; (5) bobina di pre-miscelazione; (6) recipiente di estrazione; (7) forno; (8) regolatore di contropressione; (9) tubo di raccolta; (10) serbatoio del modificatore; (11) pompa a siringa del modificatore [50].

Anidride carbonica ad elevata purezza, dopo liquefazione a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, viene pressurizzata in una zona di pre-miscelazione posta in un forno a temperatura controllata. Il metanolo liquido viene introdotto direttamente nel sistema da una pompa a siringa a diverse portate. La serpentina di pre-miscelazione deve essere sufficientemente lunga da garantire che co-solvente e $scCO_2$ vengano miscelati completamente prima di entrare nell'unità di estrazione, alle cui estremità è presente un filtro da $0,5\text{ }\mu\text{m}$ per eliminare il trascinamento. Il fluido passa poi nel recipiente di estrazione, dove si diffonde rapidamente nella matrice solida e dissolve il materiale da estrarre. In uscita dal recipiente, il tensioattivo disciolto con co-solvente/ CO_2 viene depressurizzato a pressione atmosferica, determinando la deposizione del materiale estratto. Successivamente, la CO_2 può essere raffreddata, ricompresa e riciclata o scaricata nell'atmosfera [50].

2.4 Silici mesoporose come sistemi per il rilascio di farmaco

Poiché la silice è riconosciuta come sicura dalla FDA (Food and Drug Administration), una delle sue possibili applicazioni è nel campo biomedicale, come sistema di somministrazione locale di farmaci.

È stato dimostrato che la silice è in grado di immagazzinare e rilasciare gradualmente farmaci rilevanti dal punto di vista terapeutico. Inoltre, viene utilizzata per migliorare la biocompatibilità di diversi *drug delivery system*, come nanoparticelle magnetiche, biopolimeri e micelle [16]. Vallet-Regi *et al.* [51] sono stati i primi ad esplorare le proprietà di rilascio dei farmaci delle *ordered mesoporous silica* (OMS) utilizzando ibuprofene. Le OMS



mostrano anche la capacità di dissoluzione di farmaci scarsamente solubili in acqua, pertanto permettono di ottenere una maggiore biodisponibilità di questi farmaci.

I metodi sintetici convenzionali per la preparazione di materiali di silice mesoporosa danno origine a particelle amorfe con diverse forme e dimensioni. La polidispersione e la natura amorfa delle silici mesoporose rappresentano una sfida importante nel controllo delle proprietà di trasporto di massa a livello nanometrico, che è di fondamentale importanza per la somministrazione di farmaci e il rilascio controllato nei sistemi biologici [16].

Le seguenti proprietà delle *mesoporous silica nanoparticles* (MSN) hanno attirato molta attenzione da parte del mondo scientifico per varie applicazioni di distribuzione a rilascio controllato:

- Elevata area superficiale specifica. È possibile ottenere silici con aree maggiori di $1000 \text{ m}^2/\text{g}$;
- Dimensione dei pori uniforme e regolabile. La distribuzione delle dimensioni dei pori delle MSN è molto stretta e il diametro dei pori può essere regolato tra 2 e 10 nm;
- Alto volume dei pori ($> 0,9 \text{ cm}^3/\text{g}$), consente carichi elevati di molecole di farmaco;
- Agendo direttamente sul processo di sintesi, è possibile controllare la morfologia delle particelle, variandone sia le dimensioni che la funzionalizzazione;
- Struttura stabile e rigida. Rispetto ad altri trasportatori di farmaci a base di polimeri, le MSN sono più resistenti al calore, al pH, allo stress meccanico e alle degradazioni indotte dall'idrolisi. Caratteristica dovuta ai forti legami Si-O che inibiscono la necessità di qualsiasi altro elemento stabilizzante esterno;
- Superficie contenente un'alta quantità di silanoli (utili per creare legami con il farmaco o per eventuali funzionalizzazioni);
- Tossicità nulla a contatto con i sistemi cellulari.

Di seguito verranno descritte le proprietà strutturali delle silici mesoporose che influiscono maggiormente sulle loro performance.

2.4.1 Dimensione delle particelle

Uno dei parametri più importanti che devono essere tenuti in considerazione quando si parla delle applicazioni in campo biomedicale è la dimensione delle particelle. Infatti, è ampiamente dimostrata la correlazione tra questo parametro e l'efficienza dell'assorbimento cellulare e la possibilità di penetrare attraverso membrane/tessuti [52].

La dimensione delle MSN può essere regolata da 50 a 200 nm in base alle condizioni di sintesi. Ad esempio, influenzando le cinetiche di reazione dell'idrolisi e della condensazione si possono ottenere particelle di dimensioni differenti.

Questo fattore ha un impatto importante sulla biodistribuzione del materiale, come le interazioni delle particelle con il sistema reticoloendoteliale (RES) e il tempo di circolazione



delle particelle nel corpo umano. Nanoparticelle mesoporose più piccole consentono una maggiore endocitosi da parte delle cellule, tuttavia, particelle con un diametro inferiore a 50 nm possono anche essere facilmente esocitate dalle cellule mirate [52]. Inoltre, è stata evidenziata l'influenza della dimensione delle particelle sulla biocompatibilità delle stesse. Ariano *et al.* [53] hanno confrontato l'effetto di due tipologie di nanoparticelle di silice (NPs), con diametro di 50 e 200 nm, sulle cellule neuronali GT1-7. Per identificare le risposte cellulari, vengono analizzati i cambiamenti della concentrazione del calcio intracellulare indotti dalla somministrazione delle due nanoparticelle di silice. I risultati hanno dimostrato che in base alla taglia delle NPs si possono indurre effetti tossici sulle cellule neuronali. In particolare, le NPs con diametro pari a 50 nm possono stimolare i processi apoptotici in modo dose-dipendente, mentre la silice a 200 nm non mostra alcun effetto tossico anche a concentrazione relativamente elevate.

2.4.2 Area superficiale

La fase di drug-loading è una fase cruciale nella preparazione del DDS ed è basata principalmente sull'adsorbimento di molecole sulla superficie della silice. La superficie è il luogo in cui avvengono le interazioni tra il carrier e la molecola, quindi ha un ruolo fondamentale nello stabilire il quantitativo di principio attivo che il materiale mesoporoso può riuscire ad adsorbire [37]. È conveniente avere a disposizione un'area superficiale elevata poiché permette un caricamento maggiore dell'agente terapeutico che poi verrà rilasciato nel corpo umano. Tuttavia, occorre sempre considerare i possibili effetti di tossicità del principio attivo.

2.4.3 Taglia dei pori

La dimensione dei pori determina la dimensione massima delle molecole che possono essere adsorbite, quindi se un farmaco specifico può penetrare all'interno dei mesopori o no. Generalmente, un diametro dei pori leggermente più grande del diametro delle molecole di farmaco è sufficiente per favorirne l'assorbimento [51].

La taglia dei mesopori può essere regolata da 2 nm a decine di nanometri variando il tipo di tensioattivo usato durante la sintesi. La scelta adeguata della lunghezza della catena alchilica del tensioattivo utilizzato permette di diminuire o aumentare la dimensione dei pori, costruendo un carrier "su misura" per un determinata molecola [51].

È stato proposto che la dimensione dei pori abbia una profonda influenza non solo nel caricamento dei farmaci, ma anche sulla velocità di rilascio degli stessi, come riportato utilizzando l'ibuprofene. Nello studio di Vallet-Regi *et al.* sono stati utilizzati due tipi di tensioattivi per ottenere silici con differenti dimensioni dei pori e i risultati dimostrano che le MCM-41 con pori più grandi permettono un rilascio maggiore di ibuprofene dopo 24 ore

[51]. Tuttavia, per quanto riguarda la cinetica di rilascio occorre considerare anche la connettività dei pori e l'eventuale modalità di degradazione della matrice.

Molti materiali per la somministrazione di farmaci hanno strutture porose interconnesse in cui è necessario un "capping" perfetto per evitare un rilascio prematuro del farmaco, al contrario, le MCM-41 presentano una struttura porosa esagonale bidimensionale a nido d'ape, con pori cilindrici che vanno da un'estremità all'altra della particella (Figura 2.14). Quindi non è presente un'interconnessione tra i singoli canali porosi, il che significa che questi mesopori fungono da serbatoi indipendenti per l'incapsulamento e il rilascio di farmaco, purché entrambe le estremità di un dato canale siano limitate [16].

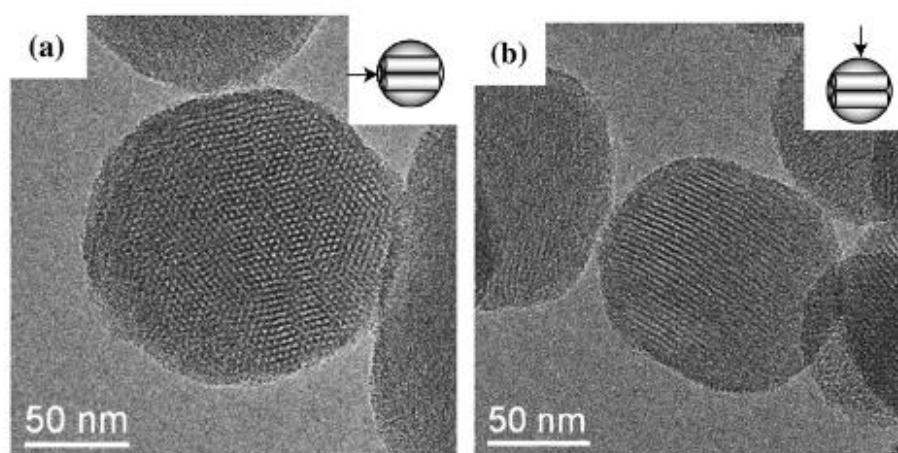


Figura 2.14: Immagini di MSN nella direzione (a) parallela e (b) perpendicolare all'asse lungo dei mesocanali [16].

2.4.4 Volume poroso

La superficie dei mesopori è responsabile dell'interazione con il farmaco caricato, quindi c'è un iniziale fenomeno di adsorbimento che coinvolge unicamente la superficie. Successivamente, l'aggiunta di ulteriore farmaco può portare al riempimento dei pori con l'instaurarsi di interazioni deboli farmaco-farmaco. A questo punto, il volume dei pori diventa un parametro fondamentale per determinare il quantitativo massimo di farmaco che il materiale può incorporare [51].

Poiché la dimensione dei pori è solitamente inferiore a 15 nm e le aree della superficie sono di circa 1000 m²/g, i volumi dei pori sono generalmente nell'intorno di 2,0 cm³/g.

Questi elevati volumi porosi portano le MSN ad avere una maggiore capacità di carico del farmaco rispetto ad altri carrier [37]. Tuttavia, per migliorare ulteriormente il caricamento delle MSN sono state sintetizzate recentemente delle nanoparticelle di silice mesoporosa cave (HMSN), ampiamente usate nella terapia del cancro e nell'imaging. Presentano al loro interno una grande cavità in grado di trattenere una quantità di farmaco maggiore rispetto



alle nanoparticelle di silice convenzionali, caratteristica che è stata dimostrata utilizzando l'ibuprofene come farmaco modello [37].

2.5 Funzionalizzazione dei mesopori

Un ruolo chiave nello sviluppo di materiali mesoporosi di silice come drug delivery system è svolto dalla modifica o funzionalizzazione della superficie attraverso gruppi funzionali.

Le MSN possiedono due superfici funzionali, la superficie interna dei pori e la superficie particellare esterna. Questa caratteristica consente la funzionalizzazione selettiva delle superfici interne e/o esterne [16].

Le molecole di silice sulla superficie del materiale possono essere idratate facilmente formando dei silanoli ($\text{Si}-\text{OH}$), si ottiene, quindi, una superficie caratterizzata da un'elevata presenza di gruppi funzionali che vengono sfruttati per aumentare le interazioni con le molecole di farmaco. Infatti, i gruppi silanoli possono essere utilizzati per graffiare il farmaco sul supporto o per funzionalizzare la superficie con gruppi chimici in grado di legarsi alle molecole dell'agente terapeutico attraverso legami ionici o esterei.

Questa modifica offre numerose possibilità per controllare l'assorbimento e il rilascio dei farmaci. A tal proposito, un aspetto molto importante da tenere in considerazione è che la funzionalizzazione comporta una diminuzione del diametro e del volume dei pori, con conseguente minor carico di molecole di farmaco [51].

La polarità del gruppo ossidrile dei silanoli spiega il carattere di donatore di legami a idrogeno che si possono formare con atomi accettori, quali N e O. Tuttavia, anche l'ossigeno dei silanoli può agire da accettore di atomi idrogeno da parte di altri gruppi funzionali. La Figura 2.15 raccoglie alcuni dei gruppi funzionali più utilizzati assieme a diversi farmaci impiegati in questi sistemi [51].

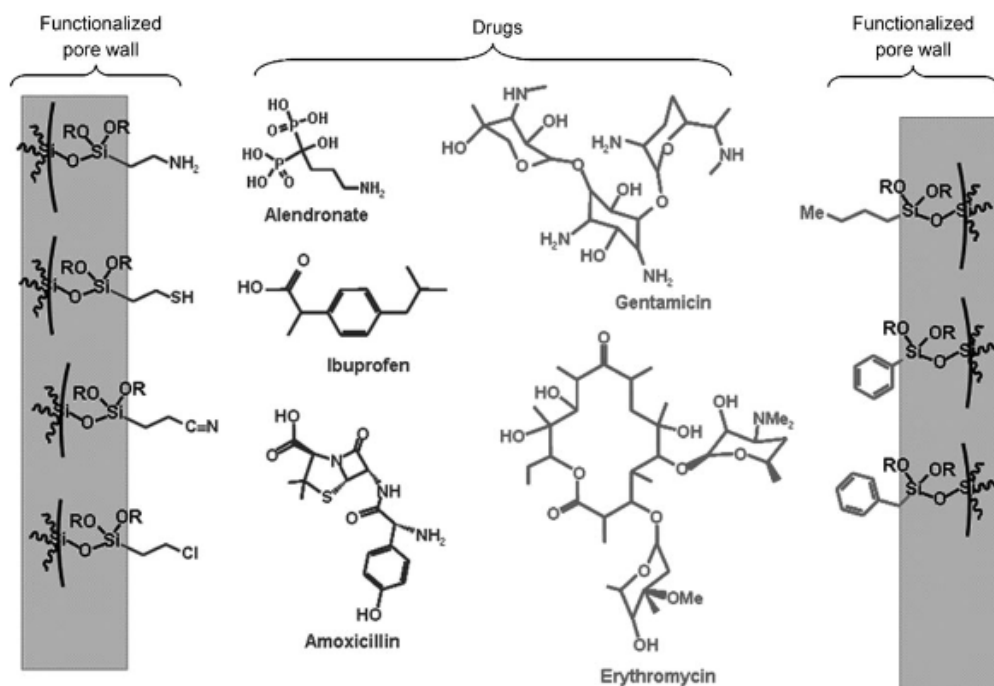


Figura 2.15: Funzionalizzazione della parete in materiali mesoporosi di silice e strutture di diversi farmaci utilizzati in questi sistemi [51].

I gruppi funzionali possono essere incorporati nei materiali mediante uno dei seguenti metodi: grafting (modifica post-sintesi) e co-condensazione o sintesi diretta [38].

Il metodo di *grafting* (Figura 2.16), o innesto post-sintesi, consiste nella modifica della superficie dei pori dei materiali prefabbricati con composti organosilatici, dopo la rimozione del tensioattivo.

La sililazione è la reazione più comunemente usata per la modifica della superficie, si verifica tra tutti i gruppi superficiali della silice, inclusi i silanoli liberi e geminali⁴, e i derivati del trialossisilano ((R'O)₃SiR)). Seguendo questo metodo, la funzionalizzazione può essere effettuata con una vasta gamma di gruppi organici semplicemente variando il residuo organico R.

Un ulteriore vantaggio è che la mesostruttura originaria del supporto viene generalmente mantenuta dopo la modifica. Tuttavia, i materiali ospitanti devono essere completamente seccati prima di aggiungere precursori di modifica al fine di evitare l'auto-condensazione dei precursori in presenza di acqua [38].

⁴ In chimica, si definisce geminale la relazione tra due atomi o gruppi funzionali attaccati allo stesso atomo. La parola deriva dal latino *geminus* che significa "gemelli". Il prefisso abbreviato *gem* può essere applicato a un nome chimico per denotare questa relazione.

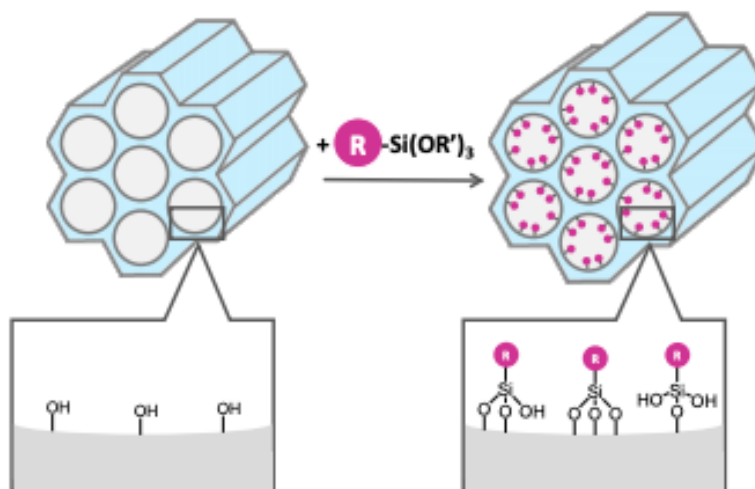


Figura 2.16: Funzionalizzazione post-sintesi [54].

Con il metodo di grafting è possibile effettuare una funzionalizzazione selettiva, governata dai fenomeni di diffusione e ingombro sterico intorno ai silanoli. Se l'innesto viene eseguito prima della rimozione del tensioattivo, poiché la superficie interna è occupata dal template, la modifica avviene essenzialmente sulla superficie esterna. D'altra parte, se lo stampo viene rimosso prima dell'innesto, gli organosilani reagiscono preferenzialmente nelle aperture dei pori a causa dell'impedimento sterico [16].

La co-condensazione di un tetraalcossisilano e uno o più precursori di organoalcossisilano è stata ampiamente utilizzata per la produzione di reti ibride inorganiche-organiche. I precursori del silossano funzionano come struttura principale dei materiali mesoporosi mentre i precursori dell'organoalcossisilano contribuiscono alla costruzione della struttura e funzionano come gruppi funzionali sulla superficie.

Nella struttura risultante, i gruppi organici R sono legati agli atomi di silicio della parete dello scheletro inorganico. Si ottiene una copertura di gruppi funzionali elevata e più omogenea rispetto al processo di grafting, senza influire sull'ordinamento strutturale dei pori. Tuttavia, per rimuovere il tensioattivo possono essere utilizzati solo metodi estrattivi, poiché la calcinazione indurrebbe la degradazione dei gruppi organici [38].

Alcuni studi, mediante la co-condensazione di due organoalcossisilani, hanno introdotto gruppi funzionali sia acidi che basici ottenendo delle MSN bifunzionalizzate, caratterizzate da proprietà chimiche interessanti che suggeriscono una varietà di nuove applicazioni [16].



2.6 Tecniche di impregnazione

La caratteristica unica delle silici a mesoporosità ordinata che li rende dei vettori ampiamente sfruttati per la somministrazione di farmaci è la loro elevata capacità di carico, dovuta al grande volume dei pori e alla chimica della superficie.

Negli ultimi decenni sono stati fatti diversi studi per realizzare delle tecniche che garantiscano impregnazioni ottimali dei principi attivi su matrici porose, in modo da ottenere dei sistemi ideali per applicazioni farmaceutiche e, al tempo stesso, economici e atossici.

L'industria farmaceutica deve affrontare sfide crescenti nella biodisponibilità delle formulazioni dei farmaci a causa della loro scarsa solubilità. Per superare questi limiti e aumentare il quantitativo dell'agente terapeutico occorre considerare le proprietà termodinamiche delle sostanze. Quando un principio attivo viene intrappolato in uno spazio ristretto, a livello del nanometro, avviene il cambiamento dallo stato solido cristallino ad amorfo e questa modifica è definita fenomeno di amorfizzazione [55]. Nonostante lo stato amorfo sia considerato disordinato e metastabile⁵, negli ultimi tempi ha suscitato grande interesse nell'industria farmaceutica, in quanto può essere associato a un livello metastabile che può essere sfruttato per massimizzare la concentrazione del principio attivo e migliorarne la solubilità [56].

In seguito, vengono descritti alcuni dei metodi che sono stati sviluppati per caricare il farmaco sui supporti di silice mesoporosa. I più classici e i più studiati sono vari processi con solventi organici e processi di fusione, mentre tra le tecniche più innovative troviamo l'uso di fluidi supercritici come la CO₂ supercritica.

2.6.1 Adsorbimento da soluzione

L'adsorbimento da soluzione è il processo di caricamento del farmaco più utilizzato. Questo metodo consiste nel disciogliere il farmaco in un solvente adatto e immergere il materiale poroso nell'intera soluzione sotto agitazione in modo che le molecole del farmaco vengano adsorbite sulle pareti dei pori. Il processo avviene a temperatura ambiente e può durare da una a diverse ore, dopodiché viene eseguita una filtrazione o centrifugazione per recuperare le MSN cariche di farmaco. Successivamente, le particelle vengono essiccate andando a rimuovere il solvente in eccesso [57].

Il caricamento da soluzione presenta dei vantaggi importanti, tra cui il poter essere applicato sia per farmaci idrofili che idrofobici, è una tecnica semplice da eseguire e fornisce dei risultati riproducibili, inoltre, non richiede una temperatura elevata, rendendola adatta per il caricamento di molecole termosensibili. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, l'immersione in solvente è un processo che richiede molto tempo ed è a bassa resa. Per ottenere dei carichi elevati, è necessario utilizzare concentrazioni relativamente elevate di soluzioni di carico, ma questo può essere complicato soprattutto con farmaci scarsamente solubili. D'altra parte, se

⁵ Lo stato amorfo ha un livello di energia più elevato rispetto allo stato cristallino ed è considerato come termodinamicamente instabile (o metastabile).



la concentrazione è troppo alta, le molecole del farmaco si assorbono rapidamente sulla superficie e bloccano i mesopori, riducendo la superficie disponibile per il caricamento del farmaco. Degli ulteriori svantaggi sono la difficoltà nel prevedere il grado di carico che verrà raggiunto e la grande proporzione di farmaco sprecata durante la fase di filtrazione [57].

2.6.2 Incipient Wetness Impregnation

Il metodo Incipient Wetness Impregnation (IWI) è una tecnica utilizzata in un ampio numero di articoli presenti in letteratura e consiste nell'impregnare il carrier con un volume di solvente pari al volume dei pori della silice. L'intera soluzione, composta da un solvente e da un farmaco in esso disciolto, si adsorbe sulla superficie e viene attirata nei pori per azione capillare. Successivamente, si allontanano i componenti volatili della soluzione per semplice evaporazione del solvente o per essiccazione del supporto, depositando il farmaco sulla superficie [56].

Il vantaggio principale di questa tecnica, rispetto all'impregnazione da soluzione, è il minor spreco di farmaco, visto che non è prevista una fase di filtrazione. Inoltre, il farmaco viene caricato in modo efficiente ed è facile controllare il quantitativo di principio attivo incorporato nel carrier, rendendo questo processo adatto per l'utilizzo di molecole più costose.

Un esempio di utilizzo di questo tipo di impregnazione è quello di Azaïs, che ha incorporato l'ibuprofene all'interno di silici mesoporose come MCM-41 e SBA-15 [56].

I primi due metodi sopra menzionati hanno uno svantaggio intrinseco: l'impiego di solventi organici che risultano tossici per l'uomo e l'ambiente. Le successive fasi di rimozione del solvente aggiungono complessità di elaborazione e aumento dei costi di questi processi. Inoltre, è anche necessario considerare i problemi di sicurezza associati a queste fasi e adottare adeguate misure di protezione ambientale. Per evitare ciò, possono essere impiegate anche altre tecniche per caricare i farmaci sui supporti di silice mesoporosa.

2.6.3 Metodo di fusione

Nel processo di fusione le molecole di farmaco vengono caricate da una fase fusa. Il principio attivo viene riscaldato, con il sistema mesoporoso, al di sopra del proprio punto di fusione, il che potrebbe provocare una potenziale degradazione del farmaco. Infatti, fattori importanti da considerare quando si utilizza questo metodo sono la viscosità del fuso, che deve essere sufficientemente bassa da consentire alla molecola di entrare nella struttura dei pori, e la stabilità termica sia dell'adsorbente che del farmaco; questo esclude tutti i prodotti farmaceutici noti per la loro decomposizione alla fusione [56].

Alcuni farmaci come l'ibuprofene sono stati caricati con successo in MCM-41 utilizzando il processo di fusione. L'ibuprofene è stato miscelato con le MSN e riscaldato a circa 5 ° C sopra il punto di fusione del farmaco. Lo studio ha dimostrato che questo è un metodo



efficiente per confinare il farmaco nei pori con un fattore di riempimento del 60% [56]. Tuttavia, in un altro lavoro in cui è stato miscelato il farmaco itraconazolo con SBA-15 e riscaldato al di sopra del punto di fusione, si è osservata la formazione di particelle vetrose di itraconazolo che si sono depositate sulla superficie delle particelle di silice [56].

2.6.4 CO₂ supercritica

Le industrie farmaceutiche si stanno indirizzando sempre di più verso una tecnologia di tipo ecosostenibile, questo obiettivo ha portato ad una tecnica di impregnazione alternativa che permette di sostituire i solventi organici e che consiste nell'incorporare i farmaci dissolvendoli in fluidi compressi altamente volatili, come l'anidride carbonica supercritica (scCO₂). Le proprietà specifiche dei fluidi supercritici, ne consentono l'utilizzo come impregnanti.

Come già descritto nel paragrafo 2.3.3, un fluido supercritico (SCF) può essere definito come qualsiasi sostanza presente a una temperatura e una pressione superiori ai loro valori critici. A pressioni e temperature non troppo lontane dal suo punto critico, il fluido ha un'elevata comprimibilità. Pertanto, la sua densità e il suo potere solvente sono facilmente regolabili su un ampio intervallo con una variazione minima di temperatura o pressione. Questa selettività può essere utilizzata per controllare il parametro di solubilità.

Il parametro di solubilità è un coefficiente che indica la solubilizzazione di una sostanza in un solvente specifico. È probabile che materiali con valori simili siano miscibili, quindi un soluto presenta una solubilità o miscibilità completa se ha un parametro di solubilità il più possibile vicino a quello del solvente. Come descritto nella review di Gurikov e Smirnova [55], vi sono soluti più o meno solubili in scCO₂. Si possono così classificare i farmaci indagati per il drug delivery:

- altamente solubili (solubilità $\geq 10^{-3}$ mol) come ibuprofene, triflusal, atropina e artemisinina;
- moderatamente solubili ($10^{-5} \leq \text{solubilità} < 10^{-3}$ mol), ad esempio naproxen, miconazolo, vitamina D₃, aspirina e carbamazepina;
- scarsamente solubili (solubilità $\leq 10^{-6}$ mol) come prednisolone e idrocortisone.

La preparazione di matrici di silice mesoporosa impregnate con un farmaco consiste nel solubilizzare la sostanza con l'aiuto di un SCF e successivamente porla a contatto con la matrice stessa. Essenzialmente il processo è costituito da tre fasi, rappresentate anche nella Figura 2.17: dissoluzione del principio attivo in scCO₂, impregnazione del principio attivo nella matrice porosa, depressurizzazione del sistema [32].

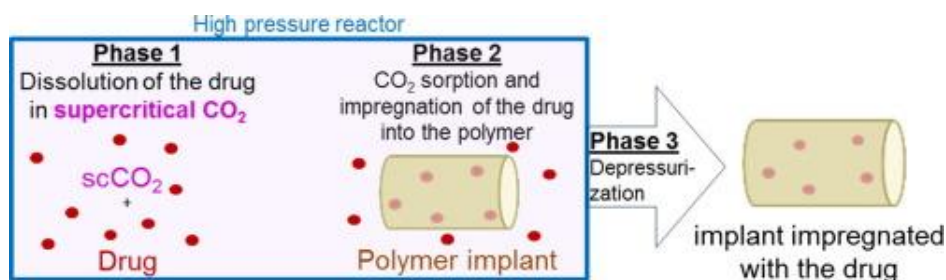


Figura 2.17: Rappresentazione schematica delle tre fasi del processo di impregnazione [32].

Il processo di impregnazione con fluidi supercritici viene eseguito tramite l'apparato mostrato in Figura 2.18:

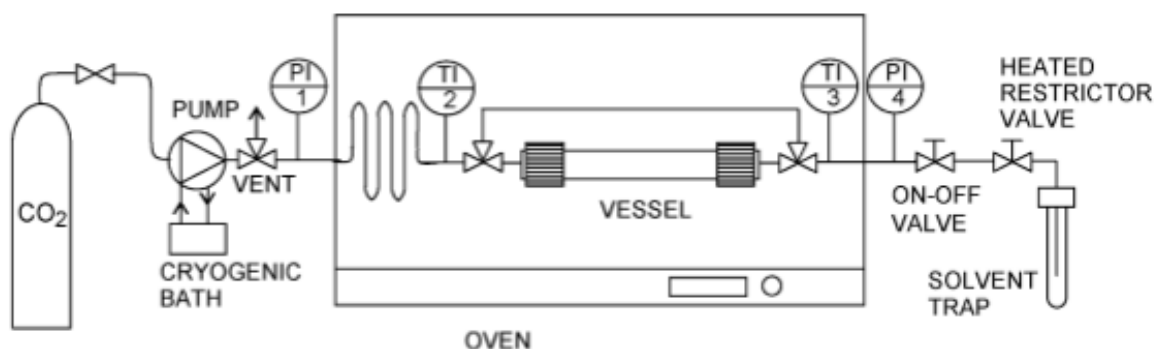


Figura 2.18: Apparato sperimentale [58].

Sia il supporto che il farmaco vengono inseriti in un recipiente cavo in acciaio inossidabile (vessel), il quale, dopo il caricamento, viene posto all'interno di una stufa, caratterizzata dalla funzione di mantenere costante la temperatura durante tutto il processo.

Inizialmente, il recipiente cavo viene purificato con CO₂ gassosa per rimuovere l'aria residua, dopodiché viene azionata la modalità statica fino al raggiungimento delle condizioni di funzionamento desiderate. Il vessel viene poi riempito con il solvente supercritico in modo che avvenga la dissoluzione del farmaco e successivamente l'impregnazione del carrier a contatto con la soluzione creatasi. Infine, avviene la depressurizzazione, passaggio in cui l'impianto viene scaricato e la CO₂ torna allo stato gassoso separandosi dal sistema carrier-farmaco [58].

L'impiego di scCO₂ per il caricamento del farmaco offre molti vantaggi rispetto ai tradizionali metodi di incorporazione. Innanzitutto, questo solvente ha un buon potere solvatante e un'elevata diffusività. Inoltre, alla fine del processo è possibile ottenere nuovamente la CO₂ in forma gassosa semplicemente riportando il sistema in condizioni ambientali, successivamente questa può essere riutilizzata o scaricata nell'atmosfera. Il processo possiede una ridotta complessità di elaborazione, poiché non sono necessarie fasi



di rimozione del solvente associate all'uso di solventi organici. Tuttavia, presenta anche alcuni svantaggi, tra cui la necessità di attrezzature e conoscenze specializzate per l'alta pressione e che non tutte le sostanze sono solubili in $scCO_2$.

Nel corso degli anni si è utilizzata la CO_2 supercritica come metodo di impregnazione di diversi sistemi a base di silice mesoporosa con differenti tipologie di principi attivi. In letteratura possiamo trovare molti esempi, come i lavori di Bouledjoudja *et al.* [59], Gignone *et al.* [60] e Hillerström [61] che si sono occupati di incorporare rispettivamente fenofibrato, clotrimazolo e ibuprofene.

Capitolo 3

Materiali e metodi

I seguenti capitoli sono dedicati al lavoro sperimentale effettuato. Questo consiste nell'impregnazione con vitamina D₃, tramite Incipient Wetness Impregnation, di due silici mesoporose commerciali. Successivamente, per valutare l'interazione tra farmaco e supporti, sono state eseguite caratterizzazioni fisico-chimiche dei campioni e una prova preliminare di rilascio.

3.1 Materiali

Per l'impregnazione tramite IWI e le analisi spettroscopiche sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- vitamina D₃, colecalciferolo, (C₂₇H₄₄O), Merck®;
- etanolo (CH₃CH₂OH), anidro, Merck®;
- SBA-15, pore size 8 nm, Sigma-Aldrich®;
- SBA-15, pore size 4 nm, Sigma-Aldrich®;

Per la preparazione della soluzione tampone per il rilascio sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- etanolo (CH₃CH₂OH), anidro, Merck®;
- cloruro di sodio (NaCl), ≥99.9%, Sigma-Aldrich®;
- cloruro di calcio (CaCl₂), ≥99.9%, anidro, Merck®;
- solfato di magnesio (MgSO₄), Redi-Dri™, ReagentPlus®, ≥99.5%, anidro, Sigma-Aldrich®;
- idrogenofosfato di potassio (K₂HPO₄);
- idrossido di sodio (NaOH), BioXtra, ≥98%, pellet anidro, Sigma-Aldrich®;

3.2 Supporti utilizzati

Per questo lavoro di tesi è stata utilizzata una tipologia di silice mesoporosa commerciale, molto studiata per applicazioni biomediche, ovvero la Santa Barbara Amorphous n.15 (SBA-15).

Nel 1998, un'importante ricerca dell'università della California ha prodotto questo tipo di matrice caratterizzata da una struttura dei pori ordinata esagonale. Rispetto alla silice MCM-41, SBA-15 mostra una dimensione dei pori maggiore (4 - 30 nm), pareti dei pori più spesse (3,1-6,4 nm) e una morfologia della superficie più ruvida; inoltre, presenta delle ottime proprietà di resistenza termica, meccanica e chimica. Il gruppo di ricerca di Zhao ha sintetizzato la SBA-15 con pori uniformi fino a 30 nm utilizzando copolimeri a blocchi anfifilici in mezzi fortemente acidi ($\text{pH} \sim 1$) [38].

Nel caso in esame, sono state utilizzate due silici con diametro poroso differente, la prima con un diametro dei pori nell'intorno di 8 nm e la seconda di 4 nm, in modo da valutare l'influenza di questo parametro.

Una caratteristica dell'SBA-15 è la presenza di un sistema poroso tridimensionale, dovuto al network microporoso attorno ad ogni mesoporo che genera una interconnessione tra i mesopori. La Figura 3.1 è la rappresentazione dell'adsorbimento di un farmaco, riprodotto come delle sferette, nelle porosità della silice SBA-15: conseguentemente all'assorbimento si verifica la riduzione del diametro medio dei pori.

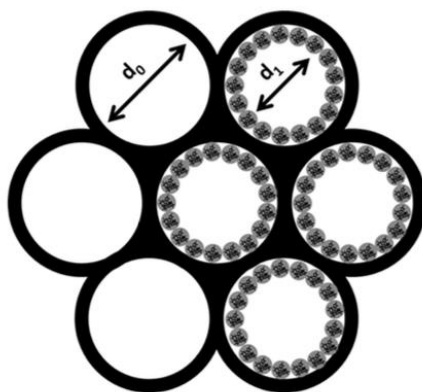


Figura 3.1: Disposizione delle molecole di farmaco all'interno dei pori [62].

3.3 Tecnica di impregnazione

La tecnica di impregnazione scelta per questo lavoro di tesi è una tecnica diffusa e di semplice realizzazione, ossia la *Incipient Wetness Impregnation* (IWI), già descritta in dettaglio nel



paragrafo 2.6.2. Questo metodo consiste nell'impregnare il carrier mesoporoso con un volume di solvente pari al volume dei pori della silice. La soluzione è composta da un solvente e dal farmaco in esso disciolto. Tale processo evidenzia i parametri principali che si devono considerare, quali il volume poroso della silice e la solubilità del farmaco nel solvente. Si è scelto di utilizzare etanolo come solvente organico, in quanto è un solvente molto volatile e meno nocivo di altri solventi organici. Inoltre, la solubilità della vitamina D₃ in etanolo è pari a 38 mg/ml.

Modalità di preparazione. È stata preparata una soluzione di etanolo e vitamina D₃ di concentrazione pari a 30 mg/ml in un opportuno matraccio. Quindi sono stati pesati 400 mg di entrambi i campioni di silice e sono stati riposti in due piastre di Petri. Successivamente, tramite l'utilizzo di una pipetta, le silici sono state impregnate con 1 ml di soluzione, ossia un quantitativo di soluzione paragonabile al volume poroso della silice. Questa fase del processo è stata ripetuta per un numero di volte tale da raggiungere il valore in peso di farmaco desiderato (100 mg). Dopo ogni impregnazione, viene fatto evaporare il solvente a temperatura ambiente.

3.4 Tecniche di caratterizzazione

Di seguito vengono elencate e descritte le tecniche di caratterizzazione utilizzate.

3.4.1 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X (XRD) è un metodo analitico per lo studio della composizione chimica e delle fasi cristalline all'interno di un campione solido. Tale tecnica si basa su un'interferenza costruttiva tra i raggi X monocromatici e il campione. I raggi X sono onde elettromagnetiche altamente penetranti caratterizzate da una lunghezza d'onda (λ) compresa tra 10 nm e 0,01 nm.

Nel 1912, Max von Laue scoprì che le sostanze cristalline agiscono come reticoli di diffrazione 3D per le lunghezze d'onda dei raggi X e che lo spettro di diffrazione risultante contiene informazioni fondamentali sulla distribuzione degli atomi, poiché la lunghezza d'onda (circa 1 Å) dei raggi X è paragonabile alla distanza interatomica [63].

Quando un fascio di raggi X colpisce un materiale solido con una struttura cristallina (cioè formato da atomi ordinati secondo un reticolo), provoca la vibrazione degli elettroni che circondano un singolo atomo e questi iniziano ad emettere onde elettromagnetiche di lunghezza d'onda λ in tutte le direzioni. Le onde diffuse possono interferire sia in modo costruttivo che distruttivo; per interferenza costruttiva si intende il fenomeno per cui i raggi X si rinforzano reciprocamente (Figura 3.2). Ciò si verifica quando essi vengono riflessi da piani atomici paralleli ed equidistanti (d) e se la distanza tra i piani è comparabile con la

lunghezza dell'onda incidente [63]. Tale condizione è stabilita e descritta dalla legge di Bragg:

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

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

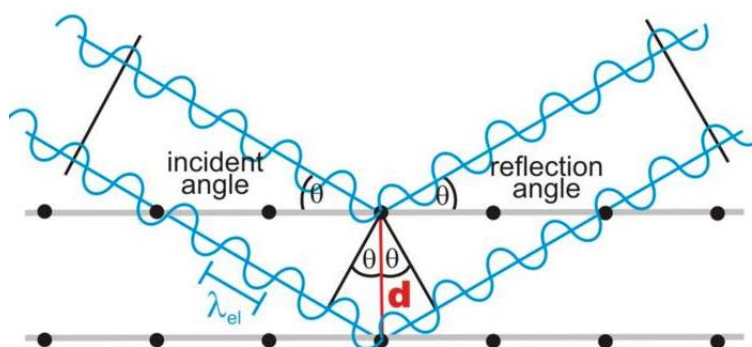


Figura 3.2: Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg [64].

La legge di Bragg permette di identificare univocamente la fase cristallina del campione e di determinarne la dimensione d .

I raggi X raggiungono la superficie del campione e lo scansionano attraverso un intervallo 2ϑ ; questi una volta diffratti, vengono elaborati e contati per produrre uno spettro di diffrazione. Poiché ogni materiale ha un insieme unico di d -spazi, la conversione dei picchi di diffrazione in d -spazi consente l'identificazione del materiale. Generalmente, gli spazi d vengono confrontati con i modelli di riferimento standard [63]. I dispositivi utilizzati per determinare lo spettro di diffrazione sono chiamati diffrattometri a raggi X e sono costituiti da tre componenti principali:

- Tubo a raggi catodici: riscalda un filamento per produrre elettroni. Applicando una tensione appropriata, gli elettroni vengono accelerati verso un bersaglio e lo bombardano. Quando gli elettroni raggiungono un'energia sufficiente per rimuovere gli elettroni dal guscio interno del bersaglio, vengono prodotti spettri di raggi X caratteristici;
- Supporto del campione: contenitore in cui viene posto il campione che solitamente è in forma di strato sottile e omogeneo di polvere (il campione viene preventivamente macinato);
- Rilevatore di raggi X: registra ed elabora il segnale prodotto dalle interferenze costruttive [63].

Per caratterizzare i materiali mesoporosi è possibile effettuare sia scansioni a bassi angoli sia ad alti angoli. Il primo tipo di analisi si effettua per verificare la presenza di un ordine



strutturale a lungo raggio, mentre il secondo verifica se il sistema sia amorfo o cristallino. Poiché l'obiettivo principale di questa caratterizzazione era verificare che il principio attivo, una volta caricato nel sistema, non diventasse cristallino, sono state effettuate analisi unicamente ad alti angoli.

Lo strumento utilizzato è il diffrattometro *X'PERT3 Panalytical*. L'emissione di raggi X avviene da anodo in rame con lunghezza d'onda $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ e lo strumento viene impostato per operare con una tensione di 40 kV e una corrente di 40 mA. Attraverso un software collegato è possibile creare un diffrattogramma, un diagramma bidimensionale che mette in relazione l'intensità del segnale rilevato con l'intervallo dell'angolo di incidenza 2θ .

Tabella 4: Condizioni operative del test XRD ad alti angoli.

Range angolare 2θ	5° - 60°
Step angolare	0,0131°
Voltaggio del generatore	40 kV
Corrente del tubo	40 mA
Filtro anti-divergenza	1/2
Filtro antiscatter	1/4

3.4.2 Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica di analisi di tipo quantitativo che permette di misurare la variazione di massa di un campione in funzione della temperatura e/o del tempo in atmosfera controllata. Questa caratterizzazione è stata effettuata per avere una misura approssimativa del contenuto di farmaco introdotto nel supporto mesoporoso, poiché è possibile associare le variazioni di peso alle singole sostanze presenti nel campione. La variazione di peso percentuale si può facilmente osservare con la seguente equazione:

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

Lo strumento utilizzato è il *DSC/TGA 92-16.18 Setaram*. Per la misurazione, i campioni (circa 10 mg) sono stati inseriti all'interno di un piccolo crogiolo di allumina collegato ad una bilancia di precisione. Dopodiché, vengono sottoposti ad una rampa di riscaldamento di 10°C/min fino al raggiungimento di 800°C, insufflando aria all'interno dello strumento per allontanare i prodotti di degradazione volatili.

3.4.3 Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è un'analisi non distruttiva che sfrutta l'interazione tra la radiazione infrarossa e il campione in esame per ricavare informazioni su i gruppi funzionali e i tipi di legami chimici presenti nel campione stesso.

Quando una molecola assorbe un fotone infrarosso ad una frequenza che coincide con la frequenza caratteristica di vibrazione di uno dei legami presenti, passa da uno stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. Di conseguenza, determinando la frequenza di assorbimento si riescono ad identificare i gruppi funzionali della molecola creando una sorta di impronta molecolare del campione.

Esistono due tipi di vibrazioni: stiramento, o *stretching*, del legame chimico, in cui la vibrazione avviene lungo l'asse di legame e si può descrivere come una serie di allungamenti e accorciamenti dello stesso; piegamento, o *bending*, dell'angolo di legame, in cui si verifica una vibrazione oscillatoria che richiede meno energia rispetto lo stiramento.

Gli spettri IR prodotti forniscono informazioni sia qualitative sui legami chimici, sia quantitative dovute all'intensità del picco di assorbimento (o assorbanza). Si possono distinguere due intervalli di frequenze (esprese in numero d'onda), uno compreso tra 4000 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} relativo ai gruppi funzionali, e l'altro tra 1300 cm^{-1} e 600 cm^{-1} che contiene bande originate da vibrazioni dell'intero scheletro molecolare quindi è caratteristico di ogni composto (Figura 3.3) [65].

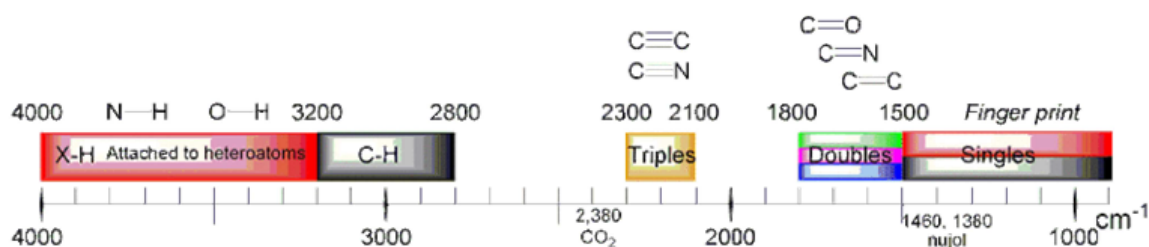


Figura 3.3: : Regioni dello spettro IR [65].

Lo strumento utilizzato è lo *spettrofotometro Equinox 55 Bruker*. Per la misurazione, vengono aggiunti alcuni mg di bromuro di potassio (KBr) al campione affinché il segnale non saturi, il tutto viene macinato mediante un pestello e pressato con una pressa idraulica per ottenere delle pastiglie molto sottili. Le pastiglie ottenute vengono inserite in un portacampione forato che viene disposto successivamente in una cella trasparente alla radiazione IR. Per l'analisi si effettuano due spettri dello stesso campione, intervallati da una fase di degassaggio di circa un'ora alla pressione di 0,1 Pa, in questo modo è possibile eliminare le specie adsorbite fisicamente sulla superficie che possono influenzare la misura.

3.4.4 Analisi di adsorbimento di azoto

La tecnica di adsorbimento di azoto misura la quantità di gas adsorbito o desorbito dalla superficie del materiale in funzione della temperatura e della pressione parziale dell'adsorbato. Questa analisi permette lo studio di parametri del materiale, quali l'area superficiale specifica, il volume poroso, il diametro medio e la distribuzione dei pori. Per ottenere questi risultati, si utilizza l'azoto che viene fatto adsorbire sulla superficie del materiale in esame alla sua temperatura di liquefazione, ovvero 77 K.

I dati vengono rappresentati in curve chiamate isoterme di adsorbimento. Come già descritto nella sezione 2.2 la IUPAC classifica le isoterme in 6 classi principali ma, in presenza di isteresi, è possibile classificare ulteriormente i materiali porosi in base alla forma che assume il cappio di isteresi (Figura 3.4).

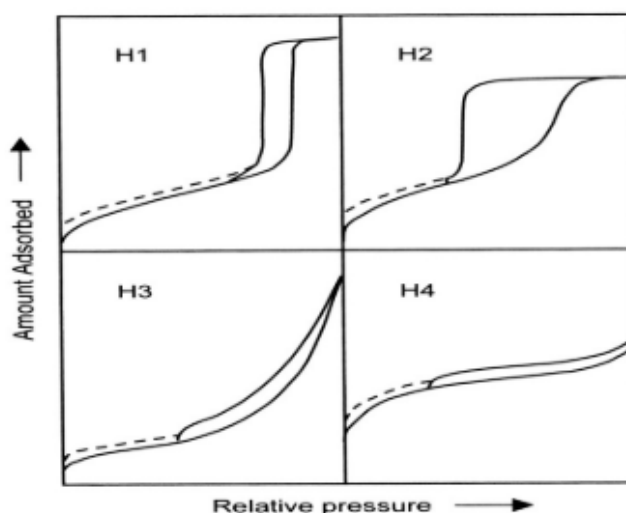


Figura 3.4: La relazione tra la forma dei pori e l'isoterma di adsorbimento-desorbimento [38].

Secondo la IUPAC, la tipologia H1 è spesso associata a materiali porosi con pori cilindrici ben definiti. Al contrario, la tipologia H2 è attribuita a materiali con una distribuzione della dimensione e forma dei pori disordinata, che presenta anche strozzature o colli di bottiglia. I materiali che danno origine a isteresi con forma H3, in cui non è presente alcun limite di adsorbimento ad alti valori di P/P_0 , hanno pori a forma di fessura dovuti ad aggregati di particelle disposti in strati sottili. Infine, l'isteresi di tipo H4 è spesso associata a materiali contenenti sia micropori che mesopori [38].

Lo strumento utilizzato è *ASAP 2020 Plus Micrometrics*. Nella pratica sperimentale l'analisi si divide in due parti. Inizialmente il campione, inserito in una buretta di vetro ermetica, è



stato sottoposto a un degasaggio a 60 °C⁶ per circa 3 ore allo scopo di eliminare eventuali impurezze e/o acqua già adsorbite sulla superficie del campione. La seconda parte consiste nell'analisi vera e propria in cui la buretta viene posta in un bagno di azoto liquido e viene inviato azoto gassoso per il ciclo di adsorbimento/desorbimento. A fine misura si ottengono i dati che permettono di costruire l'isoterma. Per ricavare il valore dell'area superficiale specifica è stato utilizzato il modello BET (Brunauer-Emmett-Teller); mentre per ricavare il valore della dimensione dei pori è stato utilizzato il modello BJH (Barett, Joyner and Halenda).

3.4.5 Spettroscopia UV/Visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica di caratterizzazione che fornisce informazioni di tipo qualitativo e quantitativo, basata sulla determinazione della lunghezza d'onda a cui assorbe una soluzione chimica. Infatti, ogni composto presenta un picco di assorbimento caratteristico ad una determinata lunghezza d'onda.

Quando avviene l'assorbimento di un fotone da parte di una molecola nell'intervallo UV/Vis (radiazione UV 180 nm-400 nm e radiazione visibile 400 nm-780 nm), si verifica una transizione elettronica, ovvero l'elettrone passa da uno stato fondamentale ad uno eccitato. Questo fenomeno di assorbimento viene sfruttato per determinare la concentrazione di una specie assorbente all'interno di una soluzione diluita, poiché segue la legge di Lambert-Beer:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon c l$$

dove A è l'assorbanza misurata (adimensionale), I_0 l'intensità della luce incidente a una determinata lunghezza d'onda, I l'intensità trasmessa, ϵ il coefficiente di assorbimento ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c la concentrazione della soluzione (mol L^{-1}) e l il cammino ottico (cm).

Lo spettrofotometro UV/Vis, schematizzato in Figura 3.5, è costituito da alcuni componenti principali: una sorgente di energia radiante nella banda UV/Vis; un monocromatore, che isola un intervallo ristretto di radiazioni emesse e lo cambia gradualmente; due recipienti, chiamati cuvette, uno per il campione e uno per il riferimento; e un rivelatore.

⁶ Il degasaggio è stato effettuato alla temperatura di 60 °C in modo da allontanarsi dalla temperatura alla quale la vitamina D₃ inizia a degradare (85 °C).

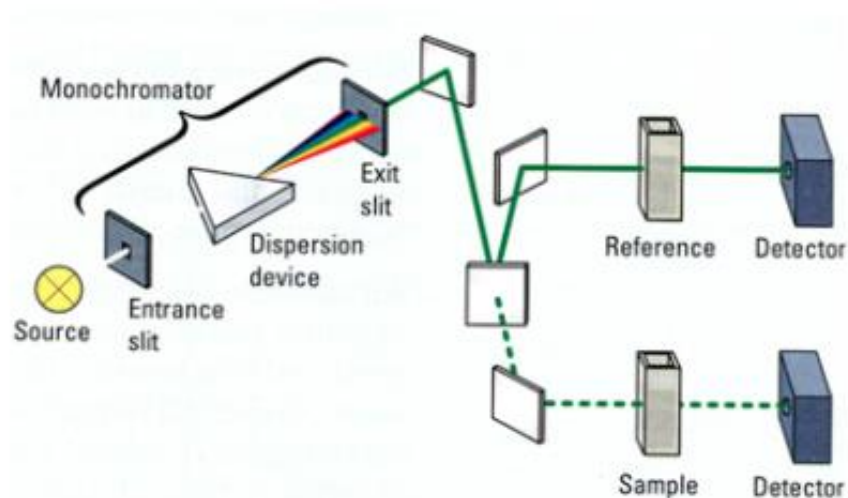


Figura 3.5: : Schematizzazione di uno spettrofotometro UV/Vis [66].

Lo strumento utilizzato è lo spettrofotometro *Lambda 25 Perkin Elmer*. Per iniziare la misurazione è necessario riempire le due cuvette con il solvente puro, in modo da impostare il “bianco”. Le cuvette utilizzate sono in quarzo e con un percorso ottico di 1 cm. Successivamente in una cuvette viene inserita la soluzione campione e lo spettrofotometro misura la differenza di assorbanza tra quella del campione e quella di riferimento (il bianco). Lo strumento è stato utilizzato per definire l’assorbanza del principio attivo, corrispondente alla lunghezza d’onda massima, per la realizzazione delle rette di taratura necessarie per studiare il rilascio del farmaco.

Capitolo 4

Caratterizzazione di silici nanoporose contenenti vitamina D₃

L'incorporazione del principio attivo all'interno dei pori dei due campioni di silice è stata eseguita con la tecnica Incipient Wetness Impregnation, come già descritto nella sezione 3.3, utilizzando etanolo come solvente. Il principio attivo utilizzato è la vitamina D₃, o colecalciferolo, che viene fornita in polvere, è di colorazione bianca e inodore. Le molecole del principio attivo vengono adsorbite sulla superficie della silice grazie ad interazioni fisico-chimiche.

Nei successivi paragrafi vengono studiate le varie analisi di caratterizzazione della vitamina D₃ riportate in letteratura, e le analisi effettuate sui campioni contenenti il principio attivo, al fine di una corretta analisi dell'interazione tra molecola e silice. Inoltre, insieme ai dati dei campioni impregnati, vengono sistematicamente riportati quelli dei campioni di riferimento (supporti tal quali) per valutare gli effetti dell'incorporazione del principio attivo.

4.1 Diffrazione a raggi X

Lo spettro di diffrazione a raggi X riportato in Figura 4.1 e mostra la presenza di picchi per valori 2θ di 18,05°, 15,75° e 5,05° [67][68] e evidenzia la forma cristallina della vitamina D₃. Lo spettro viene confrontato con quelli eseguiti sui materiali per verificare lo stato cristallino o amorfo della vitamina D₃ nella silice.

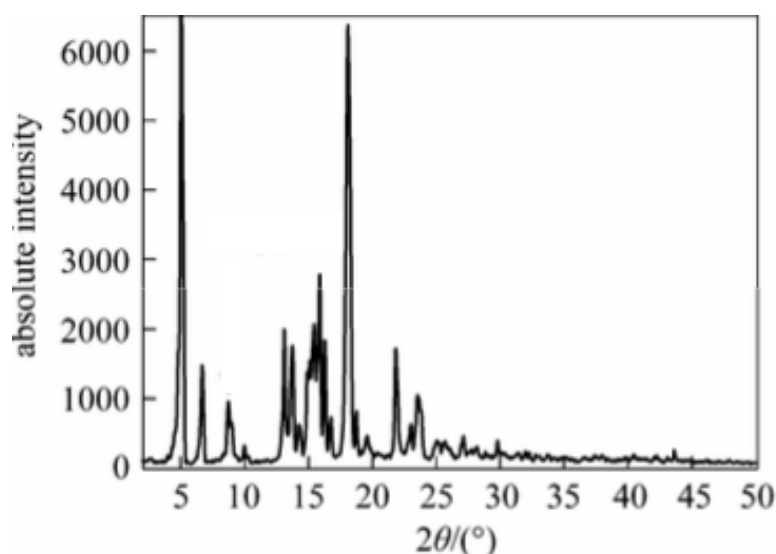


Figura 4.1: Spettro diffrattometrico della vitamina D_3 [67].

Nelle figure Figura 4.2 e Figura 4.3 sono confrontati gli spettri di diffrazione ad alti angoli del campione di riferimento SBA-15 con pori di diametro 8 nm (SBA_8) e del campione impregnato (SBA_8_vitD3), e del campione di riferimento SBA-15 con pori di diametro 4 nm (SBA_4) e del campione impregnato (SBA_4_vitD3), rispettivamente. In entrambi i casi la mancanza di picchi di diffrazione e la presenza del tipico “alone” osservato per la silice amorfa confermano che la matrice del materiale sia costituita da silice amorfa. Inoltre, la mancanza dei picchi caratteristici della vitamina D_3 in fase cristallina negli spettri dei campioni SBA_8_vitD3 e SBA_4_vitD3 evidenzia il mantenimento della fase amorfa da parte del farmaco. È particolarmente importante quest’ultimo aspetto poiché, grazie al fatto di essere metastabile, la forma amorfa dovrebbe migliorare considerevolmente la solubilità del principio attivo.

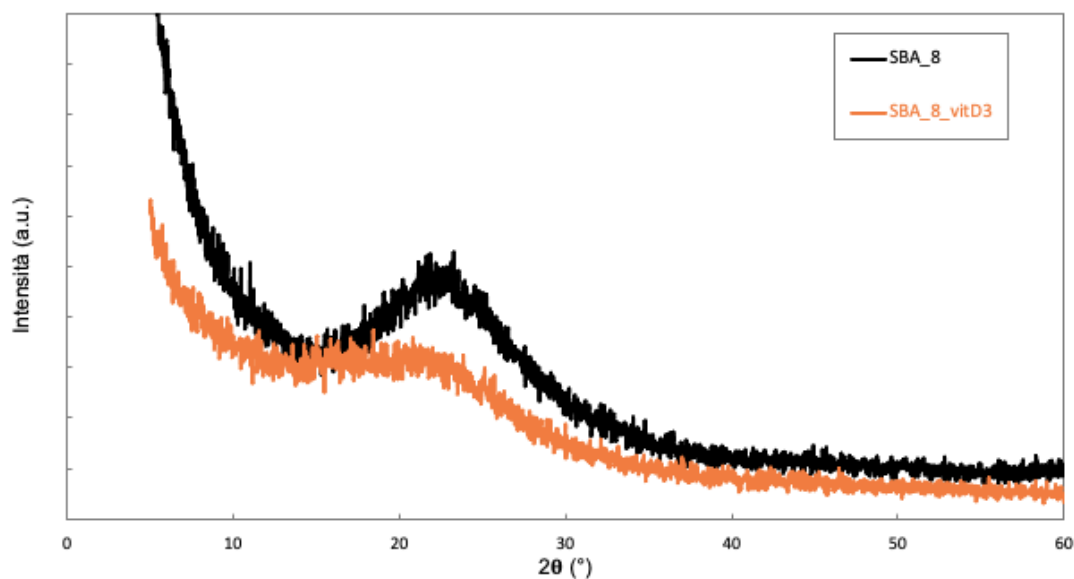


Figura 4.2: Spettro XRD – Confronto sui campioni con pori di 8 nm.

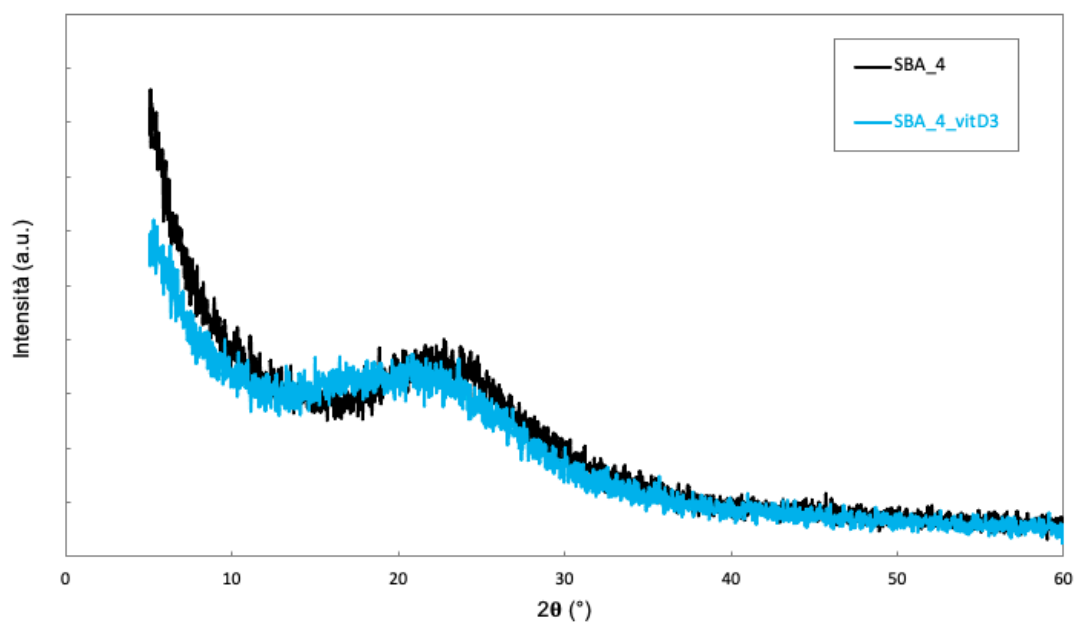


Figura 4.3: Spettro XRD – Confronto sui campioni con pori di 4 nm.

4.2 Analisi termogravimetrica

La curva termogravimetrica del colecalciferolo (cristallino, in polvere) riportata in letteratura [68] è rappresentata in Figura 4.4. Nell'intervallo di fusione 82°C – 87°C la curva mostra una trascurabile variazione di peso. La perdita di peso dovuta alla degradazione della vitamina D₃ inizia ad essere misurabile alla temperatura di circa 120°C, da qui fino ai 400°C si ha una perdita significativa con la degradazione completa del campione al termine della prova [68].

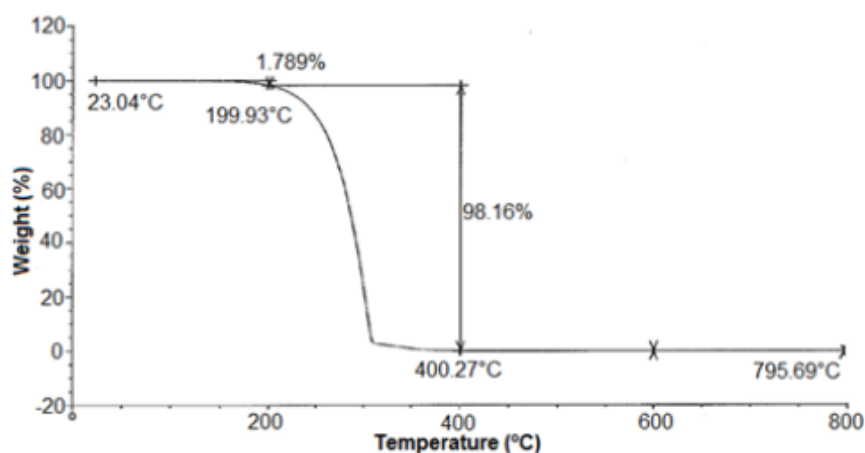


Figura 4.4: Curva termogravimetrica della vitamina D₃ [69].



Per avere una misura, seppur approssimativa, del contenuto di farmaco introdotto nel supporto mesoporoso si sceglie di lavorare per “sottrazione”, confrontando le perdite di peso delle silici contenenti vitamina D₃ e dei supporti di riferimento (SBA_8 e SBA_4).

Nelle figure Figura 4.5 e Figura 4.6 sono rappresentate le curve TGA dei quattro campioni. La perdita di peso che si verifica da temperatura ambiente ad una temperatura di circa 100 °C è associabile alla perdita di acqua molecolare adsorbita, ed è possibile osservare, per entrambe le curve, che questo contributo è minore per le silici contenenti vitamina D₃. Questo risultato è coerente con l’occupazione della superficie da parte del farmaco (idrofobico) e ne consegue una maggiore idrofobicità del materiale.

A partire da circa 120 °C la variazione di peso è considerevole, per poi essere più modesta nell’intorno dei 400 °C, fino al raggiungimento di un plateau dai 600 °C a fine prova. Questa perdita di peso è dovuta in piccola parte alla condensazione dei silanoli, contributo che viene assunto come valore costante (<2% wt. dalle prove sui campioni di riferimento), e per la maggior parte alla degradazione della vitamina D₃.

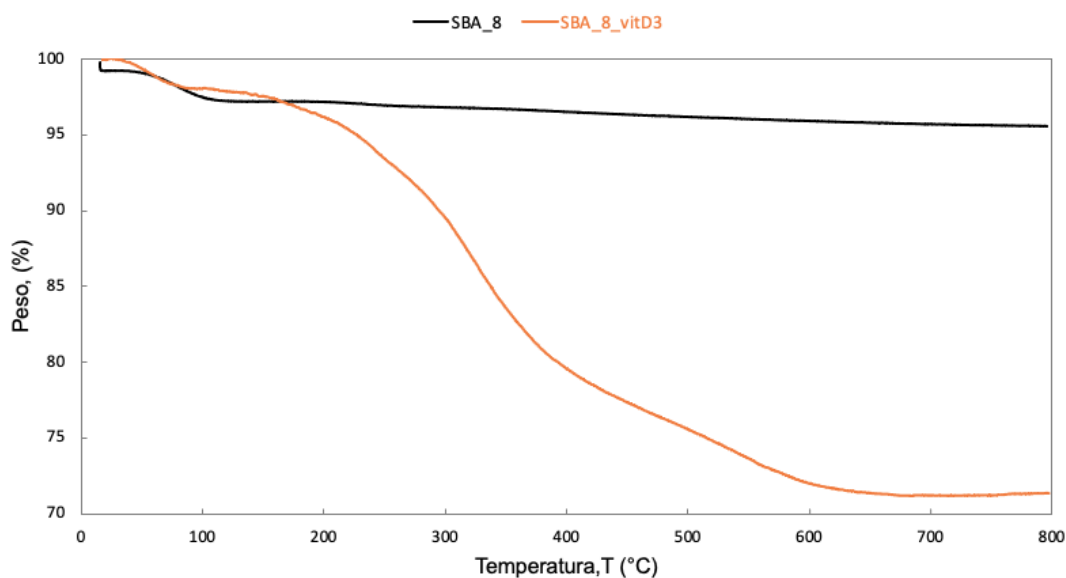


Figura 4.5: Curva TGA – Confronto sui campioni con pori da 8 nm.

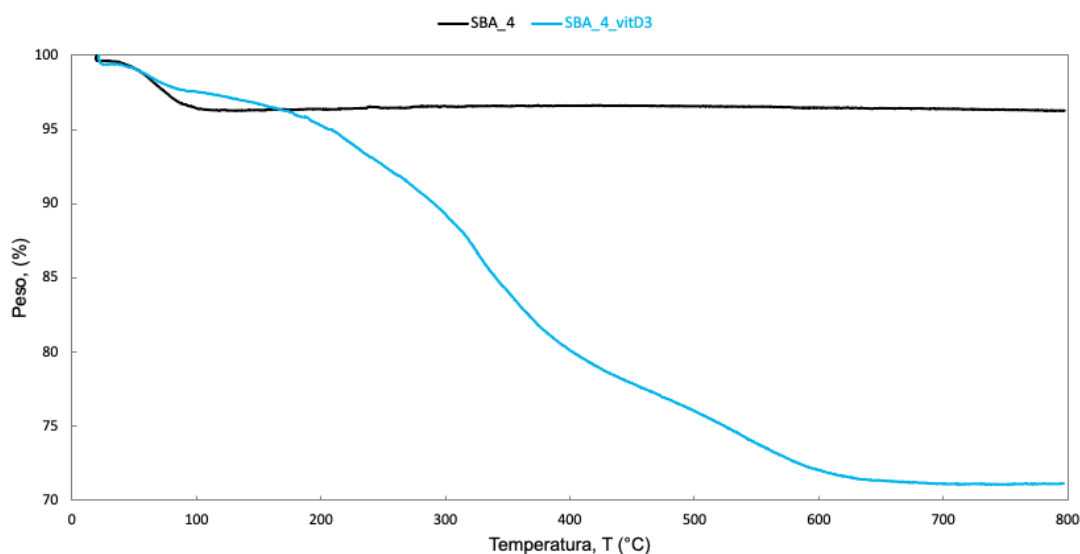


Figura 4.6: Curva TGA – Confronto sui campioni con pori da 4 nm.

Nella Tabella 5 vengono riportate le perdite di peso percentuali nei quattro campioni. Da tale analisi è possibile concludere che la quantità di vitamina D₃ contenuta nei campioni sia 24,8% wt. per il campione SBA_8_vitD3 e 25,9% wt. per il campione SBA_4_vitD3. Quindi il contenuto di farmaco in entrambe le silici è paragonabile, come osservabile anche in Figura 4.7.

Tabella 5: Pertite di peso percentuali.

Campione	% _{100 °C}	% _{100-800 °C}	% _{Totale}
SBA_8	2,52	1,91	4,43
SBA_8_vitD3	1,93	26,67	28,60
SBA_4	3,55	0,14	3,69
SBA_4_vitD3	2,47	26,38	28,85

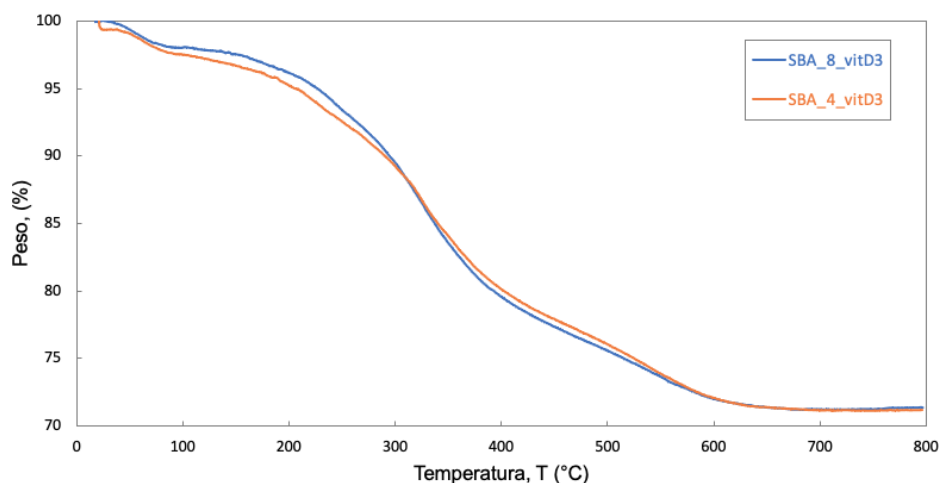


Figura 4.7: Curva TGA – Confronto tra campioni impregnati e con diametro poroso differente.

4.3 Spettroscopia FT-IR

Lo spettro infrarosso in Figura 4.8 evidenzia le bande di assorbimento caratteristiche della vitamina D₃ pura; l'analisi è stata effettuata andando a diluire sempre in KBr il campione (50% wt.). Si può osservare un ampio picco alla lunghezza d'onda di 3306 cm^{-1} attribuibile allo stretching del legame O-H. Lo spettro mostra uno stretching del legame C-H aromatico a 3080 cm^{-1} , mentre i picchi a 2935 cm^{-1} e 2979 cm^{-1} sono caratteristici dello stretching asimmetrico CH_2 e lo stretching simmetrico CH_2 , rispettivamente [69][70]. Inoltre, si osservano un picco a 1647 cm^{-1} dovuto allo stretching $\text{C}=\text{C}$ e bande nell'intervallo dai 1440 cm^{-1} ai 1460 cm^{-1} dovute ai modi vibrazionali degli anelli aromatici [69].

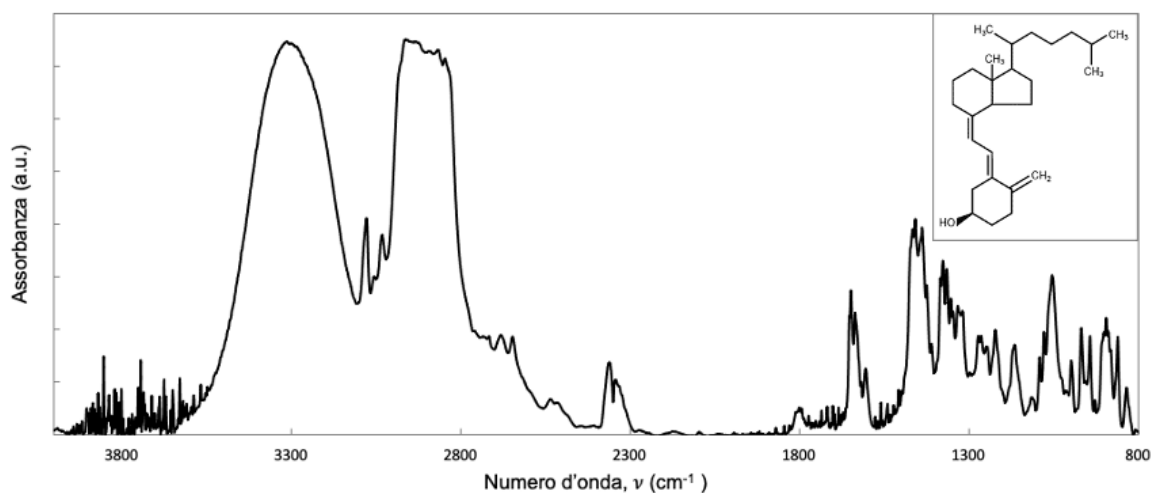


Figura 4.8: Spettro FTIR del colecalciferolo.

Per avere un'ulteriore conferma della presenza di principio attivo nei campioni impregnati, questi sono stati sottoposti ad analisi spettroscopiche FTIR e gli spettri ottenuti vengono posti a confronto nelle figure Figura 4.9 e Figura 4.10.

In entrambe le rappresentazioni, per quanto riguarda la zona dei silanoli, i campioni di riferimento SBA_8 e SBA_4 mostrano un picco a 3745 cm^{-1} attribuibile ai silanoli isolati, picco diminuito considerevolmente nei campioni impregnati con il principio attivo. Inoltre, in quest'ultimi si osserva un aumento evidente della banda larga tra 3600 e 3300 cm^{-1} dovuta ai silanoli interagenti per legame a idrogeno. Questo risultato è indice del fatto che la vitamina D₃ interagisce con la superficie della silice attraverso la formazione di legami a idrogeno con i silanoli.

Inoltre, negli spettri dei campioni caricati SBA_8_vitD3 e SBA_4_vitD3 è possibile osservare alcune bande caratteristiche del farmaco. La banda per valori tra 2990 e 2850 cm^{-1} è riconducibile allo stretching dei legami C-H, mentre per quanto riguarda i doppi legami C=C si può osservare in entrambe le curve la presenza dei due modi vibrazionali, uno più stretto e alto in frequenza e l'altro più largo e basso in frequenza. Si riscontra un allargamento della banda strutturata del carbonile (nell'intorno di 1647 cm^{-1}) che si osserva nello spettro della vitamina D₃ in fase cristallina. Il risultato ottenuto da questa analisi è coerente con quello ottenuto dalla diffrazione a raggi X poiché le curve dei campioni caricati mostrano la presenza di molecole di farmaco non cristalline all'interno della silice, di conseguenza anche i modi vibrazionali cambiano.

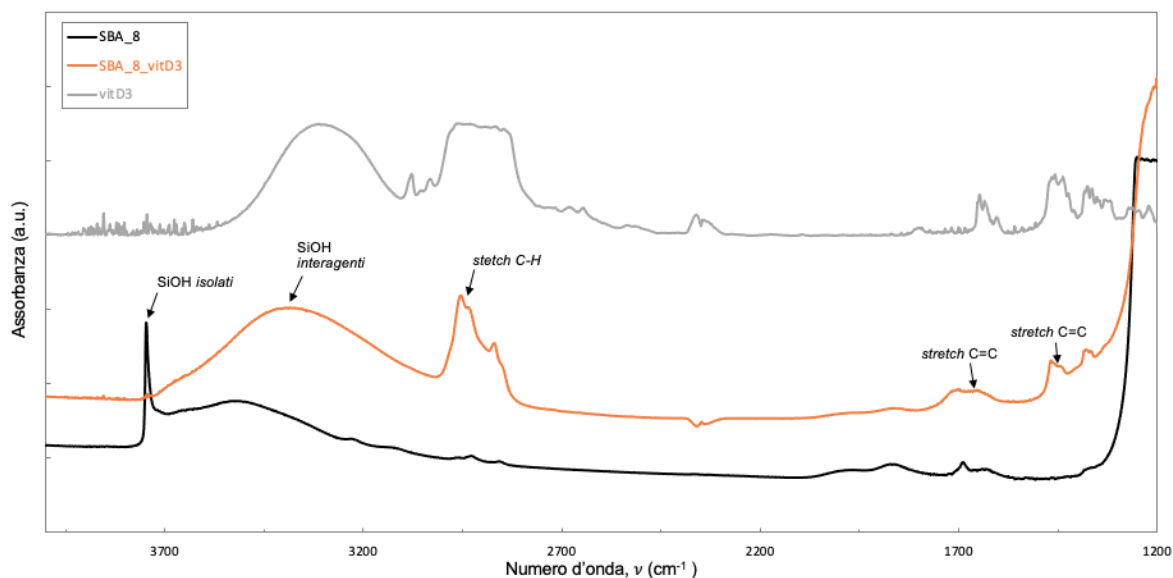


Figura 4.9: Spettro FTIR – Confronto tra campioni con pori da 8 nm.

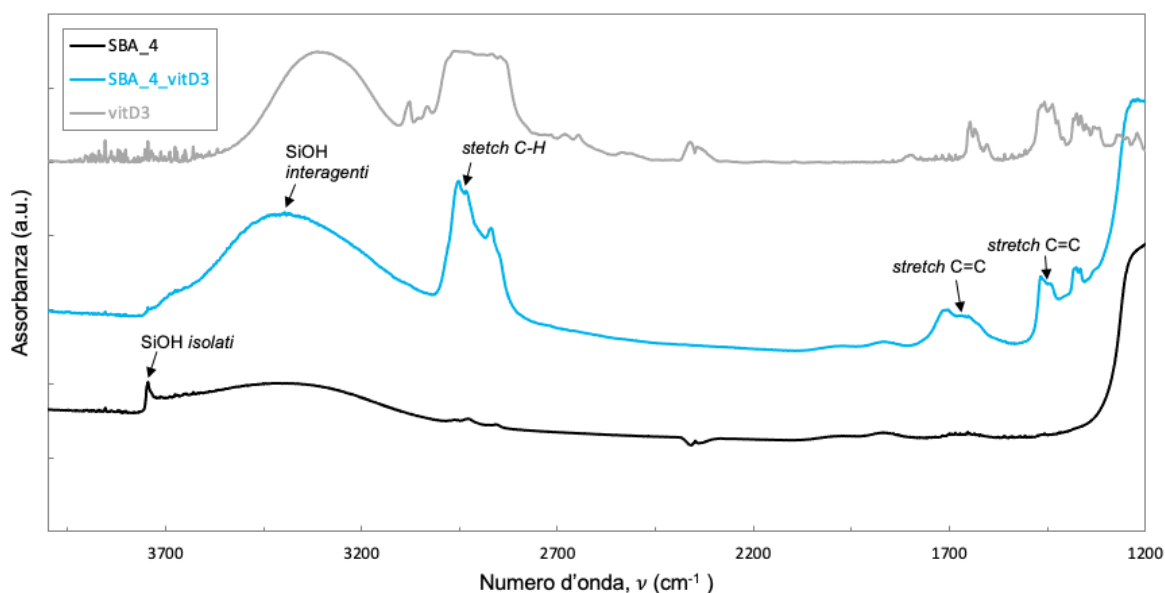


Figura 4.10: Spettro FTIR – Confronto tra campioni con pori da 4 nm.

4.4 Analisi di adsorbimento di azoto

Nelle figure seguenti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e le distribuzioni porosimetriche dei campioni impregnati con vitamina D₃. Per una più facile comprensione dei dati, le curve vengono sempre confrontate con quelle dei campioni di riferimento.

▪ Silici SBA-15 con pori di diametro 8 nm

Il confronto tra l'isoterma del riferimento e l'isoterma del campione SBA_8_vitD₃ è rappresentato in Figura 4.11. Entrambe le isoterme sono di tipo IV, tipico di materiali mesoporosi, ma la curva del campione caricato con il farmaco presenta dei cambiamenti rispetto alla curva del riferimento. Infatti, si può osservare una modifica della forma del coppia di isteresi, che si presenta meno stretto e più inclinato, e una diminuzione del volume libero dovuta alla presenza della vitamina D₃.

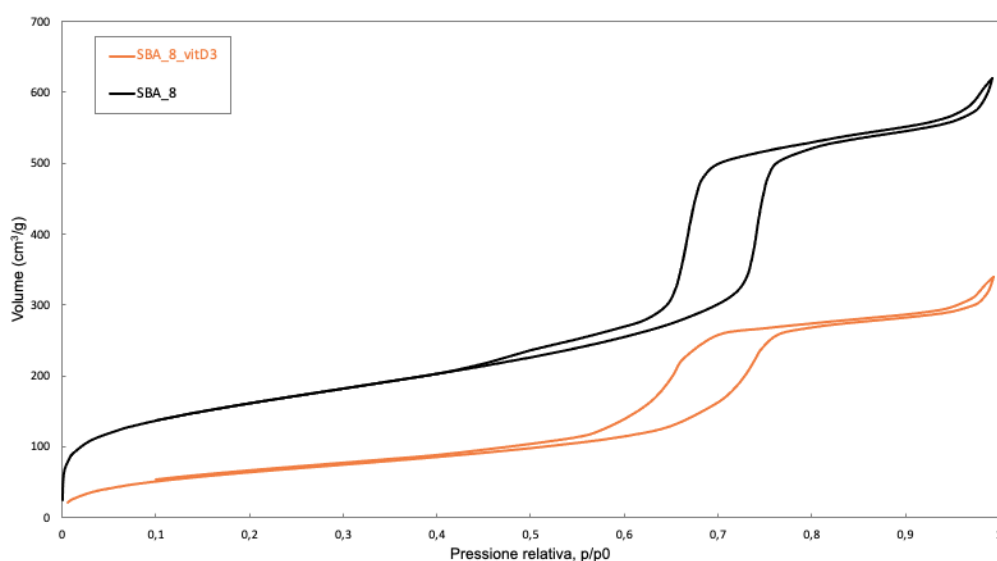


Figura 4.11: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_8 e SBA_8_vitD3.

Tramite il modello BJH è stato possibile ricavare la distribuzione dimensionale dei pori riportata in Figura 4.12. Si può notare come la distribuzione del campione SBA_8_vitD3 sia leggermente più larga e provi una diminuzione del diametro dei pori rispetto a quella del riferimento. Nella Tabella 6 sono invece riportati i valori dei parametri superficiali misurati tramite modello BET e BJH.

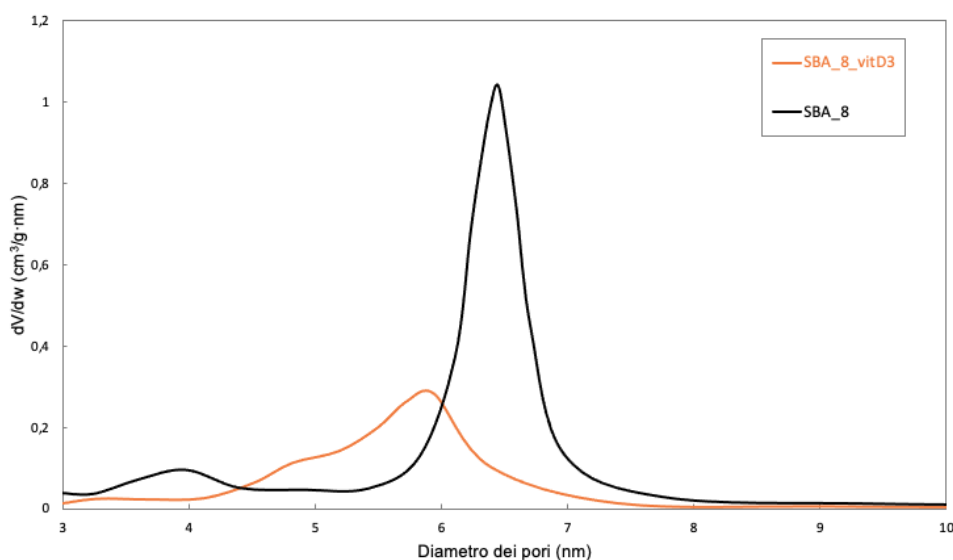


Figura 4.12: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_8 e SBA_8_vitD3.



Tabella 6: Confronto dei parametri superficiali tra SBA_8 e SBA_8_vitD3.

	SBA_8	SBA_8_vitD3
Area superficiale specifica (m ² /g)	572	245
Volume poroso (cm ³ /g)	0,9	0,5
Diametro dei pori (nm)	6,4	5,7

Osservando i dati in tabella si può notare come i valori siano cambiati considerevolmente in seguito all'incorporazione del principio attivo. In particolare, i valori di area superficiale e volume poroso si sono dimezzati, indice di una possibile parziale occlusione dei pori da parte del farmaco senza però un totale pore blocking.

Il diametro dei pori del campione di riferimento non è il valore nominale (8 nm) che ci aspetteremmo, questo è dovuto al fatto che il metodo BJH sottostima il diametro degli stessi. Modelli come questo sono applicabili per le analisi delle dimensioni dei mesopori, ma nel descrivere il riempimento di micropori, e persino mesopori stretti, può dar luogo ad un errore molto significativo [71].

▪ **Silici SBA-15 con pori di diametro 4 nm**

Il confronto tra l'isoterma del riferimento e l'isoterma del campione impregnato con vitamina D₃ è rappresentato in

Figura 4.13. La curva relativa a SBA_4_vitD3 resta sempre un'isoterma di tipo IV, tuttavia è notevole il cambiamento di quest'ultima rispetto alla curva del campione di riferimento. Infatti, si può osservare una diminuzione del volume libero, dovuta alla presenza del farmaco, e una variazione della forma del cappio di isteresi, indice di una transizione da una porosità ordinata ad una meno definita a seguito dell'incorporazione di vitamina D₃. Inoltre, la curva del campione caricato risulta leggermente traslata verso pressioni relative più basse.

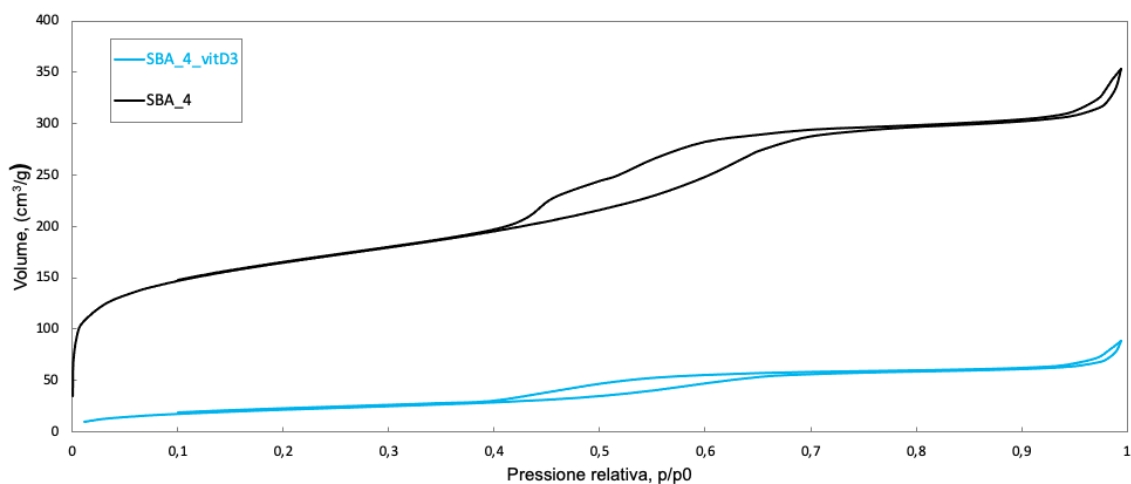


Figura 4.13: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_4 e SBA_4_vitD3.

In Figura 4.14 invece vi è il confronto tra le due distribuzioni porose ricavate tramite il modello BJH. È ben evidente che la distribuzione relativa al campione SBA_4_vitD3, per quanto larga, si sia mantenuta monomodale, a differenza del campione di riferimento, il quale presenta una distribuzione bimodale. Inoltre, nel campione impregnati, si osserva una leggera diminuzione del diametro medio di pori. Nella Tabella 7 sono riportati i valori dei parametri superficiali misurati tramite modello BET e BJH.

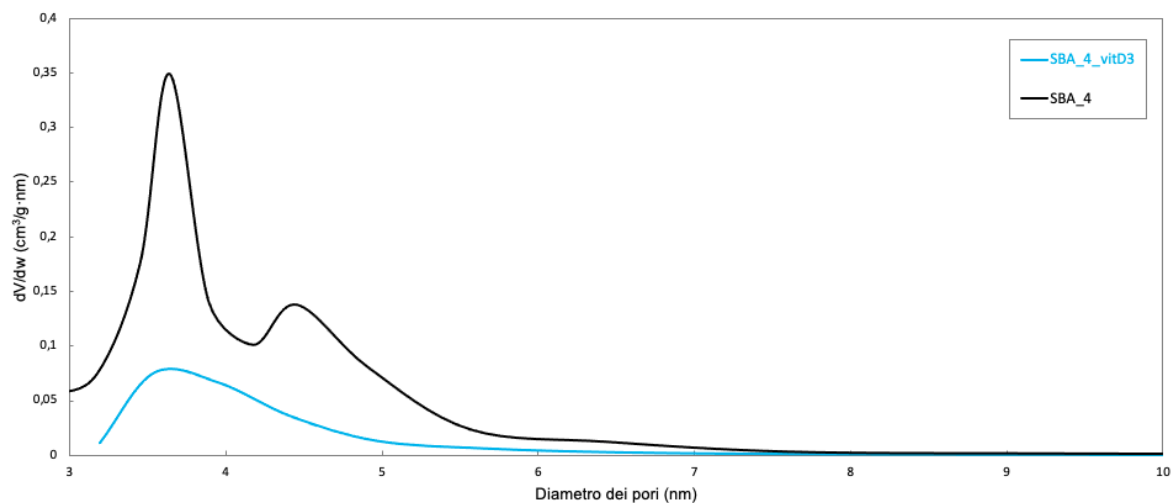


Figura 4.14: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_4 e SBA_4_vitD3.



Tabella 7: Confronto dei parametri superficiali tra SBA_4 e SBA_4_vitD3.

	SBA_4	SBA_4_vitD3
Area superficiale specifica (m ² /g)	551	81
Volume poroso (cm ³ /g)	0,48	0,11
Diametro dei pori (nm)	3,6	3,5

Si può osservare come i dati in tabella abbiano subito una drastica diminuzione nel campione SBA_4_vitD3. In particolare, i valori dell'area superficiale e del volume poroso sono più che dimezzati, indice di un possibile pore blocking che, a giudicare dalla distribuzione porosimetrica, sembra aver interessato soprattutto i pori a diametro minore.

Anche in questo caso, come si può notare dai dati riportati, il valore medio del diametro dei pori nel campione di riferimento è inferiore al nominale (4 nm), errore dovuto all'utilizzo del modello BJH.

In conclusione, i risultati ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto mostrano come la vitamina D₃ sia stata incorporata in entrambi i supporti in quantità significative. Il farmaco appare distribuito omogeneamente sulla superficie della silice, tuttavia, almeno in parte, può dar luogo al fenomeno di occlusione dei pori, in particolare nella silice con diametro dei pori minore.

Capitolo 5

Rilascio della vitamina D₃

Come ultima fase dell'attività sperimentale si è scelto di effettuare uno studio sul rilascio della vitamina D₃ dalla silice. I test di rilascio permettono di verificare che il rilascio del farmaco sia effettivamente possibile e di quantificare il farmaco stesso. Consentono, inoltre, di valutare il comportamento del carrier recuperando alla fine del test il residuo.

Generalmente si svolgono i test di rilascio in soluzioni che mimano l'ambiente fisiologico in cui verrà utilizzato il supporto con il farmaco. Per questo motivo, in tale lavoro di tesi, si è scelto di utilizzare una soluzione di sali che simuli il sudore della pelle (artificial sweat, AS) in modo da riprodurre l'ambiente topico [72]. Il campione impregnato scelto per il test è il SBA_8_vitD3.

In seguito, per validare le ipotesi fatte, si è eseguita un'estrazione in etanolo per entrambi i campioni (SBA_8_vitD3 e SBA_4_vitD3).

5.1 Retta di taratura

Prima di eseguire il test di rilascio è necessario costruire una retta di taratura in modo da poter mettere in relazione il valore dell'assorbimento UV/Vis della soluzione utilizzata con concentrazioni note del farmaco.

Di seguito viene elencato il procedimento:

1. Innanzitutto, occorre preparare una soluzione madre di vitamina D₃ nel solvente scelto per il rilascio. La concentrazione della soluzione deve essere sufficientemente elevata, restando però nel limite di solubilità del farmaco, e viene espressa in *ppm* (parti per milione) secondo l'equazione:

$$[vitamina\ D_3] = \frac{mg_{vitamina\ D_3}}{kg_{soluzione}}$$



2. Vengono preparate le soluzioni figlie prelevando delle aliquote dalla soluzione madre successivamente diluite per portare a volume. I ml di soluzione madre da prelevare sono stati calcolati tramite la seguente equazione:

$$V_{madre} = \frac{[vitamina D_3]_{figlia} \cdot V_{figlia}}{[vitamina D_3]_{madre}}$$

3. Per ogni soluzione figlia sono state eseguite tre analisi spettroscopiche UV/Vis. Di queste tre misurazioni viene fatta una media al fine di ottenere le assorbanze necessarie per la realizzazione della retta di taratura (assorbanza in funzione della concentrazione).
4. Utilizzato un foglio di calcolo elettronico, i punti ottenuti vengono interpolati linearmente imponendo l'intercetta nulla. Per valutare la qualità dell'interpolazione occorre prestare attenzione al quadrato del coefficiente di correlazione.

5.2 Rilascio in sudore artificiale

La soluzione scelta per eseguire il test di rilascio è una soluzione di sali che mima il sudore della pelle, poiché tale lavoro di tesi si concentra sulla somministrazione topica del farmaco. Il sudore artificiale è stato preparato seguendo il lavoro di Shimamura *et al.* [72] in modo che la concentrazione degli ioni positivi fosse la stessa del valore medio delle concentrazioni di cationi nel sudore umano. In Tabella 8 sono riportati i grammi di reagenti utilizzati:

Tabella 8: Composizione sudore artificiale.

Sostanza	Peso (g)
NaCl	2,3367
CaCl ₂	0,1331
MgSO ₄	0,0967
KH ₂ PO ₄	0,8168

Allo stesso modo, il pH è stato regolato al valore medio del pH del sudore umano (pH=5,4), aggiungendo ≈ 6 ml di soluzione di NaOH 0,05 M. Successivamente, per costruire la retta di taratura, si procede a realizzare la soluzione madre in etanolo e le soluzioni figlie in AS.



La solubilità della vitamina D₃ in etanolo è di 38 mg/ml, in questo modo il solvente organico permette di ottenere una concentrazione elevata di farmaco. Vengono disciolti quindi 5,1 mg di vitamina D₃ in 10 g di etanolo così da ottenere una soluzione madre con concentrazione pari a 509,79 ppm.

Al fine di realizzare le soluzioni figlie, sono state prelevate delle aliquote crescenti di soluzione madre che vengono portate a peso⁷ con la soluzione di AS. Nella Tabella 9 sono riportati i volumi di soluzione madre prelevati per ottenere le soluzioni figlie e le relative concentrazioni di quest'ultime. Quindi queste sono state esaminate allo spettrofotometro eseguendo per ogni soluzione figlia tre analisi di cui viene fatta una media. Il risultato di tale media corrisponde ad un punto sulla retta di taratura.

Tabella 9: Soluzioni per la retta di taratura della vitamina D₃ in sudore artificiale.

Volume madre (ml)	Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[figlia] _{desiderata} (ppm)	[figlia] _{reale} (ppm)
0,15	0,1067	50,0177	1	1,09
0,15	0,1785	25,1173	2	3,62
0,22	0,1806	25,0326	3,5	3,68
0,30	0,2814	25,0095	5	5,74
0,40	0,3720	25,0165	7,5	7,58
0,60	0,5639	26,4780	10	10,86
1,20	1,0201	25,0751	20	20,74

Inizialmente le concentrazioni delle soluzioni figlie desiderate erano 1, 2, 5, 10 e 20 ppm, ma durante la spettroscopia si è visualizzata una linea di base non nulla per le soluzioni più concentrate, indice della presenza di precipitato del farmaco in soluzione. Questo è dovuto al fatto che la vitamina D₃ è molto poco solubile in acqua. Inoltre, si è osservato che i picchi degli spettri UV/Vis si spostavano abbastanza coerentemente per le concentrazioni iniziali, avendo poi una variazione maggiore per le concentrazioni di 10 e 20 ppm. Di conseguenza, si è preferito scartare i due punti a concentrazione maggiore.

Si è scelto quindi di aggiungere delle soluzioni a concentrazioni intermedie (3,5 e 7,5 ppm) così da avere punti in più per la realizzazione della retta.

La Figura 5.1 mostra le soluzioni figlie in ordine di concentrazione crescente. Dalla concentrazione di 7,5 ppm in poi, si può osservare un graduale aumento della torbidità dovuto alla precipitazione del farmaco.

⁷ Si considerano le masse di soluzione invece dei volumi perché si è scelto di utilizzare i ppm.



Figura 5.1: Soluzioni figlie a concentrazione crescente.

In Figura 5.2 viene rappresentata la retta di taratura della vitamina D₃ in AS (costruita alla lunghezza d'onda $\lambda = 290$ nm), la quale possiede un coefficiente R^2 pari a 0,99079. Tale retta può essere considerata sufficiente ad ottenere risultati attendibili sulla quantità di farmaco rilasciato e sulla cinetica di rilascio.

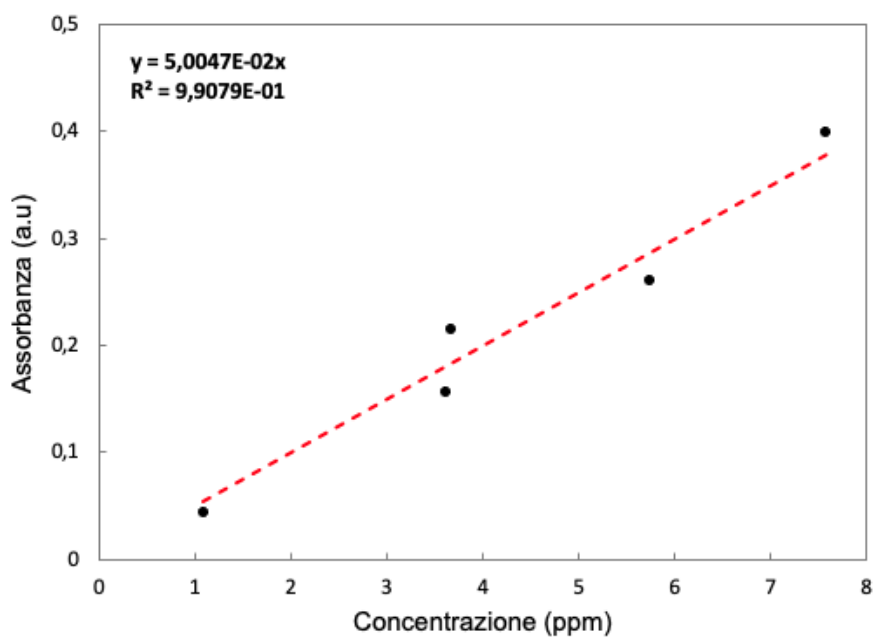


Figura 5.2: Retta di taratura – Vitamina D₃ in sudore artificiale.



5.2.1 Test di rilascio

La strumentazione utilizzata per il test di rilascio comprende uno spettrofotometro e un dissolutore dotato di serbatoio, agitatore meccanico, sistema di riscaldamento e termometro, come si può vedere in Figura 5.3.

Il serbatoio è immerso in un bagno di acqua termostata e possiede un coperchio ad incastro facilmente rimuovibile per aggiungere la soluzione e il campione per il rilascio. Viene utilizzato un termometro per verificare che la temperatura si mantenga costante per tutta la durata della prova. Per svolgere il test, occorre collegare il serbatoio del dissolutore ad uno spettrofotometro UV/Vis (lo strumento è il *Lambda 25 Perkin Elmer*, la cui modalità di utilizzo viene descritta nel paragrafo 3.4.5) tramite un sistema di tubi in silicone a circuito chiuso. Questo sistema comprende una pompa peristaltica che permette di prelevare la soluzione, trasportarla all'interno dello spettrofotometro per l'analisi ed infine reimmetterla nel serbatoio. Il tubo di aspirazione presenta una maglia filtrante per evitare l'ingresso di residui solidi nella cuvette dello spettrofotometro.

Ad intervalli regolari di tempo, viene effettuata automaticamente un'analisi spettroscopica impostata alla lunghezza d'onda di maggior assorbimento della vitamina D₃ nella soluzione scelta.

I parametri di tale test di rilascio sono:

- temperatura: 32 °C⁸;
- velocità di rotazione agitatore meccanico: 100 rpm;
- velocità di rotazione pompa peristaltica: 30 rpm;
- intervallo temporale di acquisizione: 10 secondi;
- durata esperimento: 20 ore.

In tale lavoro di tesi è stato effettuato un rilascio di vitamina D₃ dal campione SBA_8_vitD3, vengono quindi pesati 9,5 mg del campione e aggiunti a 450 g di AS all'interno del serbatoio. È stata impostata la lunghezza d'onda $\lambda = 290$ nm per misurare l'assorbanza della soluzione, corrispondente al valore medio di lunghezza d'onda in cui si ha il massimo assorbimento in AS. A conclusione del test si ottiene un profilo di rilascio espresso in valori di assorbanza che può essere convertito in massa (mg) di vitamina D₃ rilasciata in funzione del tempo.

Successivamente, si è separata la fase liquida da quella solida filtrando la soluzione per gravità attraverso un filtro da 25 μ m (Figura 5.4), il filtrato viene quindi analizzato nuovamente tramite spettroscopia UV/Vis.

⁸ Volendo studiare la somministrazione a livello topico del farmaco la temperatura viene impostata a 32 °C.

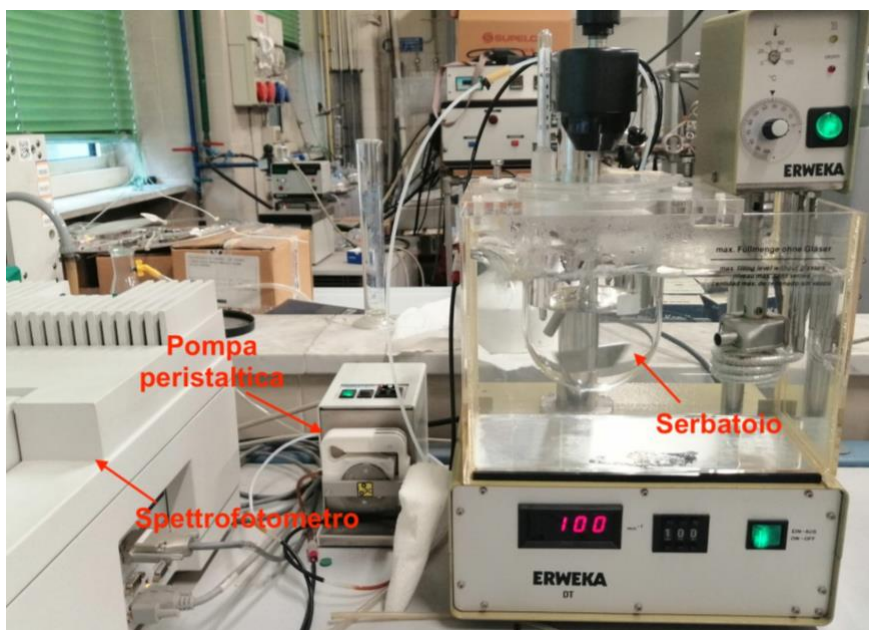


Figura 5.3: Strumentazione per il test di rilascio.



Figura 5.4: Filtrazione della soluzione post rilascio.

Diversamente da come previsto, il test di rilascio non ha mostrato rilascio di vitamina D₃, non si sono riscontrate concentrazioni significative di farmaco nella soluzione ricevente. Infatti, lo spettro UV/Vis effettuato in seguito al filtraggio non restituisce la forma caratteristica della vitamina D₃. In Figura 5.5 si può osservare il confronto tra lo spettro della soluzione filtrata e lo spettro della soluzione figlia in AS di concentrazione 3,5 ppm.

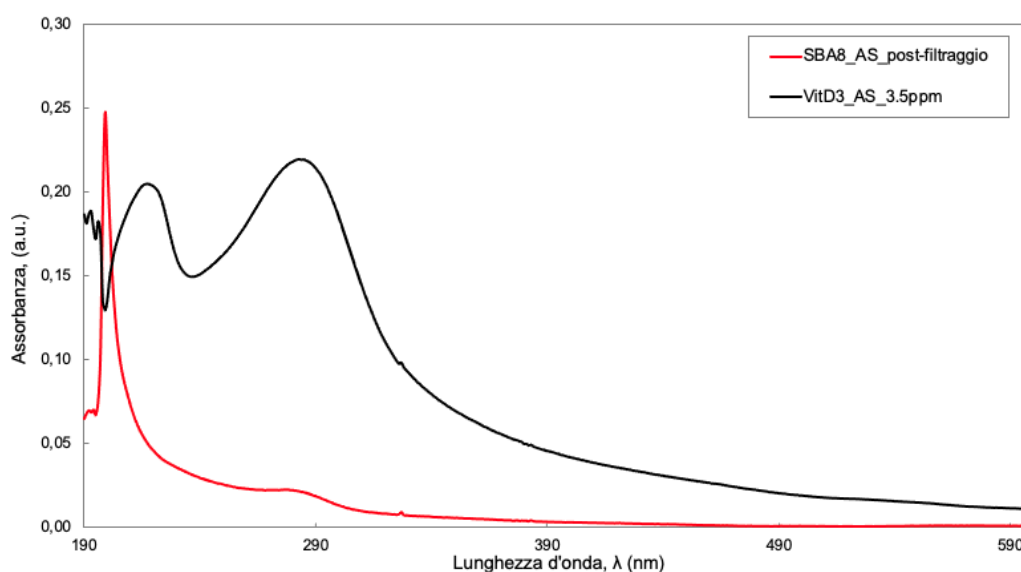


Figura 5.5: Spettro UV/Vis – Confronto tra la soluzione filtrata e la soluzione figlia in AS di 3,5 ppm.

Il risultato ottenuto può essere giustificato con varie ipotesi. Innanzitutto, la soluzione scelta è una soluzione acquosa e, visto che la vitamina D₃ è una molecola altamente idrofobica e pressoché insolubile in acqua, questo può aver impedito il rilascio del principio attivo stesso da parte della silice. Un altro fattore che occorre considerare è la possibile degradazione della vitamina D₃ contenuta nella silice, avvenuta nel tempo che intercorre tra l'impregnazione e il test di rilascio oppure durante il test di rilascio stesso.

Per indagare su quest'ultimo punto, si è eseguita un'analisi spettroscopica FTIR del campione SBA_8_vitD3 dopo diversi giorni dall'incorporazione del farmaco per verificare la presenza della vitamina D₃ e se questa fosse integra o degradata, in base all'eventuale cambiamento dei gruppi funzionali osservati. Lo spettro ottenuto, rappresentato in Figura 5.6, viene confrontato con quello eseguito sul campione subito dopo l'impregnazione. È evidente che la molecola di farmaco sia ancora presente all'interno della silice, ma si nota una diminuzione di intensità della banda dovuta allo stretching del legame C=C.

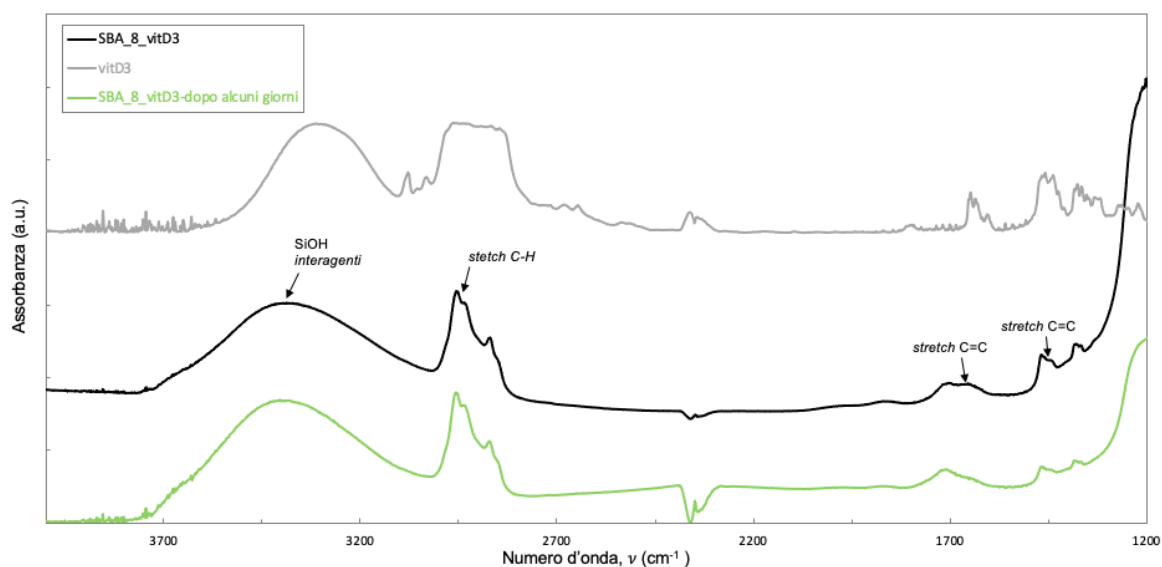


Figura 5.6: Spettro FTIR – Confronto campione SBA_8_vitD₃.

Per comprendere meglio il risultato, è stata quindi necessaria un'altra tecnica di estrazione che comprovi la presenza della molecola di vitamina D₃ all'interno della silice.

5.3 Estrazione in etanolo

La tecnica dell'estrazione tramite solvente viene effettuata per verificare l'effettiva presenza del farmaco nei campioni in esame (SBA_8_vitD₃ e SBA_4_vitD₃). È una tecnica che sfrutta l'elevata affinità della vitamina D₃ per l'etanolo nel tentativo di estrarre tutto il quantitativo di principio attivo dal campione.

Il procedimento⁹ è lo stesso seguito per il rilascio in AS, descritto nei paragrafi precedenti. Vengono disciolti quindi 5 mg di vitamina D₃ in 10 g di etanolo ed è stata ottenuta una soluzione madre con concentrazione pari a 499,57 ppm. Successivamente, vengono realizzate le soluzioni figlie, riportate nella Tabella 10, e la retta di taratura (ottenuta a $\lambda = 265$ nm) (Figura 5.7).

⁹ I dati sperimentali sono stati ottenuti nell'ambito del lavoro di tesi magistrale di Vito Martorella



Tabella 10: Taratura della vitamina D₃ in etanolo.

Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[figlia] _{desiderata} (ppm)	[figlia] _{reale} (ppm)
0,1024	50,0047	1	1,02
0,1036	25,0058	2	2,07
0,2547	25,0103	5	5,09
0,5031	25,0040	10	10,05
1,0062	25,0113	20	20,10
0,7552	12,5025	30	30,18

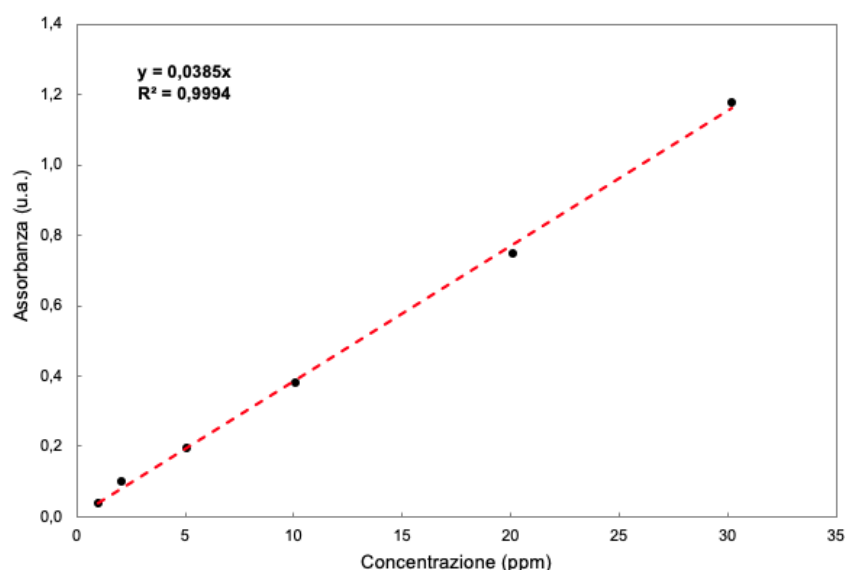


Figura 5.7: Retta di taratura – Vitamina D₃ in etanolo.

In seguito, si sono effettuate due prove di estrazione, una per ogni campione impregnato. Per far ciò, sono stati dispersi 2,3 mg del campione SBA_8_vitD3 in 30,0076 g di etanolo e 2,3 mg del campione SBA_4_vitD3 in 30,0053 g di etanolo. Ad ogni intervallo di tempo prefissato si prelevano, tramite una siringa dotata di filtro, alcuni ml di soluzione e si effettuano tre analisi spettroscopiche UV/Vis. Dopo il prelievo effettuato a 5 ore, la soluzione viene passata agli ultrasuoni in modo tale che il materiale rilasci tutto il farmaco; viene quindi effettuata una nuova analisi spettroscopica.

La prima considerazione che occorre fare è che lo spettro UV/Vis ottenuto dopo l'estrazione è significativamente diverso dallo spettro UV/Vis della vitamina D₃ in etanolo della retta di taratura (Figura 5.8). Quest'ultimo presenta due assorbimenti, uno alla lunghezza d'onda di 212 nm e l'assorbimento più intenso a 265 nm ed è coerente con le analisi della sostanza riportate in letteratura [69] [68].

Nello spettro UV/Vis dell'estratto la situazione è invece molto diversa poiché sono visibili tre assorbimenti massimi, risultanti da possibili spostamenti delle bande, oltre a un drastico cambiamento di intensità. Questo risultato può essere giustificato o con l'effettiva degradazione del farmaco o con un elevato effetto solvente. L'effetto solvente può essere dovuto a un diverso contenuto d'acqua¹⁰, cioè al fatto che sia presente più umidità in questo sistema piuttosto che nel sistema per la retta di taratura e questo è coerente con lo spostamento delle bande. Mentre il cambiamento di intensità sarebbe coerente con la degradazione della vitamina D₃ ed è possibile che questa vada a toccare solo il cromoforo a 265 nm in cui si ha l'assorbimento più intenso, in accordo con l'evidenza ottenuta tramite FTIR di una parziale modifica del legame C=C.

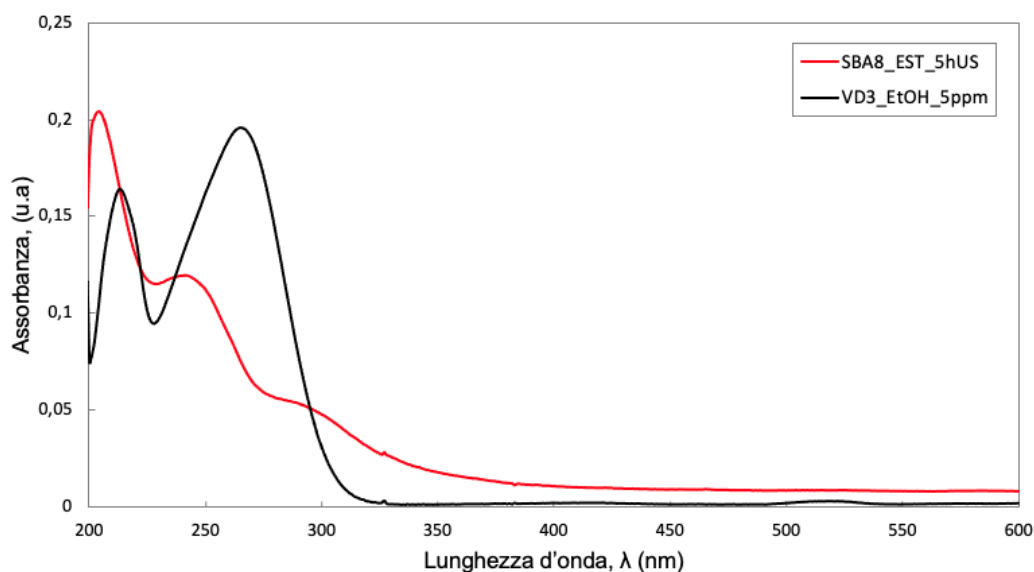


Figura 5.8: Spettro UV/Vis – Confronto tra la soluzione estratta e la soluzione figlia da 5 ppm.

In conclusione, non è ancora possibile fornire una risposta certa, per far ciò servirebbero delle analisi supplementari, come ad esempio un'analisi spettroscopica FTIR sul materiale dopo l'estrazione in EtOH per verificare se sono ancora presenti i picchi caratteristici della vitamina D₃. Purtroppo per mancanza di tempo non è stato possibile nell'abito di tale lavoro di tesi eseguire un'indagine più approfondita.

¹⁰ Il sistema di silice è un sistema idrofilo, per questo motivo un certo quantitativo di acqua può essere ancora presente sulla superficie della silice, nonostante l'analisi TGA mostri che l'acqua fisisorbita fosse diminuita anche in presenza di vitamina D₃.

Capitolo 6

Conclusioni e sviluppi futuri

Nel presente lavoro di tesi sono stati studiati dei sistemi per il rilascio di vitamina D₃ basati su silici mesostrutturate, prestando maggiore attenzione verso la somministrazione topica di tale farmaco date le sue proprietà antipsoriasiche. Sono state utilizzate due silici commerciali a mesoporosità ordinata, le SBA-15, con diametri dei pori differenti.

Dopo un'approfondita analisi bibliografica sulla vitamina D₃ e i sistemi per somministrarla, è stata effettuata la prima parte di lavoro sperimentale dedicata all'incorporazione della vitamina D₃ all'interno dei pori dei due campioni tramite la tecnica Incipient Wetness Impregnation, utilizzando etanolo come solvente.

Nella seconda parte del lavoro è stata eseguita la caratterizzazione chimico-fisica dei campioni impregnati, i quali sono stati sistematicamente confrontati con i campioni di riferimento (supporti tal quali) per valutare gli effetti dell'incorporazione del farmaco.

I dati ottenuti tramite diffrazione a raggi X indicano il mantenimento dello stato amorfo della vitamina D₃ in entrambi i campioni. Nei sistemi di rilascio è preferibile la forma amorfa del farmaco in quanto, essendo metastabile, ha il vantaggio di migliorare considerevolmente la solubilità dello stesso. Dall'analisi termogravimetrica è risultato un elevato grado di incorporazione del principio attivo, infatti il contenuto in massa del farmaco è pari al 24,8% per il campione con pori da 8 nm (SBA_8_vitD3) e 25,9% per il campione con pori da 4 nm (SBA_4_vitD3).

La spettroscopia FTIR ha confermato la presenza di molecole di vitamina D₃ all'interno dei campioni e la loro interazione con la superficie delle silici, dovuta alla formazione dei legami idrogeno con i silanoli. Inoltre, gli spettri dei campioni caricati mostrano lo stato amorfo del farmaco, risultato coerente con quello ottenuto dall'analisi XRD.

I risultati derivanti dall'analisi di adsorbimento di azoto riportano, per entrambi i campioni di silice, una diminuzione dell'area superficiale specifica e del volume poroso a seguito dell'incorporazione della molecola. Il farmaco appare quindi distribuito omogeneamente sulla superficie della silice, tuttavia, almeno in parte, può dar luogo al fenomeno di occlusione dei pori, in particolare nella silice con diametro dei pori minore.



La fase finale del lavoro sperimentale è stata dedicata allo studio del rilascio di vitamina D₃ dalla silice mesostrutturata con diametro poroso maggiore. Il test di rilascio è stato condotto in una soluzione di sudore artificiale, ossia una soluzione che mimi la possibile applicazione del sistema silice-farmaco. Diversamente da come previsto, il risultato del test non è stato soddisfacente in quanto non si sono riscontrate concentrazioni significative di farmaco nella soluzione ricevente.

Dal test di rilascio svolto sul campione si possono supporre alcune ipotesi:

1. La soluzione di sudore artificiale è una soluzione acquosa e, visto che la vitamina D₃ è una molecola altamente idrofobica e pressoché insolubile in acqua, questo può aver impedito il rilascio del principio attivo da parte della silice.
2. Il mancato rilascio della molecola da parte della silice può essere dovuto alla degradazione del farmaco stesso, avvenuta nel tempo che intercorre tra l'impregnazione e il test di rilascio oppure durante il test.

Per indagare maggiormente su questi punti si è eseguita una spettroscopia FTIR del campione SBA_8_vitD3 dopo diversi giorni dall'incorporazione del farmaco. L'analisi ha mostrato che il farmaco è ancora presente all'interno del materiale ma ha subito una parziale modificazione dei legami C=C.

In seguito, è stata sfruttata l'elevata solubilità della vitamina D₃ in etanolo per un'estrazione tramite solvente.

I dati derivanti dall'estrazione mostrano uno spettro UV/Vis che non può essere confrontato con lo spettro della molecola in EtOH della retta di taratura, in quanto sono significativamente diversi. Questo discostamento può essere dovuto alla possibile degradazione della vitamina D₃ che va ad alterare in modo particolare il cromoforo a 265 nm in cui si ha l'assorbimento più intenso.

In conclusione, dato il risultato ottenuto dallo spettro FTIR del campione dopo diversi giorni dall'impregnazione, la vitamina D₃ è presente all'interno del sistema ma non viene rilasciata in quanto non è solubile in una soluzione acquosa come il sudore artificiale.

Sono stati impregnati facilmente due campioni di silice ottenendo un elevato grado di incorporazione, tuttavia l'amorfizzazione del farmaco ottenuta, e confermata dalla caratterizzazione dei campioni tramite diffrazione a raggi X e spettroscopia FTIR, non è sufficiente a superare la solubilità della vitamina in acqua o in una soluzione acquosa salina. Per approfondire la questione e superare questo problema è possibile sviluppare lo studio verso altri approcci per il caricamento del farmaco e/o altre condizioni di rilascio. Tra le diverse strategie si possono ipotizzare:

- La realizzazione di un carrier contenente un tensioattivo che permetta il rilascio del farmaco. Questo approccio è stato studiato per il rilascio di curcumina da parte di un sistema ibrido silice mesostrutturata- esadeciltrimetilammonio (CTA) [73]. La



curcumina, ugualmente poco solubile in acqua, è stata rilasciata dalla silice all'interno di micelle di tensioattivo, che aumentano notevolmente la solubilità del farmaco permettendone quindi il rilascio in soluzione acquosa. Tale sistema può essere ulteriormente migliorato sostituendo il CTA con un tensioattivo che non presenti criticità anche a dosi elevate, come ad esempio sintetizzando un ibrido silice-octenidina dicloridrato (OCT), poiché il CTA risulta essere citotossico ad alte concentrazioni.

- Eseguire un test di rilascio in una soluzione acquosa salina in cui è presente un tensioattivo. Ad esempio, è stato effettuato un test di rilascio di colecalciferolo da microcapsule di lievito in PBS contenente tween 20 [74], un tensioattivo con concentrazione critica micellare molto bassa che aiuta la solubilizzazione della vitamina in soluzione acquosa salina. In questo caso è possibile sviluppare lo studio ottimizzando la soluzione scelta per il rilascio, ossia realizzando una soluzione più complessa contenente delle specie che aiutino il rilascio di vitamina D₃ ma al contempo che simulino l'ambiente fisiologico. Studi recenti hanno dimostrato come la composizione del sudore contenga uno spettro molto più ampio di molecole, tra cui proteine, carboidrati, acidi organici e lipidi [75]. Tra le molecole lipidiche si trovano le ceramidi, si può quindi ipotizzare l'aggiunta della componente lipidica alla soluzione di sudore artificiale in modo da aumentare la solubilità della vitamina D₃ nella soluzione. Nello stesso studio [75], i ricercatori sono andati ad esaminare la composizione del sudore nel contesto di differenti malattie cutanee correlandole alla presenza di specifici mediatori lipidici del sudore. Per quanto riguarda la malattia della psoriasi, i biomarcatori lipidici evidenziati sono le ceramidi, di cui si registra una diminuzione, e le prostaglandine PGE₂ e PGF_{2a}. Potrebbe essere interessante, in un futuro, simulare tramite l'aggiunta di questi componenti una soluzione di sudore artificiale patologico.
- Progettare una formulazione, ad esempio una crema all'interno della quale disperdere il carrier, contenente specie lipofile che aiutino la vitamina D₃ ad uscire dalla silice e la veicolino sulla pelle. Un esempio di queste specie può essere l'isopropilmiristato (IPM), un eccipiente lipofilo ampiamente utilizzato in campo farmaceutico e cosmetico per le sue proprietà leganti ed emollienti; è un solvente inodore e incolore, e oltre alla possibilità di favorire l'uscita del principio attivo è in grado di riempire gli spazi vuoti creati tra le cellule dello strato corneo a causa della desquamazione cutanea. Presenta inoltre l'attività di *penetration enhancer* (promotore dell'assorbimento), capace di aumentare la velocità di rilascio e il coefficiente di permeabilità di vari farmaci [76].



POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Bibliografia

- [1] J. M. Ballard, L. Zhu, E. D. Nelson, and R. A. Seburg, "Degradation of vitamin D3 in a stressed formulation: The identification of esters of vitamin D3 formed by a transesterification with triglycerides," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 1, pp. 142–150, 2007, doi: 10.1016/j.jpba.2006.06.036.
- [2] H. F. DeLuca, "Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 6 Suppl, pp. 1689–1696, 2004, doi: 10.1093/ajcn/80.6.1689s.
- [3] H. F. DeLuca, "History of the discovery of vitamin D and its active metabolites," *Bonekey Rep.*, vol. 3, no. JANUARY, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1038/bonekey.2013.213.
- [4] W. H. Okamura *et al.*, "Chemistry and conformation of vitamin D molecules," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 53, no. 1–6, pp. 603–613, 1995, doi: 10.1016/0960-0760(95)00107-B.
- [5] T. Ramezanli, B. E. Kilfoyle, Z. Zhang, and B. B. Michniak-Kohn, "Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3," *Int. J. Pharm.*, vol. 516, no. 1–2, pp. 196–203, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.10.072.
- [6] S. F. and T. G., *Biochimica medica: strutturale metabolica e funzionale*, 1st ed. 1992.
- [7] I. Novak and A. W. Potts, "Electronic structure of vitamins D2 and D3," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1319, no. 1, pp. 86–90, 1997, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00118-1.
- [8] C. F., *Fisiologia medica*, S. I. 2005.
- [9] P. M. Frances, "Vitamin D Status and Health," *Food Sci. Nutr.*, vol. 50, no. S1, pp. 24–25, 2010, doi: DOI: 10.1080/10408398.2010.526858.
- [10] R. P. Heaney, "Vitamin D and calcium interactions: Functional outcomes," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 88, no. 2, pp. 541–544, 2008, doi: 10.1093/ajcn/88.2.541s.
- [11] G. Jones, S. A. Strugnell, and H. F. DeLuca, "Current understanding of the molecular actions of vitamin D," *Physiol. Rev.*, vol. 78, no. 4, pp. 1193–1231, 1998, doi: 10.1152/physrev.1998.78.4.1193.
- [12] J. N. W. N. Barker, R. E. Ashton, R. Marks, R. I. Harris, and J. Berth-Jones, "Topical maxacalcitol for the treatment of psoriasis vulgaris: A placebo- controlled, double-blind, dose-finding study with active comparator," *Br. J. Dermatol.*, vol. 141, no. 2, pp. 274–278, 1999, doi: 10.1046/j.1365-2133.1999.02975.x.
- [13] H. Onal, E. Adal, S. Alpaslan, A. Ersen, and A. Aydin, "Is daily 400 IU of vitamin D supplementation appropriate for every country: A cross-sectional study," *Eur. J. Nutr.*, vol. 49, no. 7, pp. 395–400, 2010, doi: 10.1007/s00394-010-0097-8.
- [14] A. Alsaqr, M. Rasouly, and F. M. Musteata, "Investigating Transdermal Delivery of Vitamin D3," *AAPS PharmSciTech*, vol. 16, no. 4, pp. 963–972, 2015, doi: 10.1208/s12249-015-0291-3.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] MEDICINA ONLINE, “Vie di somministrazione di un farmaco: tipi, differenze, vantaggi e svantaggi.” .
- [18] R. E. Grossmann and V. Tangpricha, “Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: A systematic review,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 54, no. 8, pp. 1055–1061, 2010, doi: 10.1002/mnfr.200900578.
- [19] N. S. Rejinold, H. K. Kim, A. F. Isakovic, D. L. Gater, and Y. C. Kim, “Therapeutic vitamin delivery: Chemical and physical methods with future directions,” *J. Control. Release*, vol. 298, no. January, pp. 83–98, 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.01.038.
- [20] M. F. Holick *et al.*, “Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. 3, pp. 677–681, 2008, doi: 10.1210/jc.2007-2308.
- [21] M. Nino and P. Santoianni, “Topici dermatologici (e sistemi di veicolazione intradermica),” in *Dermatologia allergologica nel bambino e nell’adolescente*, Milano: Springer Milan, 2012, pp. 37–43.
- [22] M. Sarkiri, S. C. Fox, L. E. Fratila-Apachitei, and A. A. Zadpoor, “Bioengineered skin intended for skin disease modeling,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 6, 2019, doi: 10.3390/ijms20061407.
- [23] Medicina per tutti, “Struttura della cute.” .
- [24] N. El Tayar, R. -S Tsai, B. Testa, P. -A Carrupt, C. Hansch, and A. Leo, “Percutaneous penetration of drugs: A quantitative structure-permeability relationship study,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 80, no. 8, pp. 744–749, 1991, doi: 10.1002/jps.2600800807.
- [25] M. Pradhan, D. Singh, and M. R. Singh, “Novel colloidal carriers for psoriasis: Current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches,” *J. Control. Release*, vol. 170, no. 3, pp. 380–395, 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.05.020.
- [26] J. S. Lewis *et al.*, “A combination dual-sized microparticle system modulates dendritic cells and prevents type 1 diabetes in prediabetic NOD mice,” *Clin. Immunol.*, vol. 160, no. 1, pp. 90–102, 2015, doi: 10.1016/j.clim.2015.03.023.
- [27] L. Vora, S. V G, and P. Vavia, “Zero order controlled release delivery of cholecalciferol from injectable biodegradable microsphere: In-vitro characterization and in-vivo pharmacokinetic studies,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 107, pp. 78–86, 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2017.06.027.
- [28] A. Simonazzi, A. G. Cid, M. Villegas, A. I. Romero, S. D. Palma, and J. M. Bermúdez, *Nanotechnology applications in drug controlled release*. 2018.
- [29] K. D. Cashman and R. O’Dea, “Exploration of strategic food vehicles for vitamin D fortification in low/lower-middle income countries,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 195, no. June, p. 105479, 2019, doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105479.
- [30] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, and D. J. McClements, “Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility,” *Food Chem.*, vol. 187, pp. 499–506, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.065.



- [31] M. Haham *et al.*, “Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles,” *Food Funct.*, vol. 3, no. 7, pp. 737–744, 2012, doi: 10.1039/c2fo10249h.
- [32] C. Vitale Brovarone, “Dispense lezioni.” .
- [33] Z. Mai *et al.*, “Novel functional mesoporous silica nanoparticles loaded with Vitamin E acetate as smart platforms for pH responsive delivery with high bioactivity,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 508, pp. 184–195, 2017, doi: 10.1016/j.jcis.2017.07.027.
- [34] W. H. Boehncke and M. P. Schön, “Psoriasis,” *Lancet*, vol. 386, no. 9997, pp. 983–994, 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7.
- [35] V. Meynen, P. Cool, and E. F. Vansant, “Verified syntheses of mesoporous materials,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 125, no. 3, pp. 170–223, 2009, doi: 10.1016/j.micromeso.2009.03.046.
- [36] J. V. Smith, “Topochemistry of Zeolites and Related Materials. 1. Topology and Geometry,” *Chem. Rev.*, vol. 88, no. 1, pp. 149–182, 1988, doi: 10.1021/cr00083a008.
- [37] 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.
- [38] Z. A. Allothman, “A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials,” *Materials (Basel)*, vol. 5, no. 12, pp. 2874–2902, 2012, doi: 10.3390/ma5122874.
- [39] J. S. B. C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, “Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism,” *Nature*, vol. 359, pp. 167–169, 1992.
- [40] G. Øye, J. Sjöblom, and M. Stöcker, “Synthesis, characterization and potential applications of new materials in the mesoporous range,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 89–90, pp. 439–466, 2001, doi: 10.1016/S0001-8686(00)00066-X.
- [41] F. Rouquerol, J. Rouquerol, and K. Sing, *Adsorption by Powders and Porous Solids*, 2nd ed. Academic Press, 1999.
- [42] J. S. Beck *et al.*, “A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 27, pp. 10834–10843, 1992, doi: 10.1021/ja00053a020.
- [43] J. C. Vartuli *et al.*, “Effect of Surfactant/Silica Molar Ratios on the Formation of Mesoporous Molecular Sieves: Inorganic Mimicry of Surfactant Liquid-Crystal Phases and Mechanistic Implications,” *Chem. Mater.*, vol. 6, no. 12, pp. 2317–2326, 1994, doi: 10.1021/cm00048a018.
- [44] J. S. Beck, J. C. Vartuli, G. J. Kennedy, C. T. Kresge, W. J. Roth, and S. E. Schramm, “Molecular Or Supramolecular Templating: Defining The Role of Surfactant Chemistry In the Formation of M41S and Zeolitic Molecular Sieves,” *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 98, no. C, pp. 15–16, 1995, doi: 10.1016/S0167-2991(06)81064-5.
- [45] C. Jeffrey Brinker, “Sol-gel processing of silica,” *Colloid. Silica Fundam. Appl.*, pp. 615–635, 2005, doi: 10.1016/s0022-3093(86)80078-3.
- [46] T. L. Chew, A. L. Ahmad, and S. Bhatia, “Ordered mesoporous silica (OMS) as an adsorbent and membrane for separation of carbon dioxide (CO₂),” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 153, no. 1–2, pp. 43–57, 2010, doi: 10.1016/j.cis.2009.12.001.
- [47] S. Kawi and M. W. Lai, “Supercritical fluid extraction of surfactant template from MCM-41,” *Chem.*



- Commun.*, no. 13, pp. 1407–1408, 1998, doi: 10.1039/a802907e.
- [48] M. Herrero, A. Cifuentes, and E. Ibañez, “Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review,” *Food Chem.*, vol. 98, no. 1, pp. 136–148, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.058.
- [49] https://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_dioxide, “Carbon_dioxide_p-T_phase_diagram.” .
- [50] Z. Huang, L. Xu, J. H. Li, S. Kawi, and A. H. Goh, “Organic template removal from hexagonal mesoporous silica by means of methanol-enhanced CO₂ extraction: Effect of temperature, pressure and flow rate,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 77, no. 1, pp. 112–119, 2011, doi: 10.1016/j.seppur.2010.11.029.
- [51] 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.
- [52] J. Florek, R. Caillard, and F. Kleitz, “Evaluation of mesoporous silica nanoparticles for oral drug delivery-current status and perspective of MSNs drug carriers,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 40, pp. 15252–15277, 2017, doi: 10.1039/c7nr05762h.
- [53] 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.
- [54] M. Olovar Cucarella, “Design of novel bio-gated nanomaterials for sensing and therapeutic applications,” 2017.
- [55] P. Gurikov and I. Smirnova, “Amorphization of drugs by adsorptive precipitation from supercritical solutions: A review,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 132, pp. 105–125, 2018, doi: 10.1016/j.supflu.2017.03.005.
- [56] Z. Li, Y. Zhang, and N. Feng, “Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 16, no. 3, pp. 219–237, 2019, doi: 10.1080/17425247.2019.1575806.
- [57] A. Gignone, “Ordered Mesoporous Silica for Drug Delivery in Topical Applications,” 2016.
- [58] M. Banchemo, 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.
- [59] A. Bouledjoudja, Y. Masmoudi, M. Van Speybroeck, L. Schueller, and E. Badens, “Impregnation of Fenofibrate on mesoporous silica using supercritical carbon dioxide,” *Int. J. Pharm.*, vol. 499, no. 1–2, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.049.
- [60] A. Gignone, M. Delle Piane, M. Corno, P. Ugliengo, and B. Onida, “Simulation and Experiment Reveal a Complex Scenario for the Adsorption of an Antifungal Drug in Ordered Mesoporous Silica,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, no. 23, pp. 13068–13079, 2015, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b02666.
- [61] A. Hillerström, J. van Stam, and M. Andersson, “Ibuprofen loading into mesostructured silica using liquid carbon dioxide as a solvent,” *Green Chem.*, vol. 11, no. 5, pp. 662–66, 2009, doi: 10.1039/b821281c.
- [62] A. Gignone, L. Manna, S. Ronchetti, M. Banchemo, and B. Onida, “Incorporation of clotrimazole in



- Ordered Mesoporous Silica by supercritical CO₂,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 200, pp. 291–296, 2014, doi: 10.1016/j.micromeso.2014.05.031.
- [63] Geochemical Instrumentation and Analysis, “X-ray Powder Diffraction (XRD).” https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html.
- [64] “Bragg’s Law of Diffraction.” <https://www.microscopy.ethz.ch/bragg.htm>.
- [65] “Spettroscopia FT-IR.pdf.”
- [66] “‘SlidePlayer’. [Online].” <https://slideplayer.it/slide/10794993/>.
- [67] F. Xia, H. Jin, Y. Zhao, and X. Guo, “Supercritical antisolvent-based technology for preparation of vitamin D 3 proliposome and its characteristics,” *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 19, no. 6, pp. 1039–1046, 2011, doi: 10.1016/S1004-9541(11)60089-X.
- [68] K. T. Koshy and W. F. Beyer, *VITAMIN D3 (CHOLECALCIFEROL)*, vol. 13. 1984.
- [69] M. K. Trivedi and S. Jana, “Physicochemical , Thermal , and Spectroscopic Characterization of the Consciousness Energy Healing Treated Cholecalciferol,” vol. 2, no. 2, pp. 1–11, 2019.
- [70] N. Ignjatović, V. Uskoković, Z. Ajduković, and D. Uskoković, “Multifunctional hydroxyapatite and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 2, pp. 943–950, 2013, doi: 10.1016/j.msec.2012.11.026.
- [71] M. Thommes, “Powder Tech Note 31,” *Quantachrome Instruments*, pp. 731–732, 2003.
- [72] T. Shimamura *et al.*, “Investigation of the release test method for the topical application of pharmaceutical preparations: Release test of cataplasm including nonsteroidal anti-inflammatory drugs using artificial sweat,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 52, no. 2, pp. 167–171, 2004, doi: 10.1248/cpb.52.167.
- [73] M. Gallo, F. Giudice, M. Banchemo, S. Ronchetti, L. Manna, and B. Onida, “A mesostructured hybrid CTA–silica carrier for curcumin delivery,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 96, no. 1, pp. 236–246, 2020, doi: 10.1007/s10971-020-05374-0.
- [74] E. Dadkhodazade, A. Mohammadi, S. Shojae-Aliabadi, A. M. Mortazavian, L. Mirmoghtadaie, and S. M. Hosseini, “Yeast Cell Microcapsules as a Novel Carrier for Cholecalciferol Encapsulation: Development, Characterization and Release Properties,” *Food Biophys.*, vol. 13, no. 4, pp. 404–411, 2018, doi: 10.1007/s11483-018-9546-3.
- [75] K. Agrawal, R. K. Sivamani, and J. W. Newman, “Noninvasive profiling of sweat-derived lipid mediators for cutaneous research,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 25, no. 1, pp. 3–11, 2019, doi: 10.1111/srt.12617.
- [76] M. R. Nasca, G. Puglisi, and C. Carbone, “Farmacologia della cute,” *Le basi della dermatologia*, pp. 197–213, 2014, doi: 10.1007/978-88-470-5283-3_13.



POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Ringraziamenti

A conclusione di questo lavoro di tesi e del mio percorso universitario trovo necessario, oltretutto doveroso, dedicare un ringraziamento generale a quanti hanno contribuito al raggiungimento di questo mio traguardo e nello specifico a due persone su tutte.

In primo luogo, il grazie più sentito va alla professoressa Onida, la cui sincera disponibilità, la costante presenza ed i preziosi consigli assumono un valore doppio in considerazione del momento particolare che tutti stiamo vivendo. Seppur a distanza, i suoi incoraggiamenti sono stati fondamentali per compiere gli ultimi e decisivi passi.

Vorrei poi ringraziare la dottoressa Marta Gallo per il continuo supporto e per avermi accompagnato nel primo approccio alla ricerca rendendolo un impegno piacevole. In questi mesi gli insegnamenti da lei ricevuti sono stati un fattore importante per la mia crescita.