

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Particelle ibride a base di silice per il rilascio di curcumina: valorizzazione del processo di sintesi



Relatore

prof.ssa Barbara Onida

Correlatori

prof. Mauro Banchemo
dott.ssa Marta Gallo

Candidato

Elena Zuena

Marzo 2021

Indice

Indice.....	II
Elenco delle tabelle	VI
Elenco delle figure	VII
Acronimi.....	X
Introduzione	XI
Particelle di silice per il rilascio di farmaci.....	1
1.1. Introduzione	1
1.2. Processo sol-gel.....	2
1.2.1. Rapporto acqua/alossido	3
1.2.2. Tipo e quantità di catalizzatore	3
1.2.3. Previsione dei prodotti	5
1.3. Metodo di Stöber.....	6
1.4. Materiali mesoporosi e mesostrutturati	8
1.4.1. Vantaggi delle silici mesostrutturate.....	10
1.4.2. Ruolo del tensioattivo	11
1.5. Materiali ibridi a base di silice per <i>drug delivery</i>	13
1.5.1. Dimensioni e morfologia delle particelle.....	14
1.5.2. Interazione farmaco – <i>templating agent</i>	15
1.5.3. Esempi di sistemi ibridi a base di silice in letteratura.....	16
Sintesi di silice mesostrutturata a partire da scarti	19
2.1. Introduzione	19
2.2. Principali processi per la purificazione di silice dagli scarti.....	19
2.2.1. Leaching.....	20
2.2.2. Fusione alcalina	20
2.3. Silici da rifiuti industriali	22
2.3.1. Silice da scarti della produzione energetica.....	22
2.3.2. Silice da scarti agricoli.....	23
2.3.3. Silice da <i>e-waste</i>	26
Il principio attivo: stabilità e degradazione	29
3.1. Introduzione	29
3.2. Effetto della luce	29
3.3. Presenza di umidità in dosaggi solidi e semisolidi.....	31

3.3.1.	Reazioni di idrolisi.....	31
	pH del mezzo	32
	Ruolo dei metalli.....	33
	Idrolisi degli eccipienti	34
3.3.2.	Plasticizzazione del farmaco.....	34
3.4.	Effetto della temperatura e del calore	35
3.5.	Ruolo del pH	35
3.6.	Reazioni di ossidazione.....	36
	Curcumina	39
4.1.	Introduzione	39
4.2.	Struttura chimica e proprietà.....	39
	4.2.1. Struttura.....	39
	4.2.2. Proprietà chimiche	40
	4.2.3. Tautomeria cheto-enolica.....	40
4.3.	Produzione.....	42
4.4.	Reattività	43
	4.4.1. Reazioni con i ROS.....	43
	4.4.2. Reazioni di degradazione	44
	Processi fotochimici.....	44
	Degradazione chimica.....	45
	4.4.3. Metabolismo <i>in vivo</i>	46
4.5.	Azioni terapeutiche	46
4.6.	Nanotecnologie per il <i>delivery</i> di curcumina	48
	4.6.1. Nanoemulsioni	48
	Tipologie e produzione di nanoemulsioni.....	48
	Vantaggi e svantaggi delle nanoemulsioni	49
	4.6.2. Nanoliposomi.....	50
	Tipologie e produzione di nanoliposomi	50
	Vantaggi e svantaggi dei nanoliposomi	51
	4.6.3. Nanoparticelle lipidiche	52
	Produzione di SLN.....	52
	Vantaggi e svantaggi delle SLN	53
	4.6.4. Nanoparticelle polimeriche	54
	Tipologie e produzione di nanoparticelle polimeriche	54
	Vantaggi e svantaggi delle nanoparticelle polimeriche	58

4.6.5.	Ciclodestrine	58
	Vantaggi e svantaggi delle ciclodestrine.....	60
4.6.6.	Silici mesoporose, mesostrutturate, ibride	60
	Materiali e metodi	61
5.1.	Materiali	61
5.2.	Metodi	61
5.2.1.	Sintesi.....	61
5.2.2.	Tecniche di caratterizzazione.....	63
	Analisi termogravimetrica (ATG).....	63
	Spettroscopia UV-VIS	63
	Diffrazione a raggi X	65
	Spettroscopia FT-IR.....	66
5.2.3.	Estrazione in etanolo.....	67
	Prima sintesi da materie prime (HYBRID_RAW_1) e da filtrato (HYBRID_FILTRATE_1)	69
6.1.	Sintesi HYBRID_RAW_1	69
6.2.	Calcolo dei reagenti necessari per la sintesi HYBRID_FILTRATE_1.....	70
6.3.	Sintesi HYBRID_FILTRATE_1	72
6.3.1.	Procedimento	72
6.3.2.	Risultati e caratterizzazione	73
	Analisi ATG.....	74
	Spettroscopia FT-IR.....	75
	Diffrazione a raggi X	77
	Estrazione in etanolo.....	78
	Spettroscopia UV-VIS sul filtrato.....	79
	Osservazioni.....	79
	Seconda sintesi da filtrati (HYBRID_FILTRATE_2)	81
7.1.	Procedimento.....	81
7.1.1.	Osservazioni.....	84
7.2.	Risultati e caratterizzazione	87
7.2.1.	Analisi ATG.....	88
7.2.2.	Spettroscopia FT-IR.....	89
7.2.3.	Diffrazione a raggi X	91
7.2.4.	Estrazione in etanolo.....	91
7.2.5.	Spettroscopia UV-VIS sul filtrato.....	94
7.2.6.	Osservazioni.....	95

Conclusioni e sviluppi futuri	97
Sintesi HYBRID_RAW_3	99
A.1. Introduzione	99
A.2. Risultati e caratterizzazione	99
A.2.1. Spettroscopia UV-VIS su HYBRID_RAW_3	99
A.2.2. Spettroscopia FT-IR su HYBRID_RAW_3.....	101
A.2.3. Estrazione in etanolo di HYBRID_RAW_3	102
Osservazioni.....	102
A.2.4. Spettroscopia UV-VIS su PREHYBRID_RAW_3 e HYBRID_RAW_3_fil a 16 giorni dall'ottenimento	104
Bibliografia.....	108

Elenco delle tabelle

Tabella 2.3.1. Composizione chimica media di <i>fly ashes</i> dalla combustione del carbone, ottenuta da analisi XRF (adattata da [3]).	22
Tabella 5.2.1. Rapporti molari utilizzati per le sintesi da materie prime HYBRID_RAW_1 e HYBRID_RAW_2.	62
Tabella 6.2.1. Quantità molari dei reagenti utilizzati per la sintesi REF.	70
Tabella 6.2.2. Rapporti molari utilizzati per le sintesi HYBRID_RAW_1 e HYBRID_FILTRATE_1.	72
Tabella 6.2.3. Quantità teoriche dei reagenti da aggiungere al filtrato di HYBRID_RAW_1.	72
Tabella 6.3.1. Risultati analisi termogravimetrica della sintesi HYBRID_FILTRATE_1.	74
Tabella 6.3.2. Confronto tra i rapporti molari effettivi di HYBRID_RAW_1 e quelli di HYBRID_FILTRATE_1.	80
Tabella 6.3.3. Rapporti molari della sintesi 19 di Cai <i>et al.</i> [228], che fornisce silici MCM-41 ordinate.	80
Tabella 7.1.1. Composizione di HYBRID_RAW_2_fil ipotizzata.	83
Tabella 7.1.2. Quantità di reagenti aggiunte a HYBRID_RAW_2_fil_1D.	84
Tabella 7.1.3. Assorbimenti notevoli dello spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil prima e dopo la notte.	85
Tabella 7.2.1. Risultati analisi termogravimetrica della sintesi HYBRID_FILTRATE_2.	88

Elenco delle figure

Figura 1.2.1. Sequenza di reazioni per la sintesi di silici a partire da alcossisilani [15].	2
Figura 1.2.2. Idrolisi e condensazione nel processo in catalisi acida [13].	4
Figura 1.2.3. Specie del silicio nel processo sol-gel ordinate secondo la densità elettronica dell'atomo di silicio [13].	4
Figura 1.2.4. Idrolisi e condensazione nel processo sol-gel in catalisi basica [13].	4
Figura 1.2.5. Velocità relative di idrolisi e di condensazione come funzione del pH per un alcossido di silicio [13].	5
Figura 1.2.6. Formazione di specie cicliche durante il processo sol-gel [19].	5
Figura 1.3.1. Formazione di polisilicati mediante il processo di Stöber [20].	6
Figura 1.4.1. Formazione di micelle [32].	9
Figura 1.4.2. Formazione di silici mesoporose MCM-41 [24].	10
Figura 1.4.3. Tipologie di silici mesoporose [2].	10
Figura 1.4.4. Meccanismo di formazione delle MCM-41 [20].	12
Figura 1.4.5. Meccanismo di <i>swelling-shrinking</i> nella formazione di particelle di silice mesoporosa [45].	13
Figura 1.5.1. Schema di produzione di silici contenenti CTAB e camptotecina [60].	17
Figura 1.5.2. Disposizione del principio attivo nei pori di SC-PX (sopra) e SP-PX (sotto).	18
Figura 2.2.1. Solubilità della silice e degli idrossidi metallici al variare del pH [63].	20
Figura 2.3.1. Pretrattamento di <i>bottom ashes</i> per la sintesi di silici mesoporose (adattato da [89]).	23
Figura 2.3.2. Processi di fusione alcalina (a) e uso diretto (b) per la produzione di silici mesoporose a partire da scarti dell'industria fotonica [67].	27
Figura 3.3.1. Meccanismo generale di idrolisi [126].	32
Figura 3.3.2. Meccanismo di idrolisi in ambiente basico [126].	32
Figura 3.3.3. Meccanismo di idrolisi in ambiente acido [126].	33
Figura 3.6.1. Meccanismo di autossidazione: in (a) lo stadio iniziatore, in (b) gli stadi di propagazione, in (c) lo stadio di terminazione [142].	37
Figura 4.2.1. Struttura chimica della curcumina [151].	39
Figura 4.2.2. Tautomeria cheto-enolica della curcumina [153].	41
Figura 4.2.3. Forme chetoniche/enoliche e cis/trans possibili per la curcumina [153].	41
Figura 4.3.1. Tipica estrazione di curcumina in estrattore Soxhlet [170].	43
Figura 4.4.1. Meccanismi di degradazione della curcumina in soluzione e in forma cristallizzata [158].	44
Figura 4.4.2. Prodotti di idrolisi della curcumina [155].	45
Figura 4.4.3. La reazione di degradazione della curcumina è una autossidazione che fornisce biciclopentadiene [181].	45
Figura 4.6.1. Sistemi colloidali per l'incapsulamento della curcumina [166].	48
Figura 4.6.2. Tipologie di nanoemulsioni [198].	49
Figura 4.6.3. Rappresentazione schematica di un liposoma; la curcumina si posiziona all'interno del doppio strato fosfolipidico [202].	50
Figura 4.6.4. Tipologie di SLN (in bianco, la miscela lipidica; in bianco e nero, il principio attivo liposolubile) [210].	52
Figura 4.6.5. Confronto tra nanoparticelle lipidiche solide (SLN) e carrier lipidici nanostrutturati (NLC) [210].	54

Figura 4.6.6. Meccanismo di incapsulamento per evaporazione del solvente [20]	55
Figura 4.6.7. Schema del processo di desolvazione [20].	57
Figura 4.6.8. Inclusione di un principio attivo in una (a destra) o due (a sinistra) β -ciclodestrine [82].	59
Figura 5.2.1. Schema delle sintesi a partire da materie prime.	62
Figura 5.2.2. Interferenza costruttiva.	65
Figura 6.1.1. Sintesi HYBRID_RAW_1 macinata.	69
Figura 6.1.2. Schema della sintesi HYBRID_FILTRATE_1.....	70
Figura 6.3.1. Filtrato di HYBRID_RAW_1 dopo circa 15 h al buio.	72
Figura 6.3.2. HYBRID_FILTRATE_1 macinata.....	73
Figura 6.3.3. Filtrato sintesi HYBRID_FILTRATE_1.	73
Figura 6.3.4. Curve TG e dTG relative alla sintesi HYBRID_FILTRATE_1.	74
Figura 6.3.5. Spettro FT-IR della curcumina pura [245].	75
Figura 6.3.6. Spettro FT-IR del CTAB [246].....	75
Figura 6.3.7. Spettro FT-IR di HYBRID_FILTRATE_1 in vuoto e a pressione atmosferica.	75
Figura 6.3.8. Confronto picchi caratteristici delle vibrazioni del legame C-H fra campione HYBRID_FILTRATE_1 (a sinistra) e un analogo di letteratura (a destra) [247].	76
Figura 6.3.9. Spettro XRD ad alti angoli di HYBRID_FILTRATE_1.	77
Figura 6.3.10. Spettro XRD a bassi angoli di HYBRID_FILTRATE_1.	77
Figura 6.3.11. Campione HYBRID_FILTRATE_1 estratto in etanolo dopo 5 ore.	78
Figura 6.3.12. Spettro UV-VIS dell'estratto di HYBRID_FILTRATE_1 dopo 5 ore.	78
Figura 6.3.13. Spettro UV-VIS del filtrato di HYBRID_FILTRATE_1.	79
Figura 7.1.1. HYBRID_RAW_2_fil appena ottenuto.....	81
Figura 7.1.2. Spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil diluito 1:20 con NaOH 0.05 M.	82
Figura 7.1.3. Filtrato della sintesi HYBRID_RAW_2 dopo una notte di conservazione al buio.	82
Figura 7.1.4. Spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil_1D diluito 1:20 con NaOH 0.05 M.	83
Figura 7.1.5. Schema della sintesi HYBRID_FILTRATE_2.....	84
Figura 7.1.6. Spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil a confronto con HYBRID_RAW_2_fil_1D.....	85
Figura 7.1.7. Spettro UV-VIS della curcumina in NaOH 0.5 M nel corso di 14 ore [252].	86
Figura 7.2.1. Campione solido HYBRID_FILTRATE_2 dopo macinatura.	87
Figura 7.2.2. Confronto HYBRID_FILTRATE_1 (a sinistra) e HYBRID_FILTRATE_2 (a destra).....	87
Figura 7.2.3. Da sinistra a destra: HYBRID_RAW_1, HYBRID_FILTRATE_1, HYBRID_RAW_2, HYBRID_FILTRATE_2.	87
Figura 7.2.4. Curve TG e dTG relative alla sintesi HYBRID_FILTRATE_2.....	88
Figura 7.2.5. Spettro FT-IR di HYBRID_FILTRATE_2 in vuoto.	89
Figura 7.2.6. Confronto spettro FT-IR di HYBRID_FILTRATE_2 con campioni MESO_SiO ₂ _cur e MESO_SiO ₂ (tratti da [238]).	90
Figura 7.2.7. Spettro XRD ad alti angoli di HYBRID_FILTRATE_2.	91
Figura 7.2.8. Spettro XRD a bassi angoli di HYBRID_FILTRATE_2.	91
Figura 7.2.9. Spettro UV-VIS dell'estratto di HYBRID_FILTRATE_2.....	92
Figura 7.2.10. Andamento dell'ampiezza del picco a 425 nm nel tempo.....	92
Figura 7.2.11. Retta di taratura della curcumina in etanolo [238].	93
Figura 7.2.12. Filtrato della sintesi HYBRID_FILTRATE_2.	94
Figura 7.2.13. Spettro UV-VIS del filtrato della sintesi HYBRID_FILTRATE_2 dopo diluizione 1:6.....	94

Figura 7.2.14. Confronto tra le assorbanze di HYBRID_FILTRATE_2_fil e
HYBRID_RAW_2_fil_1D..... 96

Acronimi

CMC	<i>Critical Micellar Concentration</i> , Concentrazione Critica Micellare.
CTAB	Bromuro di cetil-trimetilammonio.
DDS	<i>Drug Delivery System</i> , Sistema di rilascio del farmaco.
MCM	<i>Mobil Composition of Matter</i> .
MSN	<i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i> , Nanoparticelle di silice mesoporosa.
NADPH	Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato.
NLC	<i>Nano Lipid Carrier</i> , Carrier lipidici nanostrutturati.
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Risonanza Magnetica Nucleare.
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Tampone fosfato salino.
PEG	Glicole polietilenico.
PLA	Polilattato.
PLGA	Acido poli(lattico-co-glicolico).
RDS	<i>Rate Determining Step</i> .
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Specie reattive dell'ossigeno.
SBA	<i>Santa Barbara Amorphous</i> .
SLN	<i>Solid Lipid Nanoparticles</i> , Nanoparticelle lipidiche.
TEOS	Tetraetil Ortosilicato.
TMOS	Tetrametil Ortosilicato.
UV	Ultravioletto.
XRD	Diffrazione di raggi X.
XRF	Fluorescenza di raggi X.

Introduzione

I *drug delivery system* (DDS) sono formulazioni o dispositivi che consentono l'azione selettiva di un farmaco sul sito *target*, senza effetti collaterali su organi o tessuti [1]; il termine *drug delivery system* può essere utilizzato come sinonimo di *carrier* di farmaco. Tali sistemi, inoltre, consentono di superare alcune problematiche tipiche dei farmaci tradizionali, quali la scarsa biodisponibilità, la stabilità limitata, l'impossibilità di regolare il profilo di rilascio, la presenza di effetti collaterali [2]. Per questa ragione, i *drug delivery system* rappresentano una delle principali innovazioni della medicina moderna e il loro impiego spazia da formulazioni per l'uso topico, a farmaci per assunzione orale, fino a preparati iniettabili [3]. Tra i *drug delivery system*, le particelle di silice sono particolarmente apprezzate per le loro caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità, versatilità e resistenza meccanica e termica [4]. Queste particelle vengono generalmente prodotte mediante un processo sol-gel, in condizioni blande di temperatura e pressione [5]. Le particelle ibride a base di silice, oggetto del presente lavoro di tesi, uniscono alle proprietà della matrice silicea quelle della fase organica in essa inclusa [6]. Esse includono principi attivi lipofili nella fase organica e sono in grado di incrementarne biodisponibilità e stabilità; possono essere opportunamente funzionalizzate in superficie in maniera da migliorare la specificità del farmaco e ridurre gli effetti collaterali [6].

Il principio attivo scelto per il presente lavoro di tesi, la curcumina, è un potenziale candidato per l'incorporazione in matrici ibride. La curcumina è una sostanza lipofila, da secoli apprezzata per le sue proprietà antisettiche e antinfiammatorie [7]. Il suo utilizzo in medicina è tuttavia limitato a causa della sua scarsa biodisponibilità e stabilità nei mezzi acquosi [8]. Vari *drug delivery system* quali nanoliposomi, nanoemulsioni e nanoparticelle polimeriche sono stati impiegati in formulazioni contenenti curcumina [9]. In questo senso, le particelle ibride a base di silice potrebbero rappresentare un'interessante alternativa, in grado di incrementare la stabilità del principio attivo e allo stesso tempo proteggerlo efficacemente da luce, calore, variazioni di pH. L'incorporazione di principio attivo in forma amorfa, inoltre, possibile in queste particelle, può incrementare la sua attività verso le cellule [10].

Le particelle ibride contenenti curcumina realizzate nel presente lavoro di tesi sono ottenute con un processo sol-gel che utilizza bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB) come agente templante e tetraetil ortosilicato (TEOS) come precursore della silice. La curcumina viene inglobata all'interno delle micelle di tensioattivo e ha ruolo di agente co-templante. Il procedimento di sintesi determina la formazione di un filtrato di scarto che contiene un certo quantitativo di materie prime. Lo scopo del presente lavoro di tesi è presentare un processo per la valorizzazione di tale filtrato: questo scarto viene utilizzato per la sintesi di altre particelle.

Il primo capitolo mostra una panoramica dello stato dell'arte riguardo la sintesi di particelle di silice e il processo sol-gel, insieme ad un breve *excursus* riguardante l'utilizzo delle particelle ibride a base di silice come *drug delivery system*. Nel secondo capitolo si discute la possibilità di sintetizzare particelle di silice mesoporosa e mesostrutturata a partire da scarti della produzione industriale e si descrivono i principali processi impiegati a tale scopo. Il terzo

capitolo illustra le principali problematiche di stabilità dei principi attivi farmaceutici e alcuni *case study* di letteratura riguardanti la loro soluzione. In questo capitolo si pone particolare attenzione sulle problematiche di stabilità tipiche della curcumina, riscontrate anche nello svolgimento del lavoro sperimentale. Il quarto capitolo descrive la curcumina, le sue proprietà chimiche e le principali applicazioni in campo farmaceutico; descrive, inoltre, i sistemi nanotecnologici utilizzati per il suo rilascio insieme ai rispettivi vantaggi e svantaggi di ciascuno. Il quinto, il sesto e il settimo capitolo illustrano le sintesi a partire da materie prime e da filtrati, insieme alle tecniche di caratterizzazione utilizzate e ai risultati ottenuti. In una breve appendice finale si descrive una sintesi da materie prime aggiuntiva, il cui studio ha fornito importanti informazioni riguardanti la degradazione del principio attivo nell'ambiente basico dei filtrati e delle possibili soluzioni a tale problematica.

In sintesi, nel presente lavoro si è sviluppato un processo di recupero di un filtrato di scarto. A partire da tale filtrato è stato possibile sintetizzare particelle ibride contenenti curcumina, e impiegare perciò la curcumina residua nel filtrato che avrebbe altrimenti rappresentato un rifiuto.

Il processo sviluppato prevede l'aggiunta di CTAB al filtrato appena ottenuto per proteggere la curcumina dalla degradazione grazie al suo inserimento nelle micelle di tensioattivo. L'efficienza di incorporamento della curcumina nel materiale è stata piuttosto contenuta (8%), ed è stato possibile raggiungere un contenuto di curcumina nel materiale ibrido di solo lo 0.64% w/w, perciò sarà necessario in futuro ottimizzare ulteriormente il processo. La fattibilità del recupero della curcumina presente nel filtrato è stata tuttavia dimostrata.

Capitolo 1

Particelle di silice per il rilascio di farmaci

1.1. Introduzione

L'utilizzo di tecnologie submicrometriche ha consentito un progresso considerevole in tutti i campi della scienza, dall'informatica, al settore dell'ecologia, alla medicina [3, 11]. In particolare, lo studio delle particelle submicrometriche per il successivo impiego terapeutico è uno degli ambiti più prolifici e promettenti della ricerca medica [3].

In questo capitolo introduttivo si illustreranno le caratteristiche delle particelle di silice, con particolare riguardo per i materiali ibridi da esse derivati. La silice (SiO_2) è un composto inorganico, fra i maggiori costituenti della crosta terrestre e dei terreni; allo stato libero è presente soprattutto nella sua forma cristallina, detta quarzo [12].

Le sospensioni colloidali¹ di particelle di silice, comunemente indicate come silici colloidali, sono una materia prima per la produzione di vetri e vengono utilizzate, ad esempio, nell'industria siderurgica e nella produzione di isolanti; hanno uso, peraltro, nell'industria alimentare; rispetto al quarzo, in queste sospensioni la silice si trova in forma amorfa² [12]. La silice colloidale può essere impiegata nella produzione delle particelle di silice oggetto di questo lavoro secondo il processo sol-gel, descritto nel paragrafo seguente.

¹ Un colloide è una sospensione di particelle con dimensioni comprese fra 1 nm e 1 μm disperse in un liquido [17].

² Un materiale si dice amorfo quando non possiede una struttura cristallina ordinata [17].

1.2. Processo sol-gel

Sono processi sol-gel quelli in cui una soluzione acquosa di un alcossido metallico $[M_n(OR)_n]$ è convertita in *network* inorganico. Da questi processi è possibile ottenere vetri inorganici di elevata purezza senza la necessità di temperature elevate; è possibile, inoltre, sintetizzare silici amorfe in varie forme (gel stampati, aerogel, xerogel, ...) e materiali porosi per numerose applicazioni [13].

In breve, un processo sol-gel prevede la conversione di un “sol”, un colloide di piccole particelle disperse in un liquido, in “gel”, una sostanza costituita da un *network* continuo che include in sé una fase liquida. Le reazioni sol-gel consistono quindi in una serie di reazioni di idrolisi e condensazione di monomeri alcossido inorganici per formare particelle colloidali (sol) ed ottenere poi la loro conversione in un *network* (gel) [13]. Il momento del processo corrispondente alla conversione, che consiste essenzialmente in un incremento di viscosità, è detto punto di gel [14]. Al fine di sintetizzare gel di silice, precursori molto utilizzati sono gli alcossisilani come tetrametil ortosilicato (TMOS) e tetraetil ortosilicato (TEOS). Le reazioni di idrolisi del TEOS, mostrate in Figura 1.2.1, hanno inizio non appena dell’acqua è aggiunta a una soluzione di TEOS in condizioni acide, basiche o neutre, in presenza di un catalizzatore che renda la velocità di reazione apprezzabile [13].

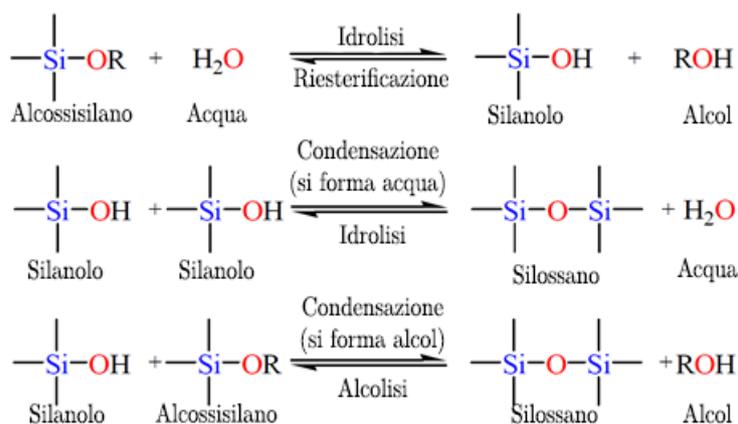


Figura 1.2.1. Sequenza di reazioni per la sintesi di silici a partire da alcossisilani [15].

Il meccanismo di idrolisi dipende dal catalizzatore, mentre la sua velocità dipende dal pH, dal rapporto acqua/alcossido e dal solvente. Gli alcossisilani non sono solubili in acqua, perciò è spesso necessario impiegare un co-solvente organico al fine di facilitarne l'idrolisi [16]. Generalmente si sceglie l'alcol corrispondente al gruppo alcossido (ad esempio, nel caso di TMOS, la scelta ricade sul metanolo), ma sono riportati esempi di altri alcol utilizzati nella sintesi. Questa scelta consente un miglior controllo della cinetica del processo: diversamente, l'alcossido va incontro a reazioni di scambio con gli alcol che hanno un effetto determinante sulla cinetica del processo finale e devono quindi essere tenute in conto [13].

In breve, il processo sol-gel schematizzato in Figura 1.2.1 è riassumibile in due passaggi:

1. Idrolisi del precursore della silice. In presenza di acqua (ed eventualmente di un alcol che ne facilita la solubilizzazione), il precursore della silice idrolizza dando un silanolo ($-\text{Si} - \text{OH}$) e un alcol ($\text{R} - \text{OH}$). Questa reazione è un equilibrio, dunque, insieme all'idrolisi, avremo anche una ri-esterificazione [13].
2. Formazione della struttura silossano $-\text{Si} - \text{O} - \text{Si} -$. La formazione di un silossano può avvenire in due maniere: il silanolo formato al passaggio precedente può reagire con un altro silanolo (dando silossano ed acqua) o con il precursore alcossido (dando silossano e alcol).

All'aumentare dei ponti silossano, le particelle formano aggregati, i quali costituiscono la fase sol e si disperdono nella soluzione. Condensando fra di loro, i *cluster* silicati possono dar forma al *network* che costituisce il gel. Dal momento che idrolisi e condensazione avvengono in contemporanea, non è detto che la condensazione dei silanoli cominci solamente dopo che tutto il precursore presente ha idrolizzato [15].

Data la complessità di un processo sol-gel, sono numerosi i parametri che determinano il prodotto finale: di seguito si approfondiranno i principali.

1.2.1. Rapporto acqua/alcossido

Tutti gli stadi del processo sol-gel sono fortemente influenzati dal rapporto acqua/alcossido: la struttura del gel finale, infatti, dipende dal tempo di gelazione, il quale a sua volta dipende dall'equilibrio fra idrolisi e condensazione; tale equilibrio è in ultima analisi determinato dal rapporto acqua/alcossido [14]. Il valore stechiometrico del rapporto acqua/alcossido (r , o R_w in letteratura) è pari a 4: ciò indica che, per idrolizzare completamente un alcossido tetravalente, sono necessarie 4 molecole d'acqua [13].

Vari studi mostrano che l'aumento del rapporto acqua/alcossido determina un maggiore contenuto di silice [15]. L'affermazione non è del tutto ovvia, in quanto tra gli stadi del processo sol-gel la condensazione può determinare formazione di acqua; secondo il principio di Le-Chatelier, dunque, la presenza di maggior quantità d'acqua dovrebbe spostare verso i reagenti l'equilibrio della reazione di condensazione. Grazie alla maggiore solubilità della silice e alla maggior concentrazione di ione idrossido, tuttavia, lo step di condensazione risulta cineticamente favorito da un rapporto acqua/alcossido maggiore [15].

1.2.2. Tipo e quantità di catalizzatore

Un catalizzatore è, come noto, una sostanza in grado di incrementare la velocità di una reazione senza essere consumata nel processo [17]. In un processo sol-gel, la struttura del sol dipende essenzialmente dalla scelta del catalizzatore; anche la velocità della transizione sol-gel e il tempo di gelazione, perciò, ne saranno fortemente dipendenti [13]. Una prima necessaria distinzione, che determina due differenti percorsi di reazione per il processo sol-gel, è quella fra catalizzatore acido e catalizzatore basico.

Nei processi con catalisi acida, l'ossigeno del gruppo $-\text{Si} - \text{OR}$ si comporta da nucleofilo attirando i protoni liberi in soluzione; diventa dunque "più positivo" e attrae a sé gli elettroni del silicio, che assume una carica parziale positiva (la sequenza di reazioni è mostrata in Figura 1.2.2) [13].

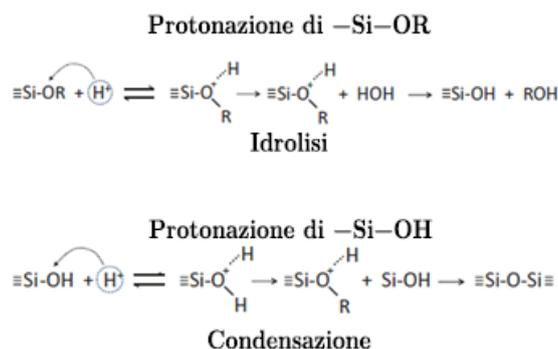


Figura 1.2.2. Idrolisi e condensazione nel processo in catalisi acida [13].

Il silicio diventa un elettrofilo, più reattivo nei confronti dell'acqua; l'ultimo passaggio delle reazioni di idrolisi consiste nella formazione di un gruppo silanolo $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ e di un alcol $\text{R}-\text{OH}$. Anche nella fase di condensazione l'atomo di silicio si comporta da nucleofilo; tuttavia, dal momento che la velocità di reazione dipende dalla densità elettronica dell'atomo di silicio, massima nella forma $-\text{Si}-\text{OR}$ iniziale, in catalisi acida la velocità di reazione diminuisce nel corso del processo e l'idrolisi è perciò più rapida della condensazione (in Figura 1.2.3 è mostrato l'ordine di reattività delle specie del silicio).



Figura 1.2.3. Specie del silicio nel processo sol-gel ordinate secondo la densità elettronica dell'atomo di silicio [13].

Nel caso di catalisi basica, sono nucleofili gli ioni OH^- che attaccano il silicio direttamente (il silicio possiede una carica positiva parziale a causa della sua vicinanza all'ossigeno). Nell'idrolisi, gli ioni $-\text{OH}^-$ sostituiscono i gruppi $-\text{OR}$; successivamente, nella condensazione, gli ioni $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$ sostituiscono i gruppi $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ (Figura 1.2.4).

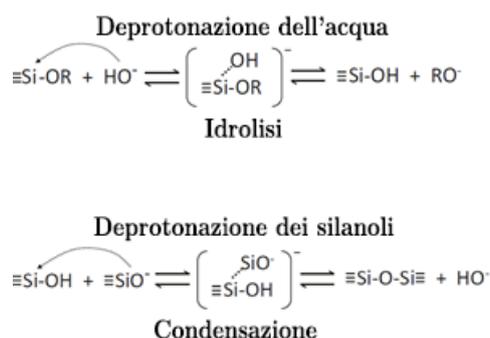


Figura 1.2.4. Idrolisi e condensazione nel processo sol-gel in catalisi basica [13].

Al contrario di ciò che avviene per la catalisi acida, in ambiente basico la condensazione è più veloce dell'idrolisi, poiché la velocità di reazione è maggiore per specie del silicio con minor densità elettronica; in Figura 1.2.5 sono mostrate le velocità relative di idrolisi e condensazione al variare del pH [13].

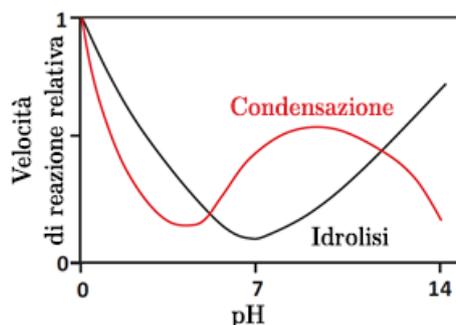


Figura 1.2.5. Velocità relative di idrolisi e di condensazione come funzione del pH per un alcossido di silicio [13].

Un'ulteriore differenza, dovuta alle diverse modalità di reazione, riguarda il prodotto finale ottenuto. Se in catalisi acida la presenza del silicio elettrofilo determina la prevalenza di strutture lineari, la catalisi basica fornisce strutture più ramificate: il gel avrà dunque una struttura più densa nel caso di catalisi acida, più "porosa" nel caso di catalisi basica [18].

1.2.3. Previsione dei prodotti

Un aspetto particolarmente critico nel controllo del processo sol-gel con alcossidi riguarda la varietà dei prodotti ottenibili: è infatti noto che, durante la reazione, nel sol possono formarsi numerose specie intermedie quali monomeri reattivi, dimeri, trimeri e aggregati ad anello o *cage-like* di precursore [13] (Figura 1.2.6).

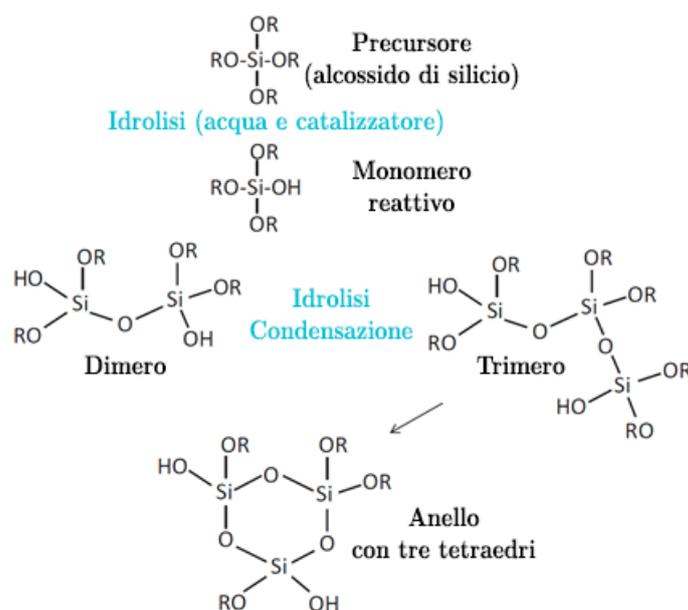


Figura 1.2.6. Formazione di specie cicliche durante il processo sol-gel [19].

La formazione di questi intermedi di reazione è difficilmente controllabile, e ad oggi nessun modello è in grado di prevederla con sufficiente accuratezza. Il modello classico del *random branching*, in base al quale gli oligomeri presentano medesima reattività indipendentemente dal numero di connessioni presenti, non è adeguato alla descrizione della gelificazione di strutture inorganiche. Inoltre, gli intermedi di reazione presentano reattività differenti fra di loro e ciò rappresenta un'ulteriore fonte di complessità del processo sol-gel [13]. Il modello classico non considera, peraltro, la formazione di anelli di precursore, che è invece favorita cineticamente (si parla di *non-random cyclization* [13, 19]) [13]: tali strutture cicliche, formate da due, tre, fino a sei tetraedri silicati, possono costituire dei centri di nucleazione; a partire da questi aggregati si formano le strutture tridimensionali che costituiranno il gel. Gli aggregati costituiti

da almeno quattro tetraedri sono i più stabili; la ciclizzazione può essere sia intramolecolare che intermolecolare [13]. Il processo di formazione di oligomeri è differente a seconda della tipologia di catalizzatore impiegato [19]:

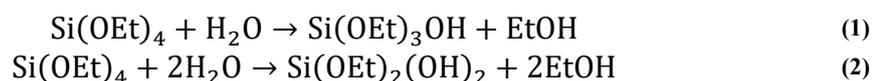
- in catalisi acida vi è compresenza di ciclizzazione intermolecolare e intramolecolare, in quanto entrambe risultano ugualmente favorite; la reattività degli oligomeri si riduce con una certa regolarità all'aumentare della ramificazione di questi ultimi;
- in catalisi basica si verifica una netta prevalenza della ciclizzazione intermolecolare; l'andamento della reattività degli oligomeri con la loro ramificazione non è regolare come in catalisi acida ed è dunque difficilmente prevedibile.

La quantificazione delle specie cicliche formate durante il processo sol-gel riveste una fondamentale importanza nella sua modellazione teorica; soprattutto nei processi in catalisi acida, peraltro, questo fenomeno governa l'elasticità del gel ottenuto e le proprietà del materiale finale, nonché il tempo necessario per la gelazione [19, 48, 49]. Dal momento che la formazione di specie intermedie in catalisi basica è di difficile previsione, tuttavia, si preferisce trascurare questo aspetto, soprattutto quando ciò che interessa sono le proprietà del materiale finale e non il tempo di gelazione [13].

Nel paragrafo seguente si descriverà il “metodo di Stöber”, una applicazione del processo sol-gel dalla quale deriva la maggioranza dei processi utilizzati per la sintesi di particelle di silice.

1.3. Metodo di Stöber

Il processo di Stöber, così chiamato dal chimico che per primo lo applicò nel 1968 [5], è una reazione sol-gel che consiste nell'aggiunta di un precursore della silice (tetralchilsilicato, in genere TEOS) a una soluzione acquosa di alcol e ammoniaca; la presenza dell'ammoniaca è necessaria per la catalisi basica della reazione (il processo è più rapido in ambiente basico, [5, 20]). L'aggiunta del precursore alla soluzione alcolica dà inizio ad una serie di reazioni di idrolisi (Reazioni (1) e (2)):



Le specie prodotte dalle reazioni di idrolisi (etanolo ed etossisilanoli) possono poi condensare con il TEOS o con un altro silanolo (Reazioni (3), (4), (5) e Figura 1.3.1):

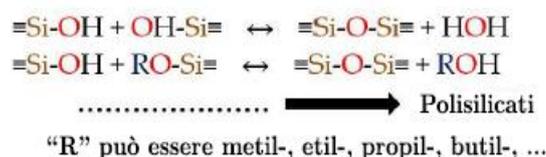
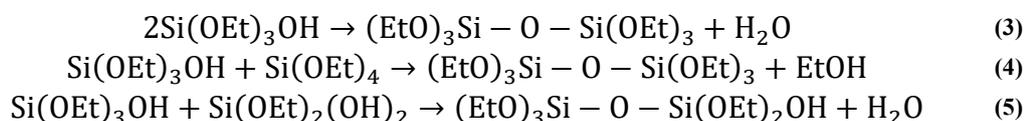


Figura 1.3.1. Formazione di polisilicati mediante il processo di Stöber [20].

Queste reazioni avvengono “a catena”, determinando il successivo *cross-linking* e la formazione di particelle colloidali di silice, con diametro tra i 50 e i 2000 nm (conversione del sol in gel) [20]. Dal processo Stöber si ottengono particelle non porose, con carica superficiale negativa che le stabilizza e ne riduce l'aggregazione [21].

Il metodo di Stöber è stato sottoposto a numerose modifiche per ottenere particelle sempre più piccole e monodisperse; in particolare, al fine di ottenere particelle dalle dimensioni uniformi, è necessario il controllo di pH, temperatura di reazione, concentrazione del precursore della silice nonché presenza di eventuali co-solventi [20].

Fowler *et al.* e Sadasivan *et al.* [22, 23], ad esempio, sono stati in grado di sintetizzare particelle fini e ordinate con un approccio, detto *growth-quench* (“crescita e spegnimento”), che prevede lo spegnimento della sequenza di idrolisi e condensazione: a 40 s dall’inizio della reazione viene aggiunta acqua in eccesso, mentre dopo 60-220 s si aggiunge acido cloridrico diluito fino a neutralizzare il pH [20, 22, 23]. Le operazioni appena descritte consentono di ridurre la coalescenza tra particelle, nonché la velocità di condensazione della silice, e in ultimo forniscono particelle più fini. Ritardando maggiormente la neutralizzazione si ottengono particelle di dimensioni maggiori. Questo metodo presenta comunque delle limitazioni: il *quenching* mediante neutralizzazione della miscela porta a particelle poco ordinate e stabili; la diluizione della miscela di reazione, peraltro, rende lo *scale-up* più difficoltoso [24].

Il metodo di Stöber rappresenta tuttora la base per la sintesi di particelle di silice sferiche; una sua versione modificata consente di sintetizzare particelle di silice porose con struttura ordinata. Di tali particelle, dette di silice mesoporosa e mesostrutturata, si discuterà nel paragrafo seguente.

1.4. Materiali mesoporosi e mesostrutturati

In base alla definizione fornita dalla IUPAC, un materiale si dice mesoporoso quando presenta un ordine a lungo raggio dovuto a porosità di diametro compreso fra 2 e 50 nm [25]. Dei materiali porosi fanno parte le zeoliti³, con eccellenti proprietà catalitiche, le cui applicazioni biomedicali sono tuttavia limitate a causa della dimensione ridotta dei loro pori (tra 0.2 e 1.0 nm [26]), e le silici mesoporose, con porosità fra i 2 e i 50 nm. Al contrario delle zeoliti, tipicamente cristalline, le silici mesoporose sono caratterizzate da una struttura amorfa con ordine a lungo raggio. Le zeoliti, come già detto, presentano porosità di dimensioni nanometriche; tale proprietà le ha rese particolarmente adeguate come “setacci molecolari”, essendo questi materiali capaci di adsorbire selettivamente le molecole sulla base delle loro dimensioni [15]. Le dimensioni dei pori, pur rendendo le zeoliti adatte ad impieghi nella catalisi e nella separazione di sostanze, sono tuttavia insufficienti per applicazioni che richiedano la “cattura” di molecole organiche di grandi dimensioni. A partire dalla scoperta delle zeoliti nel XVIII secolo e in seguito allo studio delle loro caratteristiche vantaggiose, emerse perciò la necessità di materiali con porosità più grandi, adeguati all’applicazione nella *bioremediation*⁴, nell’industria petrolifera, nell’ambito biomedicale.

All’inizio degli anni ’90, infine, diversi gruppi di ricerca giunsero a risultati simili nella sintesi di materiali mesoporosi [27, 28, 29, 30]: in breve, fu evidenziata la possibilità di sintetizzare materiali mesostrutturati utilizzando dei tensioattivi come *template* (o *structure directing agent*), attorno al quale si formava la struttura di silice. Il *templating* propriamente detto determina una profonda relazione fra porzione organica e porzione inorganica del materiale, tanto che la silice formatasi intorno al *template* contiene quest’ultimo e ne riflette la geometria [15]. I tensioattivi sono dei *template* di tipo “auto-assemblante”: nelle soluzioni con concentrazione superiore al valore critico micellare, le molecole di tensioattivo si organizzano autonomamente in micelle, strutture generalmente sferiche dove sono orientate in maniera tale da esporre alla fase acquosa le teste idrofile e mantenere all’interno le code idrofobiche. Il processo di formazione delle micelle è un processo spontaneo, favorito termodinamicamente [25, 31] (Figura 1.4.1).

³ Le zeoliti sono minerali alluminosilicati, caratterizzati da una struttura tridimensionale costituita da tetraedri di silicio, alluminio ed ossigeno [295].

⁴ Si definisce *bioremediation* l’uso di microrganismi non patogeni per la decontaminazione di ambienti inquinati [282].

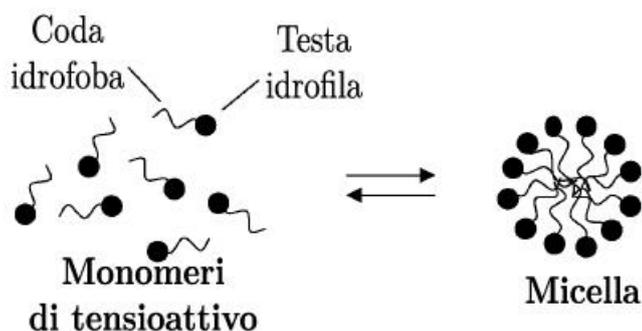


Figura 1.4.1. Formazione di micelle [32].

Nonostante la scoperta dei materiali mesoporosi fosse avvenuta quasi in contemporanea, il materiale brevettato dalla Mobil rappresentò il vero punto di svolta, probabilmente a causa dello scarso dettaglio degli altri report. Questa silice, chiamata MCM-41 (*Mobil Composition of Matter*), è il primo esempio di silice mesoporosa ed è tuttora tra le più impiegate in ambito sperimentale.

La silice MCM-41 è caratterizzata da una struttura esagonale bidimensionale, con pori di diametro tra i 2.5 e i 6 nm ed è ottenuta utilizzando tensioattivi cationici come *template* [26]; rispetto ai tentativi di sintesi precedenti, la MCM-41 è fra le prime ad utilizzare le strutture formate spontaneamente dalle molecole di tensioattivo al posto di singoli ioni o singole molecole. In pratica, il *template* fa da “stampo organico” intorno al quale il materiale inorganico può nucleare e crescere; l’insieme di porzione organica (il tensioattivo) e inorganica (la silice) costituisce una silice mesostrutturata [33]. In seguito alla rimozione del *template*, la porzione inorganica mantiene la struttura data da esso e si ottiene una silice mesoporosa [20].

Grün *et al.* (1997) hanno per primi utilizzato una versione modificata del processo di Stöber per sintetizzare particelle di MCM-41 submicrometriche (MSN, nanoparticelle di silice mesoporosa) [34]: aggiungendo un tensioattivo cationico alla miscela in reazione (costituita da etanolo, TEOS e ammoniaca) è stato possibile ottenere le micelle necessarie per la formazione di porosità nel materiale finale (il processo è schematizzato in Figura 1.4.2). La silice risultante presenta un certo ordine a lungo raggio, con porosità leggermente più piccole rispetto ad analoghi di letteratura ma un’isoterma di adsorbimento di tipo IV secondo la classificazione IUPAC⁵, il che conferma la sua struttura mesoporosa [35]. Le particelle ottenute hanno diametri fra i 400 e i 1100 nm e sono quasi tutte perfettamente sferiche, pur con una certa aggregazione fra di esse.

⁵ L’isoterma di adsorbimento descrive la quantità di gas adsorbito su un materiale in funzione della pressione per una certa temperatura. La forma dell’isoterma di adsorbimento è associata alla dimensione dei pori (tipo I per materiali microporosi; tipo II, III o VI per materiali macroporosi o non porosi; tipo IV o V per materiali mesoporosi) [35].



Figura 1.4.2. Formazione di silici mesoporosi MCM-41 [24].

Altri materiali mesoporosi sono la MCM-48 con struttura cubica e la MCM-50 con struttura lamellare (anch'esse sintetizzate dalla Mobil, ma con minore stabilità e semplicità di sintesi rispetto alla MCM-41), inoltre la SBA-11, con struttura cubica, la SBA-15, con struttura esagonale, e la SBA-16 con struttura *cubic-cage* (SBA significa *Santa Barbara Amorphous*, in onore dell'università di Santa Barbara in California che le scoprì circa 6 anni dopo rispetto alla MCM-41) [15] (Figura 1.4.3).



Figura 1.4.3. Tipologie di silici mesoporosi [20].

Rispetto alle silici MCM, le SBA presentano maggiore resistenza meccanica e termica e pori più grandi; per queste ragioni, rappresentano una scelta preferibile nel campo della catalisi [15].

1.4.1. Vantaggi delle silici mesostrutturate

A partire dalla loro scoperta, le silici mesoporose e mesostrutturate hanno attirato l'attenzione del mondo scientifico grazie alle loro caratteristiche uniche, tra cui si ricordano [26]:

- Dimensioni facilmente regolabili, che consentono l'adattamento delle particelle all'ingresso in numerosi bersagli cellulari differenti;
- Dimensioni dei pori facilmente regolabili fra 2 e 6 nm, che le rendono adatte come *carrier*⁶ di numerosi farmaci;
- Elevata resistenza a variazioni di pH, stress meccanici, calore (maggiore rispetto a *carrier* di altra natura, come i *carrier* polimerici o lipidici);
- Elevato volume poroso (maggiore di 0.9 cm³/g [26]) e grande superficie specifica (maggiore di 800 m²/g [26]), caratteristiche fondamentali per le applicazioni in ambito medico e catalitico: una superficie specifica elevata è fondamentale per la maggiore reattività della molecola all'interno del *carrier* [26], inoltre pori di dimensioni maggiori consentono l'incorporazione di maggiori quantità di farmaco;

⁶ Si definisce *carrier* di un farmaco una molecola in grado di trasportare un principio attivo verso il rispettivo sito *target*, proteggendo la sostanza e incrementandone biodisponibilità e specificità [39].

- Facilità di fabbricazione, costo ridotto.

Come già detto, un DDS consente di migliorare la specificità di un farmaco per il rispettivo sito *target* [1]. I DDS ambiscono a superare alcune problematiche tipiche della medicina tradizionale, quali la scarsa specificità e biodisponibilità di alcuni farmaci, l'impossibilità di regolare il profilo di rilascio, la presenza di effetti collaterali [2].

In questo senso, le particelle submicrometriche di silice mesoporosa o mesostrutturata costituiscono un sistema particolarmente promettente: oltre alle caratteristiche già citate, questi *carrier* sono caratterizzati da ottima biocompatibilità e biodegradabilità; in ragione delle loro dimensioni, possono essere captati dalle cellule per endocitosi⁷ [2, 36].

Una ulteriore caratteristica comune a silici mesoporese e mesostrutturate è la possibilità di incorporare principi attivi in forma amorfa, inibendo per ragioni steriche la loro ricristallizzazione; l'utilizzo di principi attivi in forma amorfa garantisce una maggiore solubilità e, di conseguenza, una maggiore biodisponibilità [37, 38, 39]. Hancock e Parks [10] hanno quantificato questo effetto per l'indometacina, un principio attivo idrofobico, mediante analisi calorimetriche; la solubilità del principio attivo amorfo rispetto alla forma cristallina più stabile è aumentata da 10 a 1600 volte.

1.4.2. Ruolo del tensioattivo

La maggioranza dei materiali mesostrutturati è sintetizzata utilizzando un *template* generalmente organico [40]. Tale *template* può essere di tipo "auto-assemblante", come nel caso dei tensioattivi al di sopra della propria concentrazione critica micellare (CMC). Il ruolo del tensioattivo nel processo sol-gel, tuttavia, non è stato ancora del tutto chiarito ed è oggetto di studio. Una possibile ipotesi riguardo il meccanismo di azione del tensioattivo nella formazione delle MCM-41, verificata con studi di *scattering* di neutroni a bassi angoli, è che inizialmente (prime fasi di idrolisi) il precursore della silice tenda a adsorbirsi sulla superficie esterna degli aggregati di micelle, riducendo la loro carica superficiale; a causa delle successive idrolisi e condensazioni del precursore, la repulsione fra micelle si riduce, consentendo la formazione di aggregati di silice e tensioattivo di dimensioni maggiori [20] (Figura 1.4.4). In questo modello di *templating* "propriamente detto", la struttura della mesofase dipende unicamente dal tensioattivo scelto [20].

⁷ L'endocitosi è il processo grazie al quale una sostanza penetra all'interno di una cellula senza passare attraverso la sua membrana plasmatica. La membrana circonda la sostanza, includendola in una vescicola; dopodiché, la vescicola si distacca dalla superficie della cellula in modo da spostarsi all'interno della cellula stessa [31].

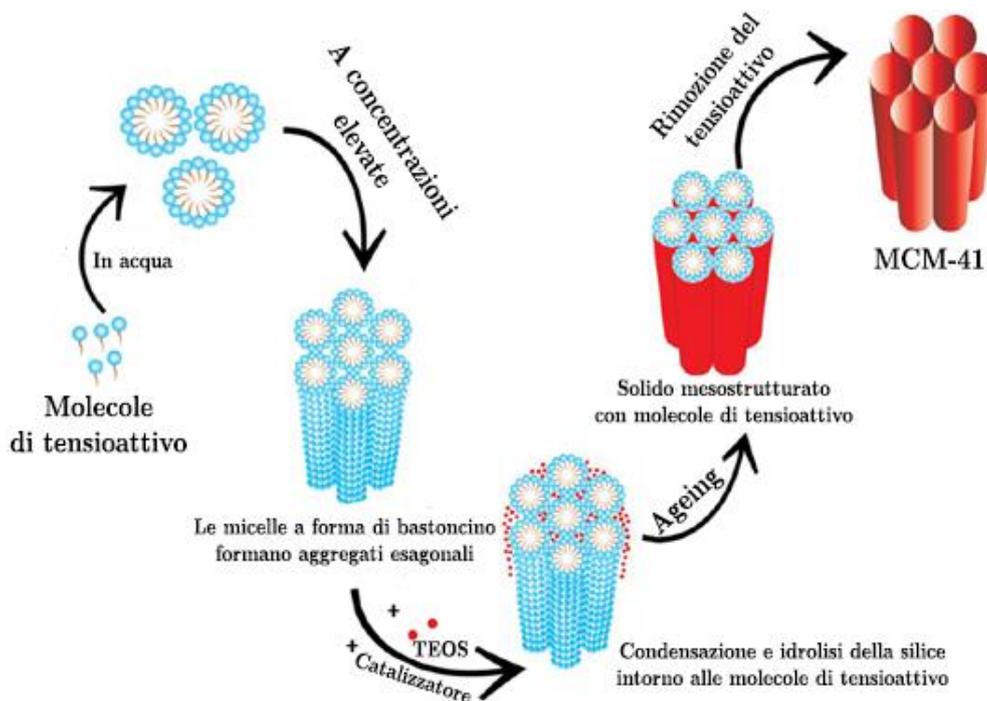


Figura 1.4.4. Meccanismo di formazione delle MCM-41 [20].

Questi “bastoncini” costituiti da tensioattivo formano aggregati di forma esagonale in quanto questa disposizione è quella maggiormente favorevole energeticamente [15]. Sulla superficie esterna delle micelle di tensioattivo possono formarsi fino a 3 monostrati di silice, come confermato da studi di spettroscopia ^{14}N NMR [41].

Altri studi hanno ipotizzato un meccanismo di formazione delle silici mesoporose che prevede una sorta di “direzione” da parte del TEOS stesso, invece di un semplice *templating* delle molecole di tensioattivo [42, 43, 44]. Quest’ultimo modello “dinamico” non richiede la presenza di una struttura organica preesistente, ma consiste piuttosto in una “cooperazione” tra porzione organica e porzione inorganica, con quest’ultima che può influenzare l’organizzazione delle molecole di tensioattivo in mesostrutture. In pratica, una volta inserito nella miscela di reazione, il TEOS idrolizza e condensa formando oligomeri; questi oligomeri possono poi aderire alla superficie esterna delle micelle di tensioattivo, determinando la riduzione della repulsione fra micelle; questa riduzione consente la formazione di aggregati di strutture ibride tensioattivo-silice. Rispetto al modello precedente, in questo caso, si evidenzia il ruolo cardine del precursore inorganico: si parla di *cooperative self-assembly* in quanto anche la scelta del precursore determina la forma finale della mesostruttura, e precursori differenti possono determinare la formazione di mesostrutture differenti [43].

Un altro meccanismo proposto, confermato da studi di *scattering* di raggi X a bassi angoli, è detto meccanismo di “*swelling-shrinking*” (Figura 1.4.5): in breve, il tensioattivo (CTAB⁸ nel caso di studio [45]) forma delle micelle ellissoidali con un *core* costituito dalle code idrofobiche; quando il precursore della silice (TEOS) viene aggiunto, esso è dapprima solubilizzato all’interno del *core* idrofobico, determinando l’allargamento delle micelle, che diventano sferiche; dopodiché, non appena il TEOS idrolizza, i monomeri diventano idrofili ed

⁸ Il bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB) è un sale organico quaternario d’ammonio con funzione di tensioattivo e detergente [242].

escono dal *core* della micella nell'ambiente acquoso. Essendo carichi negativamente, i monomeri di TEOS si adsorbono sulla superficie esterna delle micelle (carica positivamente); una volta che tutto il TEOS è stato consumato, le micelle si restringono nuovamente; il processo continua fino a che tutto il TEOS non ha idrolizzato, le micelle formano aggregati e si ottiene infine un materiale mesostrutturato.

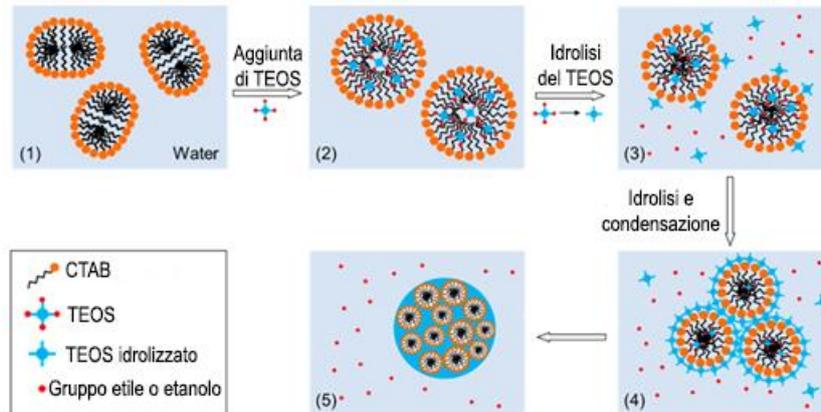


Figura 1.4.5. Meccanismo di *swelling-shrinking* nella formazione di particelle di silice mesoporosa [45].

Questo modello “funziona” soprattutto nel caso in cui il TEOS sia l'unico precursore della silice e non vi siano co-solventi nel sistema. Il suo studio è cruciale in quanto, qualora molecole idrofobiche (come quelle di un farmaco) fossero presenti nella miscela di reazione, queste potrebbero interagire con il TEOS durante la formazione della silice [20].

Il tensioattivo utilizzato con funzione di *templating* può essere rimosso dal materiale ottenuto mediante estrazione con solvente o calcinazione a 500-550°C; nel caso in cui non venga rimosso, come già detto, il materiale si dice mesostrutturato; in assenza di una struttura ordinata, il materiale è più in generale un ibrido [20]. I materiali ibridi, oggetto di questa tesi, rappresentano una interessante alternativa alle silici mesoporose: consentono, infatti, di trarre beneficio dalle proprietà sia della silice, sia del tensioattivo in essa incorporato [46, 47]. Nei paragrafi seguenti si descriveranno le loro caratteristiche, con particolare attenzione per la loro applicazione come *drug delivery system*.

1.5. Materiali ibridi a base di silice per *drug delivery*

Come evidenziato nel Paragrafo 1.3, le particelle di silice sono particolarmente apprezzate per la loro versatilità: tale caratteristica può essere coniugata a benefici tipici dei materiali organici come lipidi e polimeri nei cosiddetti “materiali ibridi”, caratterizzati da una matrice silicea contenente una fase organica. La sintesi di materiali ibridi mediante il processo sol-gel consente di preservare le caratteristiche della sostanza organica grazie alle condizioni blande e alla protezione da parte dello “scheletro” inorganico [48]. La fase organica può, a sua volta, contenere sostanze quali pigmenti, principi attivi, particelle paramagnetiche [3]. La presenza di una matrice inorganica silicea, infine, “regola” l'accesso alla sostanza organica contenuta al suo interno [49].

Fra le applicazioni più comuni di materiali ibridi a base di silice si ricordano l'incorporazione di pigmenti [33], il rilascio di farmaci e il *bioimaging*⁹ [3]. Rispetto ai materiali mesostrutturati, sui quali è ormai presente una nutrita letteratura in ambito biomedico [20], le particelle ibride a base di silice sono un *drug delivery system* le cui possibilità sono tuttora parzialmente inesplorate. La possibilità di incorporare un principio attivo sfruttando l'interazione di quest'ultimo con il *template* organico, tuttavia, è una caratteristica particolarmente vantaggiosa, soprattutto per quei principi attivi idrofobici la cui incorporazione in silici mesoporose calcinate richiederebbe l'utilizzo di tecniche di impregnazione o di funzionalizzazione superficiale [32, 33, 46]. Tali tecniche sono caratterizzate da costo elevato, una certa complessità e, nel caso dell'impregnazione, efficacia fortemente dipendente dalla solubilità del principio attivo nel mezzo scelto. L'impregnazione con solventi organici, peraltro, non è adeguata agli standard imposti dalla farmacopea che richiedono di ridurre al minimo le tracce di tali sostanze [6, 50].

Come osservato da Zheng *et al.* [51], l'utilizzo di un sistema ibrido organico-inorganico potrebbe semplificare considerevolmente il processo di produzione dei *carrier* su larga scala: la sintesi di silici in cui il principio attivo è inserito grazie all'interazione con il *templating agent*, infatti, può essere realizzata in modalità "*one-pot*", senza necessità di trattamenti post-sintesi.

Le caratteristiche fondamentali a cui prestare attenzione nella sintesi di silici ibride come *drug delivery system* sono le seguenti [15, 20, 52]:

- Dimensione e morfologia delle particelle;
- Interazione farmaco-tensioattivo.

Nei paragrafi seguenti si analizzeranno le modalità di ottimizzazione di tali parametri e i vantaggi da esse conseguenti.

1.5.1. Dimensioni e morfologia delle particelle

Le dimensioni delle particelle di silice possono essere finemente regolate a seconda delle condizioni di sintesi; generalmente, l'uso in ambito biomedicale richiede particelle di diametro fra 10 e 300 nm [52]. Le variabili che determinano le dimensioni finali delle particelle di silice sono la velocità di idrolisi, l'intensità di interazione fra *template* e polimero di silice, la condensazione del precursore della silice [24]. Controllando il pH, la temperatura di reazione e la concentrazione del precursore della silice ed utilizzando cosolventi e *template* appropriati è perciò possibile regolare le dimensioni delle particelle [24] [52] [53].

Le strategie più comuni per la realizzazione di particelle di silice con diametro inferiore ai 100 nm, come riportato da Ribeiro *et al.* [54], sono le seguenti:

- Diluizione e rapida neutralizzazione del mezzo di reazione;
- Variazione del rapporto tensioattivo/precursore: a basse concentrazioni, il tensioattivo si comporta da agente flocculante e determina la formazione di aggregati di particelle, che possono precipitare; all'aumentare del rapporto precursore/tensioattivo la velocità di idrolisi del TEOS aumenta, e le particelle ottenute sono più fini [55];

⁹ Si definisce *bioimaging* quell'insieme di tecniche diagnostiche utilizzate in medicina per visualizzare immagini dirette o indirette del corpo umano [269].

- Utilizzo di un sistema di due tensioattivi: ad esempio, utilizzando un tensioattivo cationico come *templating agent* e un tensioattivo non ionico per sopprimere la crescita delle particelle [56];
- Uso della trietanolammina come tensioattivo: la trietanolammina è in grado di legarsi alla superficie delle particelle e di inibirne perciò la successiva crescita [53] [54].

Una delle caratteristiche più apprezzate delle particelle di silice è la possibilità di ottenere insiemi di particelle con dimensioni uniformi, in maniera da controllare più finemente le proprietà di *delivery* del farmaco [20]. Lv *et al.* [53] hanno sintetizzato silici mesostrutturate con ridotta distribuzione dimensionale; in particolare, regolando parametri di sintesi quali temperatura e velocità di agitazione, è stato possibile ottenere particelle con diametro dai 20 ai 110 nm. La sintesi è stata effettuata in condizioni basiche, utilizzando la trietanolammina come *structure directing agent*, ed ha fornito particelle con dimensioni uniformi, ma caratterizzate da scarso ordine a lungo raggio [53].

Ribeiro *et al.* [54] sono stati in grado di sintetizzare particelle di silice mesoporosa con diametro inferiore ai 18 nm, con dimensioni poco variabili. Il metodo utilizzato si basa su due differenti approcci:

- Regolare la concentrazione delle sostanze basiche nel mezzo di sintesi: in questa maniera, è possibile controllare il pH della soluzione e, di conseguenza, la carica superficiale delle micelle. Riducendo la concentrazione delle specie basiche è possibile incrementare la carica superficiale delle micelle e, di conseguenza, la stabilità della sospensione di particelle; si ottengono così particelle più fini, con dimensioni uniformi.
- Regolare la forza ionica del mezzo di reazione, a pH costante.

L'ipotesi confermata dallo studio è che le dimensioni delle particelle di silice siano determinate dal numero di micelle di tensioattivo che costituiscono un aggregato sopramicellare; quest'ultimo fattore è determinato dalla carica superficiale delle micelle e dall'effetto schermante del mezzo di reazione (maggiore per mezzi di reazione con forza ionica maggiore) [54].

La velocità di agitazione utilizzata, infine, influenza sia la dimensione delle particelle [53] che la loro morfologia: come osservato da Mehmood *et al.* [24], agitando lentamente si ottengono fibre e particelle dalla forma allungata, mentre incrementando la velocità di agitazione è possibile ottenere particelle di forma sferica. La morfologia delle particelle, determinante nella biodistribuzione e nell'escrezione delle MSN, è determinata anche dalla struttura delle micelle di tensioattivo, quindi dalla concentrazione relativa delle specie in reazione [20].

1.5.2. Interazione farmaco – *templating agent*

Come osservato da Vallet-Regí *et al.* [57], la capacità di *loading* di principio attivo può essere incrementata aumentando la superficie specifica (nel caso di materiali mesoporosi) oppure migliorando l'affinità del *carrier* per il principio attivo. La peculiarità dei sistemi ibridi come DDS è, come già detto, la possibilità di incorporare farmaci grazie all'interazione fra *templating agent* e principio attivo.

In generale, è possibile distinguere i materiali ibridi in due categorie [58]:

- Materiali nei quali la fase organica è incorporata all'interno della matrice silicea mediante interazioni secondarie (legami idrogeno, interazioni di Van Der Waals, interazioni elettrostatiche);
- Materiali in cui le due fasi sono legate da legami di tipo covalente.

Nel primo caso, l'interazione fra silice e fase organica è debole e aspecifica; il principio attivo contenuto nella silice può essere rilasciato più facilmente, sfruttando ad esempio variazioni di pH come quelle sperimentate da farmaci somministrati per via orale [50][58]. Dal momento che l'interazione è priva di specificità e meno intensa, tuttavia, il principio attivo può anche fuoriuscire in maniera incontrollata.

Nel secondo caso, al contrario, la natura del legame covalente determina una interazione più intensa, che può essere interrotta, ad esempio, solamente da enzimi specifici [58]. Tale proprietà potrebbe essere impiegata per il *delivery* di principi attivi verso specifici siti *target* [58] [59].

1.5.3. Esempi di sistemi ibridi a base di silice in letteratura

L'utilizzo di materiali ibridi come *drug carrier* consente, come visto, di incrementare la capacità di *loading* di principio attivo; l'unione di *carrier* inorganico e *templating agent* organico permette, inoltre, di beneficiare di proprietà dovute alla loro interazione [74]. Di seguito saranno riportati alcuni esempi di come tale vantaggio sia stato impiegato nello sviluppo di *drug delivery systems*.

Tourne-Peteilh *et al.* [50] hanno utilizzato un metodo “*one-pot*” per la sintesi di silici mesostrutturati contenenti ibuprofene: il *templating agent* scelto, il Tween 80, è un tensioattivo non ionico ampiamente impiegato in campo farmaceutico e cosmetico e non tossico; le sintesi vengono effettuate a temperatura ambiente, a pH lievemente acido. L'ibuprofene incorporato nelle silici non è soggetto a degradazione, e viene rilasciato più efficacemente rispetto ai cristalli di ibuprofene secondo un meccanismo di tipo diffusivo. Un evidente svantaggio di questo sistema è che non tutto il farmaco caricato viene rilasciato, poiché parte dell'ibuprofene (circa il 25%) rimane legato fortemente alla silice attraverso il tensioattivo; questo effetto è probabilmente dovuto ad una modificazione strutturale subita dalla silice in seguito al contatto con i fluidi fisiologici simulati [50].

Stewart *et al.* [6] hanno sintetizzato particelle submicrometriche di silice mesostrutturata utilizzando un tensioattivo che possiede esso stesso funzione farmacologica; in particolare, il tensioattivo scelto ha funzione antimicrobica e potrebbe essere inserito come additivo negli impianti dentari. Le particelle sintetizzate presentano buone caratteristiche meccaniche, struttura alveolare e semiordinata, caratterizzata da porosità più tortuose e irregolari rispetto a una MCM-41 “classica”; il contenuto di farmaco è di circa il 34% w/w, di gran lunga superiore rispetto ai valori tipici delle silici mesoporose [6]. L'effetto di porosità tortuose e maggior contenuto di farmaco è che questi materiali consentono un rilascio molto più prolungato e controllato rispetto a una silice mesoporosa funzionalizzata post-sintesi, con profilo privo dell'effetto di rilascio “esplosivo” iniziale [6].

He *et al.* [60] hanno sintetizzato delle particelle di silice mesostrutturata in cui la camptotecina (CPT), un principio attivo idrofobico utilizzato come agente chemioterapico, è incapsulata in micelle di CTAB (Figura 1.5.1).

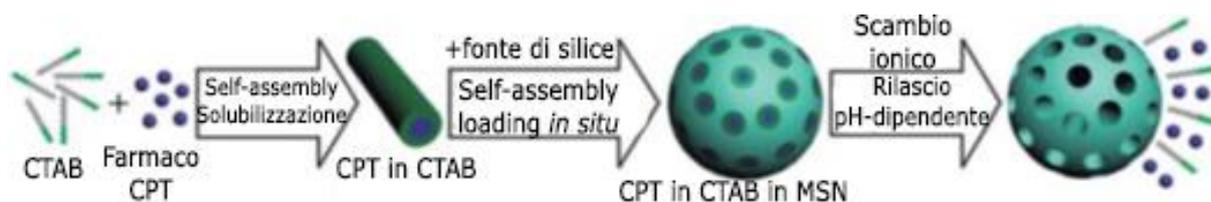


Figura 1.5.1. Schema di produzione di silici contenenti CTAB e camptotecina [60].

Le silici ottenute rilasciano il farmaco in maniera pH-dipendente, mantenendo il principio attivo a pH fisiologico ma rilasciandolo in maniera sostenuta in ambiente acido come quello delle cellule tumorali [60]. Il meccanismo di rilascio proposto è quello dello scambio ionico, dove gli ioni idronio dell'ambiente acido sostituiscono gli ioni CTA^+ che interagiscono con la superficie negativa della silice. Il rilascio di CTA^+ dalle particelle determinerebbe peraltro una maggiore sensibilità delle cellule tumorali alla camptotecina [60].

Sokolik e Lellouche [48] hanno utilizzato particelle di silice submicrometriche per incapsulare un antibatterico naturale, il carvacrolo. Il carvacrolo è un olio essenziale il cui utilizzo come principio bioattivo è limitato dalla scarsa solubilità nei mezzi acquosi e dalla sua elevata volatilità. Per incorporarlo nella silice, il carvacrolo è stato sottoposto a pretrattamento con toluene fino ad ottenere un solido ceroso; questo solido è stato successivamente utilizzato per la produzione di ibridi silice-carvacrolo mediante un processo di Stöber modificato. Le particelle prodotte sono caratterizzate da una struttura priva di ordine a lungo raggio, alla quale il carvacrolo è legato covalentemente. L'incremento della quantità di principio attivo incorporato determina una riduzione delle dimensioni delle particelle e, di conseguenza, un incremento della superficie specifica, il che è desiderabile. Il meccanismo di rilascio del farmaco prevede l'azione di enzimi batterici, in grado di spezzare il legame covalente formatosi e garantisce, quindi, buona specificità nel rilascio del farmaco.

Tingming *et al.* [61] hanno sintetizzato particelle di SBA-15 contenenti il piroxicam (PX), un principio attivo antinfiammatorio. La silice è stata sintetizzata utilizzando il Pluronic P123, un copolimero a blocchi, come *templating agent*; il principio attivo è stato inserito all'interno delle "porosità" dopo la sintesi della silice, grazie ad un processo definito *self-assembly*. In pratica, le particelle di silice mesostrutturata sono state inserite in una soluzione contenente il principio attivo disciolto in acetonitrile e cloruro di metilene. Le particelle ottenute con questo procedimento (SP-PX) contengono il 12% w/w di piroxicam; le particelle di silice calcinata (SC-PX), non contenenti Pluronic P123, sono in grado di incorporare fino al 17% w/w di piroxicam. La presenza del polimero nelle porosità della silice, tuttavia, consente un rilascio più rapido del principio attivo in ambiente basico: il polimero, infatti, è in grado di dividere il volume interno dei pori in compartimenti (Figura 1.5.2), e determinare una dispersione più efficace del principio attivo al loro interno.

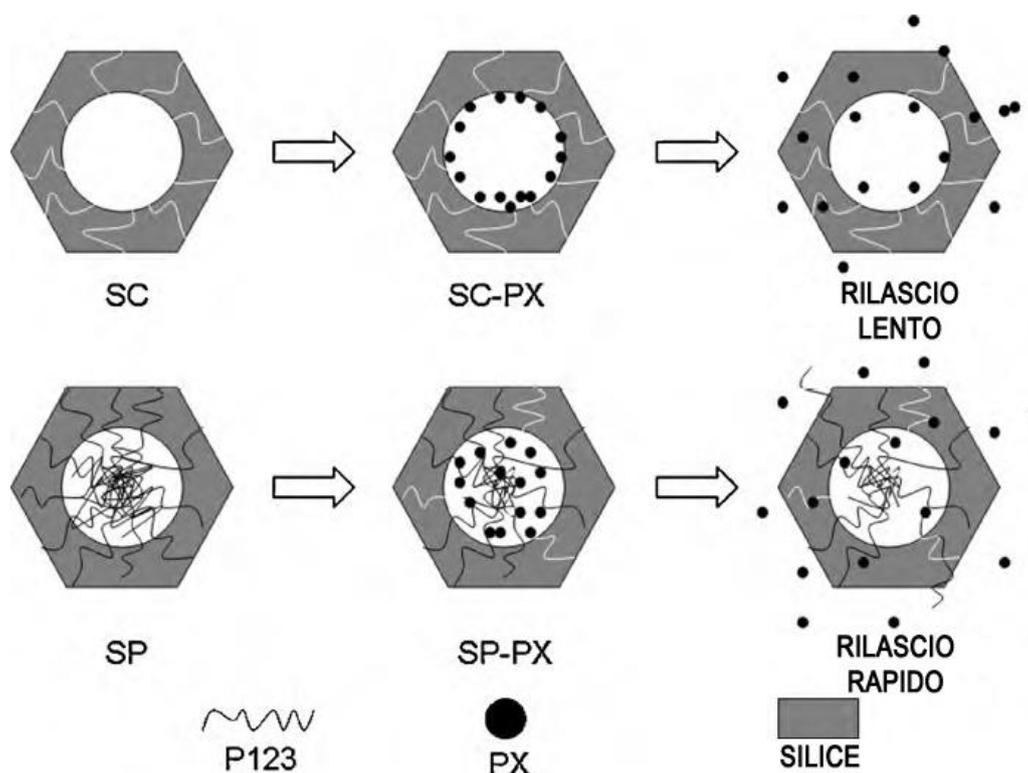


Figura 1.5.2. Disposizione del principio attivo nei pori di SC-PX (sopra) e SP-PX (sotto) [61].

Utilizzando silici con Pluronic P123 è stato possibile ottenere il rilascio del 62% del piroxicam incorporato durante i primi 5 minuti in ambiente basico; un rilascio così rapido è un evidente vantaggio per farmaci antinfiammatori [61].

Chin *et al.* [62] hanno realizzato nanocompositi di silice a porosità non ordinata contenenti curcumina e particelle paramagnetiche. La curcumina e le particelle di ossido ferrico sono stati inseriti direttamente nella miscela di reazione, insieme a CTAB e TEOS; l'inserimento di nanoparticelle paramagnetiche nella struttura silicea ha determinato la perdita di mesostruttura ordinata. Le particelle ottenute, pur essendo prive di una mesostruttura con ordine a lungo raggio, sono in grado di incapsulare fino al 30% w/w di curcumina e di rilasciare il principio attivo in maniera controllata; la presenza di sostanze paramagnetiche, inoltre, facilita la loro distribuzione, che può essere regolata dall'esterno [62].

I materiali ibridi, come descritto in questo capitolo, possono costituire un'interessante alternativa ai *drug delivery system* organici: questi materiali coniugano proprietà tipiche della silice inorganica, come la resistenza meccanica e termica, a proprietà chimiche ed eventuali effetti farmacologici della porzione organica [50]. Nel presente lavoro di tesi si è tentato di sintetizzare delle silici ibride contenenti curcumina a partire da uno scarto di sintesi; per questa ragione, il capitolo seguente tratterà alcuni casi di letteratura in cui scarti di produzione sono stati utilizzati per la sintesi di silici mesostrutturate.

Capitolo 2

Sintesi di silice mesostrutturata a partire da scarti

2.1. Introduzione

Come osservato nel capitolo precedente, i materiali mesostrutturati sono un argomento di notevole interesse nei campi della catalisi, delle biotecnologie, della medicina. L'impatto ambientale della sintesi di questi materiali, tuttavia, costituisce un aspetto fondamentale di cui tenere conto.

In generale, le materie prime per la sintesi di silici mesostrutturati sono di due tipologie [63]:

- Le silici impiegate nell'industria di processo sono realizzate a partire da silicato di sodio ("vetro solubile"), un materiale ottenuto per fusione delle sabbie silicee con carbonato di sodio a 1300°C [63] [64];
- Le silici mesostrutturate utilizzate nella pratica accademica sono sintetizzate a partire dai precursori alcossisilani: questi ultimi, seppur più costosi del silicato di sodio, rappresentano una scelta preferibile quando siano necessari reagenti di elevata purezza; sono sintetizzati mediante reazione di un alcol con silicio elementale o SiCl_4 [63].

In entrambi i casi, la sintesi di silici mesostrutturati è un processo dall'elevato dispendio energetico e consumo di risorse naturali; nell'ottica di una *green economy*, perciò, lo sviluppo di un processo efficiente ed economicamente conveniente risulta cruciale.

Una delle possibili soluzioni proposte è l'utilizzo di scarti di produzione per la sintesi di precursori della silice: il tema è affrontato ampiamente in letteratura e consentirebbe peraltro il recupero di materiali altrimenti destinati a impieghi a basso valore aggiunto, come la termovalorizzazione, o allo smaltimento in discarica. Tra le industrie di maggior interesse in questo ambito troviamo quella della produzione di energia [65] [66], nonché la filiera produttiva dei semiconduttori [67], la gestione dei rifiuti [68], l'industria alimentare [69].

2.2. Principali processi per la purificazione di silice dagli scarti

Il primo passaggio per la produzione di silice a partire da sottoprodotti consiste nella combustione degli scarti per ottenere ceneri: queste ultime sono poi macinate e trattate per produrre la soluzione precursore della silice. Le ceneri contengono silice, allumina ed altre impurezze in quantità più o meno elevata; tra i principali contaminanti della silice si riportano gli idrossidi dei metalli di transizione, alcalini e alcalino-terrosi [63]. La presenza di impurezze è certamente non desiderabile, soprattutto qualora la silice sia da impiegarsi successivamente come catalizzatore o adsorbente per il trattamento di flussi di inquinanti (gli ioni metallici, infatti, potrebbero catalizzare reazioni indesiderate [70] [71]): è dunque assolutamente necessario rimuovere i contaminanti metallici per ottenere un materiale di purezza sufficiente.

La rimozione di impurezze può essere effettuata sfruttando la differente solubilità di silice e contaminanti al variare del pH [63]. La silice, sia in forma amorfa che in forma cristallina, è infatti sostanzialmente insolubile in ambiente acido; si dissolve rapidamente a pH basico

(superiore a 10); la sua dissoluzione comincia a partire da valori di pH superiori a 8.5 [63] [72]. I contaminanti metallici, al contrario della silice, sono molto solubili in ambiente acido e precipitano in condizioni fortemente basiche (Figura 2.2.1) [63].

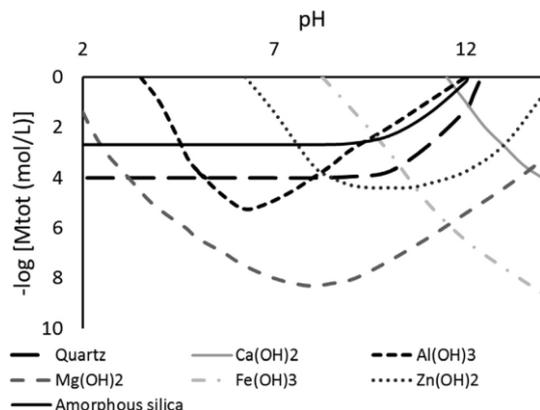


Figura 2.2.1. Solubilità della silice e degli idrossidi metallici al variare del pH [63].

La fusione alcalina e il *leaching*, due tra i processi di purificazione più utilizzati, beneficiano di questa differente solubilità nei solventi acidi e basiche.

2.2.1. Leaching

La lisciviazione o *leaching* è un processo di separazione che prevede l'estrazione dei componenti solubili di un solido mediante percolazione di un liquido attraverso di esso [17]. La lisciviazione della silice può essere effettuata in condizioni acide o basiche, a seconda che si desideri un precipitato di silice o la cattura della silice da parte del solvente [63].

Nel caso della lisciviazione in ambiente acido, i contaminanti metallici vengono dilavati dal materiale; al posto di tali contaminanti, rimangono le porosità del materiale finale [73]. L'uso degli ultrasuoni potrebbe consentire un *leaching* acido più efficiente e rapido [63] [74].

La lisciviazione in ambiente basico, al contrario, consente di ottenere soluzioni contenenti silice, in particolare di silicato di sodio; la sostanza basica più comunemente utilizzata è la soda [63]. A pH 11-12, la maggioranza dei metalli contaminanti è insolubile (fatta eccezione per l'alluminio, che è altamente solubile in ambiente basico) [63].

2.2.2. Fusione alcalina

La fusione alcalina, realizzata con idrossido o carbonato di sodio, è un processo che sfrutta la variazione della temperatura di fusione del sistema silice – allumina in ambiente basico [63] [75]. In un sistema binario silice – allumina, la temperatura di fusione minima è di circa 1860 K (eutettico mullite – cristobalite¹⁰) [63]. L'aggiunta di soda consente di abbassare tale temperatura a 1100 K circa [63] [76]. Questa proprietà del sistema binario silice-allumina è ben nota e sfruttata per la produzione di vetro solubile e vetro sodio-silicato a partire dalla sabbia silicea; è inoltre la ragione per cui le ceneri ottenute da biomasse, rispetto ad altre ceneri ricche di silice, presentano una temperatura di fusione più bassa [63].

In breve, la fusione alcalina consiste nel riscaldare le ceneri in presenza di un reagente alcalino in maniera tale da rendere la silice disponibile per i trattamenti di estrazione e purificazione

¹⁰ Nelle leghe metalliche, raffreddando da temperature superiori al punto di fusione, la fase liquida si trasforma in due fasi solide distinte; il punto detto eutettico è la temperatura a cui si verifica questo fenomeno [303].

successivi [75] [77]; questo processo consente di concentrare la silice in soluzione, ottenendo così materiali mesoporosi con maggiore facilità [75].

Nei paragrafi successivi saranno analizzati alcuni casi di letteratura in cui le tecniche appena descritte sono state utilizzate con successo.

2.3. Silici da rifiuti industriali

2.3.1. Silice da scarti della produzione energetica

Un processo di produzione di energia a partire da combustibili fossili produce due tipologie di ceneri, le *bottom ashes* o ceneri pesanti e le *fly ashes* o ceneri volanti [78]. Mentre le prime, costituite da particelle grossolane, sono raccolte in una apposita tramoggia sul fondo della fornace, le ceneri volanti sono trascinate dai gas di combustione in uscita dall'impianto, dove vengono catturate da appositi precipitatori elettrostatici¹¹ [63] [79].

Il problema principale delle ceneri è che il loro smaltimento richiede grandi superfici e quantità d'acqua elevate [63] [80]: di fatto, una modalità tuttora comune per smaltire le ceneri consiste nel lavaggio con acqua fino ad ottenere un fango, pompato poi in appositi stagni nelle vicinanze dell'impianto; dallo stagno si drena l'acqua per inviarla al mare o ad un fiume [81]. Si stima che una tonnellata di ceneri volanti, compressa fino a una densità di circa 1000 kg/m³, occupi quasi 0.8 m³ di spazio in discarica [82]. Se non trattate correttamente, peraltro, le particelle sottili possono essere trascinate dal vento e contribuire all'inquinamento atmosferico [63].

Ogni anno la combustione del carbone produce quasi 500 milioni di tonnellate di ceneri volanti, delle quali è riciclato solo il 15-20% [82] [83]. Il riciclo di questo scarto è effettuato soprattutto in modalità a basso valore aggiunto, quali l'incorporazione nei materiali da costruzione [84] o la copertura di discariche per materiali pericolosi [82].

Le ceneri contengono grandi quantità di silice e allumina (nella forma di quarzo e mullite), e ciò le rende particolarmente interessanti per lo sviluppo di materiali mesoporosi e microporosi [84] [85]: nella Tabella 2.3.1 è mostrata la composizione media delle ceneri volanti, variabile a seconda della fonte di carbone utilizzata [3, 84].

Tabella 2.3.1. Composizione chimica media di *fly ashes* dalla combustione del carbone, ottenuta da analisi XRF (adattata da [3]).

Composizione chimica media (% w/w)									
SiO₂	Al₂O₃	Fe₂O₃	TiO₂	CaO	MgO	K₂O	Na₂O	SO₃	Altro
49.26	27.41	7.19	1.23	6.11	0.95	0.88	0.47	1.51	0.63

Le ceneri volanti, perciò, grazie al loro contenuto elevato di silice e allumina, possiedono potenzialmente alto valore aggiunto, a seconda della presenza o meno di impurezze, e possono essere trattate per un successivo impiego nella *bioremediation* o come catalizzatori [3].

Un primo tentativo in questo senso è quello di Chang *et al.* [75]. In seguito a tentativi precedenti di sintesi di zeoliti a partire dagli scarti [86] [87], il gruppo di ricerca ha sviluppato un processo per la sintesi della MCM-41 basato sulla fusione alcalina di *fly ashes* con NaOH e l'uso di CTAB come *templating agent*, con successivo trattamento idrotermale. Questo processo prevede l'uso di temperature di molto superiori a quella ambiente (550°C durante la fusione alcalina) ma fornisce una silice con un certo ordine a lungo raggio. Il processo di fusione

¹¹ Un precipitatore elettrostatico è un'apparecchiatura utilizzata per controllare le emissioni: in breve, separa le ceneri e le particelle più leggere dal gas di scarico caricandole con un campo elettrico; le particelle sono poi attratte da piastre di carica opposta e raccolte [298].

alcalina si basa, come già detto, sull'estrazione della silice dal quarzo grazie all'azione contemporanea di una sostanza basica e delle temperature elevate.

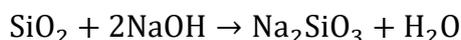
In un tipico trattamento, le polveri di scarto preventivamente asciugate e tritate fino a raggiungere le dimensioni prescelte sono miscelate con idrossido di sodio in polvere (rapporto *fly ashes*:NaOH di circa 1:1.2); la miscela è portata a 550°C per un'ora e miscelata con acqua per ottenere una sospensione. Dopo un giorno di *aging*, la miscela è centrifugata e il surnatante è utilizzato come fonte di silice [75] [80].

L'uso della fusione alcalina per la sintesi di silice a partire da ceneri è piuttosto comune in letteratura [68] [88] [89]. Numerosi studi hanno evidenziato come il passaggio di fusione delle ceneri con una sostanza basica sia fondamentale per la riuscita del processo; il semplice trattamento idrotermale delle polveri non porta alla formazione di silice [65] [75] [80]. Risulta fondamentale il ruolo del pH durante le reazioni di sintesi: controllando il pH in maniera opportuna è possibile ottenere un materiale amorfo anziché una zeolite [80]. Il metodo della fusione alcalina, inoltre, è adatto sia al trattamento delle *fly ashes* che delle *bottom ashes*, se queste ultime sono opportunamente pretrattate [80] [89] (Figura 2.3.1).



Figura 2.3.1. Pretrattamento di *bottom ashes* per la sintesi di silici mesoporose (adattato da [89]).

Una problematica relativa al processo di Chang *et al.* è certamente l'elevata temperatura necessaria. In uno studio successivo è stato possibile adottare un approccio a minor dispendio energetico per la sintesi di silici MCM-41 a partire da ceneri volanti [82]. In particolare, lo stadio di fusione alcalina è stato sostituito con una fase di estrazione della silice amorfa con una soluzione 2M di NaOH a 100°C per circa 4.5 h. Si suppone che la conversione in silicato di sodio durante la fase di estrazione avvenga secondo la seguente reazione complessiva [90]:



La soluzione ottenuta è stata poi miscelata con CTAB ed etilacetato a 85°C per ottenere una sorgente di MCM-41, e la sintesi di MCM-41 è stata condotta in condizioni acide (aggiungendo acido solforico) a temperatura ambiente. La temperatura di 550°C, perciò, è stata necessaria solamente per la calcinazione del materiale finale [82]. Anche in questo caso è stato evidenziato il ruolo centrale del pH iniziale di sintesi, che influenza non solo il parametro di cella a_0 e l'ordine a lungo raggio dei mesopori, ma anche l'eventuale incorporazione di impurità nel materiale e la stabilità termica [82].

La fusione alcalina è stata utilizzata anche per il riciclo di ceneri provenienti da impianti di termovalorizzazione, pur utilizzando reagenti e parametri differenti [68].

2.3.2. Silice da scarti agricoli

Numerosi tentativi sono stati effettuati per la sintesi di silice a partire da biomasse di scarto. Il grande interesse nei confronti di questi rifiuti è dovuto all'elevata quantità di scarti prodotta dall'industria alimentare; si stima, ad esempio, che nel 2018 siano stati prodotti quasi 200 milioni di tonnellate di lolla di riso¹² in tutto il mondo [91]. La lolla di riso è costituita principalmente da cellulosa, emicellulosa, lignina e sostanze inorganiche; contiene circa il 15-

¹² La lolla di riso è ciò che copre i semi o grani di riso; è costituita da materiali ad elevata durezza, come la silice cristallina e la lignina, per proteggere i semi durante la loro crescita [63].

20% di silice ed è generalmente utilizzata per la produzione di energia da combustione di biomasse [91]. La lolla di riso perde circa il 75% del proprio peso quando bruciata e le sue ceneri hanno un contenuto di silice che può arrivare fino al 98% [92], perciò possono essere utilizzate per sintetizzare precursori della silice. In genere, i processi di sintesi di silice a partire da lolla di riso prevedono la produzione di una soluzione di silicato di sodio, dalla quale la silice viene fatta precipitare riducendone il pH (come visto nel Paragrafo 2.2, infatti, la silice precipita a $\text{pH} < 10$) [91]. Di seguito saranno presentati alcuni *case study*.

Il primo esempio presente in letteratura è il lavoro di Jang *et al.* [93]: a partire dalle ceneri di lolla di riso è stato possibile sintetizzare una silice del tipo MCM-48. Jang *et al.* hanno ottenuto silicato di sodio miscelando ceneri e idrossido di sodio a 77°C ; una miscela di tensioattivi cationici e neutri è stata utilizzata con funzione di *templating*; il pH della soluzione ottenuta è stato ridotto a 10 utilizzando acido cloridrico, fino a produrre un gel. Il campione ottenuto presenta una struttura tridimensionale cubica a pori interconnessi, con elevati superficie specifica ($1024 \text{ m}^2/\text{g}$) e volume poroso ($2.58 \text{ cm}^3/\text{g}$) [93]. In questo studio è stata prodotta anche silice con superficie funzionalizzata (gruppi amminici) con buona superficie specifica e interessanti caratteristiche cinetiche di adsorbimento della CO_2 . In particolare, la funzionalizzazione superficiale con gruppi amminici ha consentito un incremento di quasi un ordine di grandezza della capacità di adsorbimento della CO_2 rispetto alla silice non funzionalizzata, probabilmente poiché i gruppi amminici hanno elevata specificità per la CO_2 [93].

In seguito, anche la MCM-41 è stata sintetizzata da lolla di riso [69]: il procedimento per convertirne le ceneri in precursore della silice è simile a quello impiegato da Jang *et al.*; per produrre silici MCM-41, tuttavia, è sufficiente un tensioattivo cationico invece di una miscela di tensioattivi. Dal momento che le ceneri di lolla di riso possono esistere sia in forma cristallina (cristobalite) sia in forma amorfa, per convertire lo scarto in ceneri amorfe (più facilmente estraibili in soluzione basica) è necessario controllare attentamente la temperatura del pretrattamento termico; in particolare, nello studio di Bhagiyalakshmi *et al.* la temperatura è stata mantenuta al di sotto degli 800°C [69]. In seguito, lo studio di Zhu *et al.* [94] ha confermato la fattibilità del processo, osservando come prolungare il trattamento idrotermale consenta di ottenere silici con maggiore ordine a lungo raggio. In particolare, a causa dell'elevato tempo di induzione nella cristallizzazione delle MCM-41, un tempo di trattamento superiore alle 72 ore consente di ottenere silici con picchi più risolti nello spettro XRD e perciò una struttura esagonale 2D più ordinata; il maggior tempo di cristallizzazione, peraltro, consente di ottenere una silice con maggior superficie specifica [94].

Anche Purnawira *et al.* [66] hanno ottenuto silice mesoporosa utilizzando la lolla di riso come precursore alternativo al TEOS. Lo scarto è stato sottoposto a *leaching* preventivo con acido cloridrico e poi mantenuto a 600°C per 6 h per ottenere la cenere: come già riportato da Kalapathy *et al.* [95], infatti, il pretrattamento di *leaching* acido sullo scarto consente di rimuovere le impurezze e di estrarre con più facilità la silice dalle ceneri. Il trattamento con idrossido di sodio e la successiva neutralizzazione del preparato con acido cloridrico hanno consentito la precipitazione del gel di silice; il gel è stato in seguito utilizzato come precursore per la sintesi di silice mesoporosa a pH basico [66]. La silice ottenuta è una MCM-41, con struttura esagonale 2D confrontabile con quella di silici ottenute da TEOS; anche la superficie specifica è confrontabile con quella di silici sintetizzate a partire da precursori puri [66].

Il recupero di silice da lolla di riso consente di ottenere prodotti di valore a partire da uno scarto; presenta tuttavia delle problematiche da risolvere. Gli acidi forti utilizzati nei pretrattamenti e per neutralizzare la soluzione di silicato di sodio possono essere dannosi per la salute e produrre

sottoprodotti tossici per l'ambiente, come i furani¹³ [91]. Alcune alternative proposte sono state l'acido citrico e l'acido ossalico, che consentono di rimuovere le impurezze metalliche ma forniscono silici con rese e contenuto di impurezze variabili [95] [96], e i liquidi ionici, in grado di estrarre ioni metallici e polisaccaridi [45]. Un vantaggio ulteriore nell'utilizzo di liquidi ionici sarebbe la possibilità di estrarre lignocellulosa, utilizzabile a sua volta per la produzione di *biofuel* [91].

Il metodo di precipitazione della silice non consente di regolare le caratteristiche del materiale finale: sono perciò allo studio delle procedure di tipo *bottom-up* da silicato di sodio che prevedano l'uso di cosolventi organici o additivi polimerici o la sintesi in emulsione per controllare più finemente le caratteristiche della silice prodotta [91].

La lolla di riso rappresenta al momento lo scarto alimentare di maggior interesse per la produzione di silice, essendo quello che fornisce la massima resa, ed è stata per questa ragione trattata estesamente [97]. Comunque, sono allo studio anche altri sottoprodotti, quali le foglie di canna da zucchero, la paglia e i residui della produzione dell'olio di palma [63] [97] [98].

Ma *et al.* [98], ad esempio, hanno sintetizzato silici MCM-41 a partire dalle ceneri di paglia di grano. Il procedimento di sintesi si basa sul recupero dei fitoliti¹⁴ Si(OH)_4 , una specie polimerica che rappresenta la principale fonte di silice presente in questa tipologia di scarto [98]. In breve, i fitoliti sono estratti utilizzando una soluzione di acido nitrico in ebollizione; il prodotto ottenuto è essiccato e miscelato con idrossido di sodio per ottenere il silicato di sodio precursore della silice. Nelle condizioni di sintesi ottimali (trattamento idrotermale a 120°C per 24 h), le silici MCM-41 sintetizzate presentano elevata superficie specifica (>1300 cm²/g) e volume poroso >1 cm³/g.

Importante è, infine, la sintesi di silici a partire dall'acido esafluorosilicico (H_2SiF_6), presente negli scarti dell'industria dei fertilizzanti [99] [100]. L'acido esafluorosilicico è un sottoprodotto dall'alto potere inquinante, e se disciolto in acqua è in grado di danneggiare la salute umana e l'ambiente già a concentrazioni molto basse [49]: il suo recupero è dunque auspicabile.

Sarawade *et al.* [100] hanno per primi sviluppato un processo efficiente per il recupero dell'acido esafluorosilicico. In breve, l'acido esafluorosilicico è stato miscelato con una soluzione di carbonato di sodio ed acqua per ottenere uno *slurry*, mantenuto a 100°C per circa 3 ore; il raffreddamento a temperatura ambiente e il successivo *aging* a 80°C per 8 ore hanno fornito silice amorfa. Il procedimento è stato ripetuto con vari rapporti acido:carbonato per studiare l'effetto del pH sulla superficie specifica del materiale finale [100]. Il prodotto ottenuto è una silice mesoporosa (la dimensione media dei pori è di circa 4 nm [100]), con elevata resistenza termica ma caratterizzata da particelle di forma irregolare, che formano aggregati, e superficie specifica che si riduce all'aumentare del pH [100]. È stato possibile ottenere anche acido fluoridrico, utile nella produzione di refrigeranti e nell'industria farmaceutica [100] [101].

Liu *et al.* [102] hanno utilizzato l'acido esafluorosilicico per realizzare una silice MCM-41 caricata con titanio, utilizzata come catalizzatore. Il materiale realizzato nelle condizioni ottimali di sintesi possiede una superficie specifica di oltre 1030 m²/g, ordine a lungo raggio e

¹³ I furani sono composti aromatici alogenati in grado di inibire la crescita e lo sviluppo delle cellule [276].

¹⁴ I fitoliti sono delle strutture intercellulari solide costituite da silice amorfa ed acqua; rappresentano la principale modalità di accumulo del silicio nelle piante [292].

disposizione esagonale dei pori; è inoltre in grado di catalizzare la reazione di sintesi degli epossidi [102].

Uno dei vantaggi dell'acido esafluorosilicico nella sintesi di silici mesoporose è la possibilità di utilizzarlo senza pretrattamenti, come riportato da Vacca *et al.* [103]. Nel loro studio, Vacca *et al.* confrontano le proprietà di una silice MCM-41 ottenuta da acido esafluorosilicico (FSA-MCM-41) con una ottenuta da TEOS; il procedimento ed i parametri sperimentali utilizzati sono stati i medesimi e i prodotti ottenuti hanno proprietà morfologiche e termiche simili [103]. Gli stessi autori propongono inoltre l'estrazione del tensioattivo dai pori mediante una procedura già riportata in letteratura [74], basata sull'uso di etanolo o acqua: è stato possibile rimuovere completamente il *templating agent* con un'ora di estrazione in etanolo senza, peraltro, danneggiare l'ordine della mesostruttura [103]. L'estrazione in etanolo permette il potenziale recupero del CTAB utilizzato per la sintesi e rappresenta, quindi, una possibilità piuttosto interessante in quanto consentirebbe la riduzione ulteriore dei costi di processo; i campioni estratti in etanolo presentano tuttavia una stabilità termica inferiore rispetto alle silici FSA-MCM-41 calcinate [103]. Lo studio ha infine dimostrato la possibilità di utilizzare composti di FSA-MCM-41 e Fe_2O_3 per la cattura di piccole molecole, quali l'acido solfidrico [103].

2.3.3. Silice da *e-waste*

La crescita del settore dell'informatica e della tecnologia ha determinato negli ultimi anni una richiesta sempre maggiore di apparecchiature elettriche ed elettroniche, con conseguente formazione di grandissime quantità di *e-waste* (si stima che nel 2021 si arriverà a 52.2 milioni di tonnellate di questa tipologia di rifiuti [104]). Ad oggi, i rifiuti elettrici ed elettronici sono perlopiù destinati al riutilizzo, al riciclo, al ricondizionamento ma anche alla termovalorizzazione e allo smaltimento in discarica [105] [106]. Queste apparecchiature, tuttavia, contengono grandi quantità di silicio e possono quindi essere utilizzati come precursori della silice [104].

Lin *et al.* [107] hanno per primi riportato una sintesi di silice mesoporosa a partire dagli scarti dell'industria elettronica, in particolare di un impianto di produzione di schermi LCD. Al contrario di altri rifiuti, le polveri di scarto dell'industria elettronica non contengono molti ossidi metallici contaminanti, ma solamente specie derivate dal silicio, dall'azoto e dal fluoro; è quindi più semplice utilizzarli per ottenere silici mesoporose, grazie alla presenza di silicio di purezza elevata [107] [108]. Gli scarti, ridotti in polvere, sono sottoposti a fusione alcalina, in maniera del tutto simile a quanto già riportato da Chang *et al.* [75] (Paragrafo 2.3.1); la sospensione viene centrifugata, il surnatante è utilizzato per la sintesi di silice MCM-41 insieme al CTAB come *templating agent*. Il processo ha consentito di ottenere un recupero del 20-33% di silice. Lo studio ha dimostrato la possibilità di ottenere dai rifiuti dell'industria dei semiconduttori non solo MCM-41 confrontabili con quelle ottenute da reagenti puri (superficie specifica, capacità di cattura della CO_2 simili), ma anche NaF: NaF è un composto utilizzato nell'industria metallurgica, ad esempio per pretrattare l'acciaio inossidabile o per la saldatura, ed è una comune fonte di ioni fluoruro [101] [107].

Ancora Lin e Bai [67] hanno in seguito sviluppato un metodo efficiente per la sintesi a temperatura ambiente di silice mesoporosa a partire dalla medesima tipologia di scarto. La polvere è inizialmente disciolta in acqua deionizzata, dopodiché si aggiungono acido fluoridrico e una soluzione acquosa di CTAB; l'idrossido d'ammonio, aggiunto lentamente alla fine, ha il ruolo di catalizzatore. L'intero processo, detto di utilizzo diretto, si svolge a temperatura ambiente (Figura 2.3.2) [67].

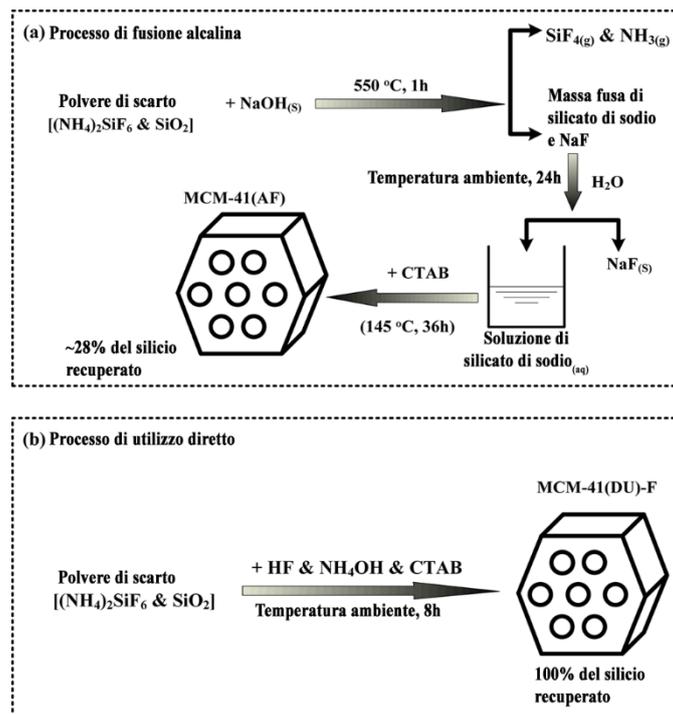


Figura 2.3.2. Processi di fusione alcalina (a) e uso diretto (b) per la produzione di silici mesoporose a partire da scarti dell'industria fotonica [67].

Rispetto alla fusione alcalina utilizzata nello studio precedente, questo processo rappresenta una via di sintesi più efficace: non determina la formazione di gas inquinanti (la fusione alcalina di polveri dell'industria fotonica produce fluoruro di silicio ed ammoniaca [67] [107]) e consente di recuperare il 100% del silicio contenuto nello scarto iniziale [67]. La silice ottenuta con l'utilizzo diretto delle polveri ha mostrato caratteristiche di biodegradabilità e purezza che la rendono adatta all'utilizzo come *drug delivery system*; è inoltre in grado di incapsulare principi attivi chemioterapici [67].

Ma e Ruan [108] hanno utilizzato invece dei pannelli solari dismessi per la sintesi di silici mesoporose MCM-41. In breve, lo scarto è stato ridotto in polvere e miscelato con una soluzione acquosa di idrossido di sodio; il preparato è stato mantenuto a 150°C per circa 24 h e centrifugato; il surnatante è stato utilizzato per la sintesi di MCM-41 con CTAB e idrossido d'ammonio [108]. Il materiale risultante, caratterizzato da purezza elevata, superficie specifica >1000 cm²/g e volume poroso di circa 0.9 cm³/g, è stato utilizzato per l'adsorbimento selettivo di toluene, con capacità di adsorbimento simile a quella di una MCM-41 sintetizzata da precursori puri [108].

Liou [90] ha sviluppato un processo per la sintesi di MCM-41 a partire dagli scarti del packaging di materiale elettronico. Questi scarti, costituiti perlopiù da resine epossidiche, resine fenoliche e silice, rappresentano un rifiuto di difficile smaltimento e possono essere convertiti in precursori della silice grazie all'elevato contenuto di silicio (circa l'80% in peso) [90]. Dopo essere stati ridotti in cenere, gli scarti sono sottoposti a *leaching* acido per rimuovere le impurezze metalliche (principalmente antimonio, ferro, alluminio e cromo); le ceneri sono neutralizzate con acqua. In seguito, l'estrazione a 100°C con idrossido di sodio consente di ottenere una soluzione acquosa di silicato di sodio.

La sintesi del gel di silice avviene in condizioni acide ed è seguita da filtrazione per rimuovere eventuali tracce di metalli rimanenti. Esaminando le varie condizioni di sintesi, è stato possibile osservare come una temperatura più elevata fornisca rese maggiori, ma porosità di dimensioni

inferiori. Al contempo, si è osservato come la presenza del tensioattivo come *templating agent* sia fondamentale per ottenere silici con struttura ordinata dei mesopori, grazie alle interazioni elettrostatiche che si instaurano fra le micelle e la superficie del solido [90]. Il metodo appena descritto ha fornito silici mesoporosi con superficie specifica fino a oltre 1000 cm²/g [90].

Capitolo 3

Il principio attivo: stabilità e degradazione

3.1. Introduzione

Nell'ambito della produzione su larga scala, la stabilità del principio attivo è materia di cruciale importanza: la degradazione di un farmaco, infatti, può determinare una perdita di efficacia o la formazione di sottoprodotti nocivi per la salute o in grado di modificare in maniera inaccettabile le proprietà sensoriali del prodotto finale [109] [110].

In base alle linee guida ICH¹⁵ di buona pratica manifatturiera, la stabilità di un farmaco deve essere valutata mediante le cosiddette “prove di stabilità”, effettuate sia sul principio attivo puro che sulla formulazione nella sua interezza [110]. Tali test dovranno essere effettuati sia in condizioni “di stress”, al fine di accelerare i processi di degradazione e identificare perciò le possibili vie di degradazione possibili, sia nelle condizioni di conservazione di riferimento, per verificare la stabilità del farmaco sul lungo termine. La corretta identificazione delle vie di degradazione del principio attivo, peraltro, consente di sviluppare un adeguato processo di produzione [110].

Nei paragrafi seguenti si presenteranno gli aspetti critici di cui tener conto nella produzione e manipolazione di farmaci, alcuni dei quali sono stati riscontrati nello svolgimento del presente lavoro di tesi; si evidenzieranno, inoltre, alcune possibili soluzioni proposte in letteratura alle problematiche di stabilità.

3.2. Effetto della luce

L'esposizione di un farmaco alla luce può avere effetti avversi sulla stabilità del principio attivo e sulla sua efficacia finale. Molti farmaci si decompongono se esposti alla luce: la fotodecomposizione è un fenomeno molto complesso e le cinetiche di decomposizione variano a seconda del particolare principio attivo considerato [111]. Una delle informazioni cruciali nello sviluppo di una formulazione e di una confezione adeguati alla protezione di un principio attivo fotosensibile è la lunghezza d'onda alla quale il principio attivo è sensibile [112] [113]: qualora il principio attivo sia sensibile a radiazioni UV o visibili, infatti, è necessario impiegare particolari eccipienti o confezioni opache. È inoltre indispensabile tener conto sia della fase di produzione, sia della fase di conservazione e utilizzo del farmaco. L'esposizione alla luce solare nell'ambiente ospedaliero, ad esempio, può determinare degradazione; una volta iniettato, un principio attivo fotosensibile può interagire con substrati presenti nei tessuti e determinare la formazione di specie reattive dell'ossigeno¹⁶ [111].

¹⁵ La ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) è un progetto che riunisce le autorità preposte alla regolamentazione dei farmaci in Europa, Giappone e USA ed esperti dell'industria farmaceutica per discutere aspetti tecnici e scientifici ed emanare linee guida e requisiti tecnici armonizzati.

¹⁶Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono specie derivate dall'ossigeno altamente reattive, come il radicale idrossido, il perossido di idrogeno, i perossinitriti; possono danneggiare i tessuti in quanto cause di stress ossidativo [296].

Lo studio della fotodecomposizione di un farmaco è una fase fondamentale del processo di ricerca e sviluppo, e soluzioni differenti vengono proposte a seconda del caso particolare in esame; è possibile tuttavia fare delle considerazioni generali.

La fotodecomposizione ha inizio quando il farmaco esposto alla luce assorbe radiazione luminosa; l'entità della degradazione dipende dalla quantità e dalla lunghezza d'onda dei fotoni assorbiti [113]. L'assorbimento di tali fotoni può essere diretto, nel caso in cui il principio attivo stesso assorba a una determinata lunghezza d'onda, o indiretto, quando uno degli eccipienti, detto fotosensibilizzante, assorbe a tale lunghezza d'onda e va incontro a degradazione (sono, ad esempio, fotosensibilizzanti alcuni eccipienti lipidici [114]). L'assorbimento di fotoni è il primo stadio del processo fotochimico; può determinare la transizione di una molecola ad uno stato eccitato o la formazione di intermedi reattivi, che si convertiranno in prodotti di degradazione stabili nelle reazioni successive (ad esempio reazioni di ossidazione, di rimozione di gruppi funzionali particolarmente sensibili alla luce, di riduzione, che possono avvenire anche al buio) [111].

Per proteggere il principio attivo dalla fotodegradazione è possibile agire secondo differenti approcci: si può tentare di proteggere la formulazione dalla luce, utilizzando pigmenti o materiali opachi per il confezionamento [115], oppure modificare la formulazione, aggiungendo pigmenti in grado di assorbire la luce alla lunghezza d'onda necessaria [116] o sostanze in grado di spegnere i radicali formati in seguito all'esposizione alla luce [117]. Una possibile soluzione al rischio di fotodegradazione di un principio attivo è infine l'incorporazione di quest'ultimo in un *carrier* non fotosensibile (sono di particolare interesse, in questo ambito, le ciclodestrine [118] [119] ed i liposomi [120]).

La curcumina, come si osserverà nel Capitolo 4, è sensibile alla degradazione fotossidativa; l'utilizzo di una silice mesostrutturata come *drug delivery system* di curcumina potrebbe rappresentare una soluzione a questa problematica.

3.3. Presenza di umidità in dosaggi solidi e semisolidi

Nella maggioranza dei processi di degradazione chimica di un principio attivo, l'acqua è uno dei reagenti o partecipa come catalizzatore: è per questa ragione che molti dei farmaci sono commercializzati in forma solida essiccata [121].

La conservazione del prodotto in ambienti ad elevata umidità relativa ed alcune operazioni che prevedano l'uso di acqua, come le operazioni di *coating* con film acquosi¹⁷, possono tuttavia esporre il farmaco ad umidità e determinare un certo contenuto di umidità residua [122]. Tale contenuto d'acqua potrà trovarsi adsorbito sulla superficie del farmaco, grazie alla formazione di legami a idrogeno, oppure all'interno della struttura cristallina a formare un idrato, o ancora in forma occlusa, all'interno di quei solidi che presentano microporosità, per effetto della condensazione capillare¹⁸ [122].

L'effetto dell'umidità sui farmaci in forma solida o semisolida è duplice: da un lato, può reagire direttamente con il principio attivo e determinarne la degradazione mediante reazioni di idrolisi e idratazione [123]; l'acqua, d'altra parte, può agire anche in maniera indiretta, causando la dissoluzione e la degradazione delle componenti solubili, o ancora, contribuendo alla plasticizzazione dei solidi amorfi e perciò ad un sensibile abbassamento della T_g ¹⁹ [122] [124] [123]. L'acqua presente in un cristallo idrato può poi essere liberata durante la fase di macinatura, portando alla disidratazione del farmaco e, di conseguenza, a una sua variazione strutturale [124].

Il principio attivo può essere protetto dall'effetto di eventuale umidità residua grazie ad un'attenta progettazione del processo produttivo; può, d'altra parte, essere formulato insieme a specifici eccipienti igroscopici, in grado di assorbire l'acqua residua. Shen *et al.* [125] hanno studiato l'effetto di vari eccipienti igroscopici su compresse di simvastatina²⁰ esposte ad ambienti ad elevata umidità relativa. Lo studio ha mostrato la possibilità di ridurre la degradazione del principio attivo, sensibile all'idrolisi, grazie all'assorbimento preferenziale di acqua da parte degli eccipienti; fra gli eccipienti esaminati, il sorbitolo ha mostrato la massima capacità di ritenzione dell'umidità residua [125].

Nei paragrafi seguenti saranno presentati i principali effetti dell'umidità residua sui principi attivi: idrolisi e plasticizzazione del farmaco.

3.3.1. Reazioni di idrolisi

L'idrolisi costituisce la via più frequente di degradazione chimica dei principi attivi [126] [127] [128] [129]: è, ad esempio, la principale via di degradazione dell'aspirina [113]. Essa consiste

¹⁷ Il *coating* è una tecnica in cui si applica un film secco ad un dosaggio (granuli o compresse) per ottenere specifici vantaggi (ad esempio, mascherare il sapore del farmaco o proteggere la formulazione dall'ambiente esterno) [289].

¹⁸ La condensazione capillare consiste nella condensazione di un liquido confinato all'interno di un poro di dimensioni ridotte; tale condensazione avviene a pressione inferiore rispetto alla pressione di saturazione del liquido puro [275].

¹⁹ La temperatura di transizione vetrosa di un solido amorfo (T_g) è il range di temperatura in corrispondenza del quale avviene la conversione da un solido vetroso rigido (al di sotto della T_g) e un solido gommoso plastico (al di sopra della T_g) [124].

²⁰ Le statine sono una classe di farmaci utilizzati per la cura dell'ipercolesterolemia [270].

nella maggioranza dei casi nella reazione di una molecola d'acqua (ad esempio, l'umidità nell'ambiente di processo, oppure negli eccipienti [124]) con un gruppo funzionale che porta un atomo di carbonio elettrofilo; sono soggetti a idrolisi, ad esempio, gli esteri carbossilati, le ammidi e i gruppi carbammati [127]. La presenza di un atomo di carbonio elettrofilo, tuttavia, non è essenziale perché avvenga idrolisi: l'idrolisi può avvenire anche, fra gli altri, nel caso di acetali, esteri fosfati, immine [126].

Il meccanismo di idrolisi, schematizzato in Figura 3.3.1, prevede la sostituzione nucleofila del gruppo funzionale, detto anche *leaving group* (L in figura), da parte di un gruppo idrossilico [130].

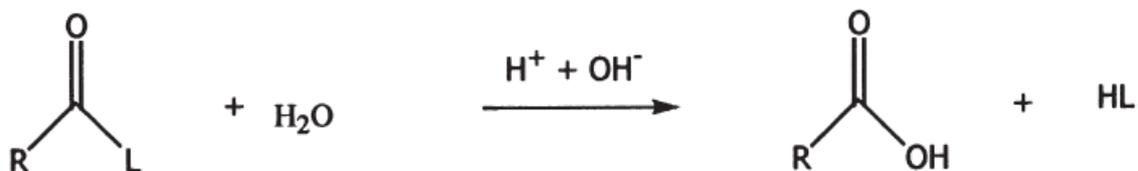


Figura 3.3.1. Meccanismo generale di idrolisi [126].

La reattività di un farmaco all'idrolisi è funzione di numerose variabili, tra le quali si ricordano il pH, la concentrazione della soluzione tampone in cui il principio attivo è disperso, la stabilità del *leaving group*, la presenza di metalli nel sistema; il processo di idrolisi può avvenire in presenza di catalizzatori acidi o basici, anche se alcuni gruppi funzionali vanno incontro ad idrolisi anche in assenza di catalizzatori (ad esempio, le immine) [126].

pH del mezzo

Il processo di idrolisi è fortemente influenzato dal pH del mezzo in reazione [126]: il controllo di tale parametro è dunque di cruciale importanza quando si sviluppino nuove formulazioni.

A seconda del pH, il processo di idrolisi può seguire due differenti meccanismi [126]:

- In ambiente basico, il carbonio *target* subisce un attacco nucleofilo da parte dello ione idrossido: questo primo stadio può essere il *rate determining step*²¹ a seconda delle condizioni al contorno del sistema; la velocità dello stadio di attacco nucleofilo è tanto maggiore quanto maggiore l'elettronegatività del gruppo sostituito R [126]. La reazione procede con la formazione di un intermedio tetraedrico e, infine, con l'eliminazione del *leaving group*. Il processo, schematizzato in Figura 3.3.2, è generalmente irreversibile [126].

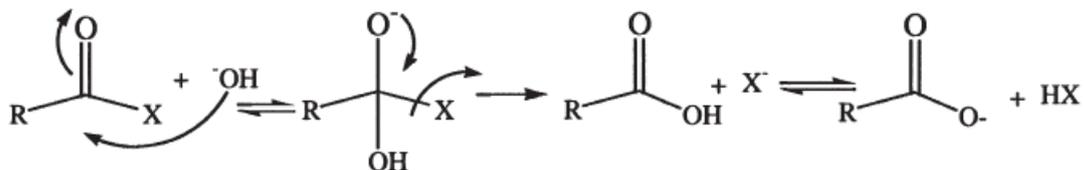


Figura 3.3.2. Meccanismo di idrolisi in ambiente basico [126].

²¹ La maggioranza delle reazioni chimiche è costituita da diversi stadi. Se uno di questi stadi è più lento degli altri allora la velocità complessiva del processo sarà determinata dalla velocità dello stadio più lento, detto perciò *Rate Determining Step* (RDS) [17].

- In ambiente acido, il primo stadio di reazione consiste nella protonazione dell'ossigeno del gruppo carbonile, cui seguono la formazione di un intermedio tetraedrico, lo spostamento di un protone ed infine l'eliminazione del *leaving group*. Il processo, schematizzato in Figura 3.3.3, si configura come equilibrio chimico reversibile che “rallenta” man mano che si formano prodotti [126].

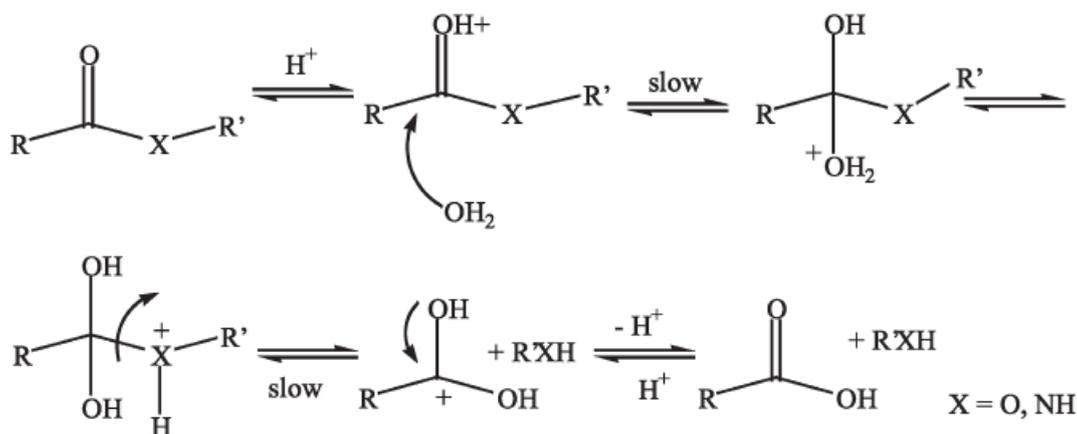


Figura 3.3.3. Meccanismo di idrolisi in ambiente acido [126].

Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione è il ruolo delle specie acide o basiche presenti nella soluzione tampone, che possono favorire la cinetica di reazione a seconda di quale sia il *rate determining step*; in tal caso, la concentrazione della soluzione tampone può influenzare la cinetica di idrolisi [126]. In ambiente basico, ad esempio, la presenza di specie basiche nella soluzione tampone può facilitare lo stadio di attacco nucleofilo in quanto le specie basiche possono rimuovere un protone dall'acqua, e determinare perciò la formazione di uno ione idrossido [126].

La variazione della velocità di idrolisi con il pH può essere non lineare, ed è necessario effettuare delle analisi per individuare:

- Per una certa concentrazione di soluzione tampone, il valore di pH per il quale la velocità di reazione è minima (tale valore è di solito leggermente acido, essendo le reazioni in ambiente acido più lente di quelle in ambiente basico [126]);
- Per un certo valore di pH, la concentrazione di soluzione tampone per la quale la velocità di idrolisi è minima [126].

La curcumina, principio attivo oggetto del presente lavoro di tesi, è sensibile all'idrolisi a pH basico, come si vedrà nel Capitolo 4. Come si vedrà nel Capitolo 6 e nel Capitolo 7, la conservazione della curcumina in ambiente basico ha richiesto particolari precauzioni e procedure al fine di preservare il principio attivo dalla degradazione.

Ruolo dei metalli

Alcuni ioni metallici, nello specifico gli ioni bivalenti, possono catalizzare l'idrolisi in condizioni acide o basiche [126] [128]: la velocità di idrolisi della lidocaina, ad esempio, aumenta di 14 volte in presenza di ioni metallici bivalenti [128]; anche gli antibiotici quali cefalosporine e penicilline vanno incontro a rapida idrolisi in presenza di ioni metallici bivalenti [19].

La catalisi da parte degli ioni metallici è più efficace quando la molecola di principio attivo possiede una carica parziale negativa nella propria struttura, in maniera tale da poter chelare²² lo ione e mantenerlo così prossimo al proprio sito reattivo [126]. Il catalizzatore metallico può agire sia facilitando il primo stadio di reazione, in quanto legandosi al carbonio del gruppo carbonile è in grado di renderlo più elettrofilo [126], sia accelerando la decomposizione dell'intermedio tetraedrico [126].

Idrolisi degli eccipienti

L'idrolisi degli eccipienti può essere una problematica particolarmente importante, in quanto gli eccipienti sono spesso presenti in concentrazioni elevate in una formulazione, tanto che anche piccole quantità di eccipiente degradato possono determinare variazioni nell'effetto della formulazione [126].

L'idrolisi di eccipienti può determinare la formazione di sottoprodotti tossici, indesiderati, o in grado di reagire con il principio attivo [126]; un'altra possibile conseguenza è la variazione del pH [126] [131]. È possibile, infine, che l'idrolisi di eccipienti (specialmente se di tipo polimerico [126]) determini la variazione di proprietà fisiche e di solubilità del farmaco [126].

Un esempio di eccipienti polimerici sono i derivati della cellulosa come la metilcellulosa, utilizzati come agenti leganti, per la realizzazione di *coating* di formulazioni solide o come addensanti: questi eccipienti idrolizzano a $\text{pH} < 3$ e possono determinare variazioni delle proprietà sensoriali del farmaco [126].

3.3.2. Plasticizzazione del farmaco

“Plasticizzazione” è un termine generalmente riferito alla scienza dei polimeri: consiste nell'incremento di flessibilità e nella riduzione di durezza di un polimero; avviene in seguito all'incorporazione di una sostanza, detta plasticizzante, nel polimero e determina inoltre la diminuzione della sua T_g [132].

In ambito farmaceutico, l'effetto di plasticizzazione riguarda soprattutto le porzioni amorfe della formulazione solida, in grado di includere in sé maggiori quantità di umidità residua: dal momento che la struttura dei solidi amorfi è priva di un ordine cristallino, infatti, l'acqua si può dissolvere in quest'ultima in quantità proporzionale alla massa totale del solido amorfo [122]. All'aumentare del contenuto di umidità nella formulazione, la T_g del solido si abbassa: questo fenomeno determina una transizione progressiva dello stato fisico da vetroso, rigido, a gommoso (in quanto si avrà che la temperatura esterna è superiore alla T_g) [122]. Le conseguenze della plasticizzazione sulle prestazioni del farmaco sono molteplici: l'abbassamento della T_g del solido, infatti, determina maggiore mobilità molecolare e, di conseguenza, una maggiore probabilità di reazioni chimiche di degradazione allo stato solido [122] [123]; le sostanze in precedenza amorfe possono andare incontro a ricristallizzazione [122].

²² La chelazione è una reazione all'equilibrio tra uno ione metallico ed una molecola organica in cui i due componenti sono legati da più di un legame. Lo ione metallico è detto agente complessante, mentre la molecola organica chelante è detta ligando [119].

3.4. Effetto della temperatura e del calore

La temperatura è uno dei fattori di maggior peso nella degradazione di un principio attivo. Secondo l'equazione di Arrhenius, la costante cinetica di una reazione di degradazione (k) dipende dalla temperatura secondo una relazione di tipo esponenziale [113] (Equazione (6)).

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (6)$$

In cui E_a è l'energia di attivazione del processo, il *gap* energetico che è necessario superare perché il processo avvenga [25], A è detta fattore di frequenza e R è la costante universale dei gas [113]. Questa equazione è valida negli intervalli di temperatura in cui A ed E_a possono essere considerate costanti e mostra come la maggioranza dei processi di degradazione risulti accelerata a temperature elevate [113].

La temperatura rappresenta un fattore critico soprattutto per formulazioni contenenti principi attivi di tipo proteico: le proteine, infatti, perdono la propria conformazione quando portate a temperature elevate, fenomeno noto come denaturazione [133]. La denaturazione non è degradazione, in quanto non determina la formazione di sottoprodotti [134]; una volta denaturate, tuttavia, le proteine non possiedono più la propria funzione e possono causare reazioni avverse al paziente che le riceve; a concentrazioni elevate, peraltro, la denaturazione è irreversibile [135]. Nella manipolazione e nel trasporto dei principi attivi proteici è essenziale tener conto della loro termosensibilità e rispettare una rigorosa catena del freddo [136]. Una simile problematica riguarda anche gli acidi nucleici [133].

Come per la fotodegradazione, l'utilizzo di *nanocarrier* può rappresentare una soluzione alla termosensibilità di alcuni principi attivi [137]. Un esempio di ciò è l'acido α -lipoico, un potente antiossidante con potenziali utilizzi nella cura delle patologie derivate dal diabete [138]. L'acido lipoico è sensibile alla luce e al calore, tanto da polimerizzare in maniera praticamente istantanea a temperature maggiori del suo punto di fusione, che si aggira intorno ai 58-65°C [137]. Dolinina *et al.* [137] hanno incorporato l'acido α -lipoico in particelle di silice, rilevando una degradazione massima del 10% a 67°C dopo 4 ore (in forma libera, l'acido α -lipoico si è degradato completamente in 2 h nelle medesime condizioni [137]). L'effetto di stabilizzazione al calore sarebbe dovuto all'interazione fra principio attivo e silice; le medesime interazioni non sarebbero tuttavia in grado di proteggere il principio attivo dalla fotodegradazione [137].

3.5. Ruolo del pH

Insieme al calore, il pH del mezzo in cui il principio attivo è inserito può causare dei processi di degradazione o incrementarne la velocità: la ragione di tali fenomeni risiede nella possibilità da parte degli ioni idronio e idrossido di catalizzare le reazioni di degradazione o parteciparvi [113]. Come per la temperatura, peraltro, il pH del mezzo può determinare la denaturazione dei principi attivi di origine proteica: la differente ionizzazione dei gruppi funzionali laterali al variare del pH può di fatto provocare variazioni nella conformazione della molecola [133].

Have *et al.* [139] hanno studiato la cinetica di degradazione dell'ossitocina al variare del pH, della temperatura e della concentrazione nel mezzo, al fine di identificare i percorsi di degradazione del farmaco quando sia esposto a condizioni di conservazione non ottimali (ad esempio, a pH fisiologico o temperature superiori ai 30°C). L'ossitocina è un ormone di

derivazione proteica che può essere soggetto a ossidazione degradativa, a deamidazione²³ o ad attacco sui ponti disolfuro [139]: per studiarne le cinetiche di degradazione si è scelto di rilevare la scomparsa del picco cromatografico caratteristico operando con cromatografia liquida a fase inversa²⁴.

I risultati dello studio mostrano come l'emivita dell'ossitocina si riduca di circa 1/5 quando il pH scende da 4.5 (pH di massima stabilità) a 2; l'emivita si riduce di un ordine di grandezza circa a pH fisiologico. La stabilità dell'ossitocina è minore a temperature elevate, in accordo con quanto già espresso da studi precedenti [140].

3.6. Reazioni di ossidazione

Le reazioni di ossidazione sono fra le principali cause di degradazione di principi attivi assieme all'idrolisi [141]. In generale, l'ossidazione può avvenire per reazione con ossigeno molecolare o con altre specie ossidanti; tali specie possono essere generate anche dalla decomposizione di eccipienti, ad esempio per interazione con la radiazione luminosa, come già osservato nel Paragrafo 3.2 [134]. Un processo di ossidazione si configura generalmente come una serie di reazioni a catena: il *rate limiting step* del processo è quasi sempre lo stadio iniziatore, la cui velocità è indipendente dalla concentrazione di ossigeno nel sistema [134]. Lo stadio iniziatore consiste nella formazione di una specie reattiva in seguito all'assorbimento di fotoni, oppure in un incremento di temperatura. Dal momento che la solubilità dell'ossigeno in soluzione acquosa si riduce all'aumentare della temperatura, tuttavia, quest'ultima possibilità è meno comune [134]. Particolare attenzione va invece rivolta alle reazioni di ossidoriduzione con ioni metallici, che possono dare inizio a processi di ossidazione: gli ioni metallici sono praticamente onnipresenti in tracce nelle soluzioni tampone e possono reagire con il principio attivo o con l'ossigeno molecolare, determinando la formazione di specie radicaliche che iniziano il processo di ossidazione [134] [141]. L'autossidazione del principio attivo, infine, può essere lo stadio iniziatore: come si vedrà nel Capitolo 4, la curcumina può andare incontro ad un processo di autossidazione che fornisce biciclopentadiene come prodotto finale. Le reazioni di autossidazione, avvenendo per definizione in assenza di catalizzatori, hanno velocità estremamente bassa e sono spesso trascurabili; in presenza di impurezze, tuttavia, possono essere lo stadio iniziatore [141] [142]. Nel farmaco, infatti, possono essere presenti in tracce sostanze molto reattive come i perossidi, in grado di strappare elettroni al principio attivo e dare così inizio alla catena di reazioni di ossidazione (Figura 3.6.1).

²³ La deamidazione consiste nell'idrolisi dei gruppi ammidici da molecole quali proteine o amminoacidi [119].

²⁴ La cromatografia liquida a fase inversa è una tecnica di separazione cromatografica caratterizzata da una fase stazionaria solida non polare e una fase mobile liquida polare [305].

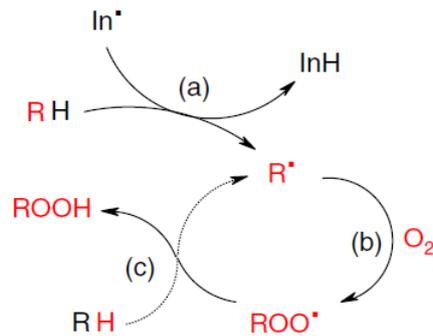


Figura 3.6.1. Meccanismo di autoossidazione: in (a) lo stadio iniziatore, in (b) gli stadi di propagazione, in (c) lo stadio di terminazione [142].

I principi attivi soggetti ad ossidazione possono essere formulati con eccipienti dalle proprietà antiossidanti, come l'acido ascorbico. Dal momento che tali eccipienti vengono consumati per stabilizzare il principio attivo, la *shelf-life* del farmaco dipenderà dal tempo necessario per consumare completamente l'eccipiente [134]; inoltre, gli antiossidanti scelti per formulazioni farmaceutiche devono essere biocompatibili [143]. In alternativa, si può “prevenire” l'ossidazione riducendo al minimo le quantità di metalli e di perossidi presenti nel farmaco; se non è possibile rimuovere del tutto gli ioni metallici, si possono impiegare agenti chelanti quali EDTA o l'acido citrico, in grado di sequestrare gli ioni metallici dal sistema [141] [144].

Won [145] ha analizzato la degradazione fotolitica ed ossidativa di un principio attivo antiemetico. Il processo ossidativo, identificato come autoossidazione, è caratterizzato da una fase iniziale più lenta, seguita da rapide reazioni di propagazione ed infine da una fase di stabilizzazione: l'ipotesi di Won è dunque che i prodotti di ossidazione inibiscano il processo di ossidazione stesso [145]. Tale processo risulta inoltre più rapido a pH acido e in ambienti a elevata umidità relativa; è catalizzato dagli ioni di metalli pesanti [145]. La soluzione proposta da Won per incrementare la stabilità del principio attivo è perciò l'aggiunta di agenti chelanti in grado di sequestrare tali ioni [145].

Dixon *et al.* [143] hanno sviluppato una formulazione ed una confezione in grado di proteggere dall'ossidazione la cisteamina, un principio attivo utilizzato nella cura di un disturbo della cornea. Questo principio attivo viene generalmente formulato in gocce oculari che presentano una *shelf-life* di circa un anno quando vengono congelate e si conservano una settimana dopo l'apertura, poiché una volta aperte la cisteamina si trova a contatto con l'ossigeno atmosferico [143].

Dixon *et al.* hanno ridotto la degradazione ossidativa del principio attivo e allungato la *shelf-life* delle gocce oculari fino a un anno a temperatura ambiente; hanno inoltre ottenuto stabilità del principio attivo fino a 70 giorni dall'apertura. Il risultato è stato raggiunto dopo aver testato tre soluzioni [143]:

- Alla formulazione sono stati aggiunti differenti antiossidanti al fine di verificare quale fosse il più efficace: in particolare, sono stati utilizzati la vitamina C (idrosolubile, aggiunta direttamente alla soluzione acquosa), la vitamina E (incorporata in un'emulsione) e l'enzima catalasi. Quest'ultimo è in grado di convertire le specie reattive dell'ossigeno in ossigeno molecolare.
- Il principio attivo è stato protetto dal contatto con l'aria. Nello specifico, si sono testati
 - un sistema bifasico acqua-olio: l'olio protegge la fase acquosa contenente il principio attivo;

- una confezione sigillata che utilizza materiali compositi alluminio-ferro poco permeabili all'ossigeno.

Il sistema più stabile prevede la combinazione dei tre approcci. Sono state inoltre realizzate delle lenti a contatto in grado di rilasciare il principio attivo nella cornea; le lenti a contatto rappresentano una soluzione di particolare interesse in quanto monouso. Le lenti a contatto confezionate con compositi ferro-alluminio presentano *shelf-life* fino a 750 giorni [143].

Nel capitolo seguente si presenteranno le proprietà chimiche e le applicazioni biomedicali del principio attivo scelto per il presente lavoro di tesi, la curcumina; si porrà particolare attenzione sulla tematica della stabilità di tale principio attivo e sui sistemi allo studio per la sua somministrazione.

Capitolo 4

Curcumina

4.1. Introduzione

La curcumina, anche detta diferuloilmetano, è un fitopolifenolo derivante dal rizoma della pianta *Curcuma longa*, da secoli diffusa nella cucina e nella medicina orientale [146]. La curcumina rappresenta il 2-5% della spezia ed è il componente più attivo della curcuma [147].

La curcumina è stata isolata per la prima volta nel XIX secolo; la sua struttura è stata determinata nel 1910 [7]. La curcuma, tuttavia, è utilizzata da millenni nei paesi orientali (in particolare, Cina e India), in forma di “impasto”, per la cura di numerose affezioni: sono riportati rimedi della medicina ayurvedica contro infezioni oculari, bruciature, cicatrici acneiche e varie malattie della pelle, ma anche contro malattie dell’apparato digerente [147] [7]. L’azione antiossidante della curcumina, peraltro, la rende un ottimo conservante per gli alimenti. Nonostante le sue proprietà fossero note da secoli, solamente a partire dagli anni ’90 del secolo scorso la letteratura scientifica ha concentrato la propria attenzione sulla curcumina, in seguito all’articolo di Aggarwal *et al.* che ne evidenziava il potenziale anticancerogeno [8] [148]. Da allora, l’interesse per questa sostanza è cresciuto molto rapidamente, arrivando ad oggi a più di 28.000 citazioni in letteratura (fonte Scopus).

4.2. Struttura chimica e proprietà

4.2.1. Struttura

L’olio essenziale estratto dal rizoma della curcuma contiene numerose specie chimiche, fra le quali la curcumina è il principale “responsabile” del colore giallo-arancio [149]; della curcumina esistono più forme (curcumina, dimetossicurcumina, bisdimetossicurcumina, ciclocurcumina [149]), la curcumina è la più presente (rappresenta il 94% sul totale [150]).

Dal punto di vista strutturale la curcumina è un dicitone, un metano in cui due degli idrogeni sono sostituiti da gruppi ferulici (Figura 4.2.1); la sua formula chimica è $C_{21}H_{20}O_6$, il suo nome IUPAC è (1E,6E)-1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)eppta-1,6-diene-3,5-dione [146]. La struttura chimica è caratterizzata da due sistemi di anelli aromatici contenenti gruppi *o*-metossifenolici connessi da una catena di sette atomi di carbonio che consiste in una porzione β -dicitone α,β -insatura [8].

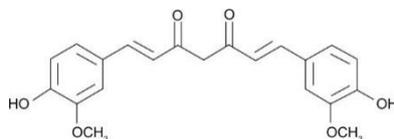


Figura 4.2.1. Struttura chimica della curcumina [151].

La curcumina presenta un idrogeno in α , vale a dire, un idrogeno legato ad un carbonio adiacente ad un gruppo carbonile: esibisce perciò tautomeria cheto-enolica²⁵, le cui implicazioni saranno meglio descritte nel Paragrafo 4.2.3.

4.2.2. Proprietà chimiche

La curcumina è un composto insolubile in acqua (si stima che la sua solubilità in acqua sia di 11 ng/mL [152]), solubile in vari solventi organici (etanolo, dimetilsolfossido, acetone, acetonitrile); il suo punto di fusione è a 183°C, il suo peso molecolare di 368.4 g/mol [146]. È un acido debole di Brønsted, con tre protoni dissociabili: due dei gruppi –OH fenolici, l'altro è il protone enolico [8]. Sperimentalmente è stato possibile stimare le tre costanti di dissociazione acide e le corrispondenti pK_a : in letteratura sono presenti valori di pK_a che variano su un range piuttosto ampio, a seconda del solvente utilizzato e del metodo di valutazione; in media, la pK_a della perdita del protone enolico è intorno a 8.38 [153]; infatti, a pH fisiologico (intorno a 7.4), circa il 10-25% di curcumina è monoanionico, il resto è costituito da curcumina neutra [153].

La curcumina risulta stabile in ambiente acido, mentre si degrada rapidamente in ambiente basico, dando trans-6-(4'-idrossi-3'-metossifenil)-2,3-diosso-5-esenale, acido ferulico, feruloilmetano, vanillina e acido vanillico come prodotti. Evidenze sperimentali mostrano che il prodotto di degradazione principale della curcumina è il biciclopentadione, risultato dell'autossidazione (si approfondirà la degradazione della curcumina nel Paragrafo 4.4.2) [154]. In generale, la curcumina è una sostanza molto fotosensibile, sia allo stato solido che in soluzione; tale sensibilità è maggiore in ambiente basico [153] [155] [156] [157] [158].

La curcumina, come detto, è utilizzata come pigmento grazie alle sue spiccate proprietà fotochimiche; presenta un massimo di assorbimento a 415-420 nm in acetone e a 425-430 nm in etanolo [149] [159]. Il suo colore è giallo a pH neutro, mentre il massimo di assorbimento si sposta a frequenze minori (rosso) in ambiente basico (effetto batocromo) [8]. La forma completamente deprotonata della curcumina (Cur^{3-}), invece, ha massimo di assorbimento intorno a 465 e 261 nm in ambiente basico, con spallamento a 360 nm [8] [160]. Per queste ragioni, la curcumina può essere utilizzata come indicatore di pH: a $pH < 1$ la curcumina si trova in forma protonata ed è di colore giallo, a pH compreso fra 1 e 7 è allo stato neutro e di colore giallo; a $pH > 7$, infine, la curcumina è deprotonata e di colore rosso [160]. Il massimo di assorbimento della curcumina nel visibile è probabilmente dovuto al sistema di doppi legami coniugati centrali, dal momento che analoghi e derivati della curcumina privi di tale cromoforo presentano massimi di assorbimento nell'UV [161].

4.2.3. Tautomeria cheto-enolica

Il nome IUPAC della curcumina la qualifica come β -dichetone; le analisi ai raggi X, tuttavia, mostrano come questo composto esibisca tautomeria cheto-enolica [162] (Figura 4.2.2).

²⁵ La tautomeria cheto-enolica è un fenomeno che si verifica nei chetoni che possiedono un idrogeno in α , vale a dire, un idrogeno che legato ad un carbonio adiacente ad un gruppo carbonile: in questo caso, il chetone è in equilibrio con il corrispondente alcol (forma enolica) [130].

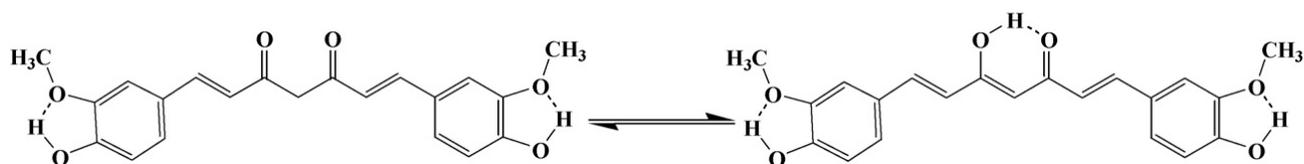
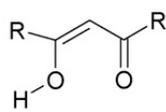


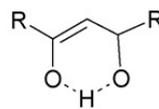
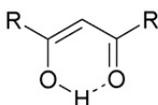
Figura 4.2.2. Tautomeria cheto-enolica della curcumina [153].

Le forme possibili per la curcumina sono dunque due, i due tautomeri cheto-enolici che si convertono l'uno nell'altro [162]. Studi con spettroscopia NMR hanno rilevato che fra i due tautomeri, la forma più comune in soluzioni apolari o debolmente polari è quella enolica; il *gap* energetico tra le due forme è intorno alle 7.75 kcal/mol [162]. La forma enolica risulta probabilmente più stabile a causa dei forti legami idrogeno intramolecolari che la stabilizzano; presenta struttura perfettamente planare, che consente la risonanza fra i due anelli benzenici; tra i due tautomeri, infine, presenta un protone più facilmente dissociabile [161] [162]. Nei solventi polari, il legame idrogeno intramolecolare è sostituito da uno intermolecolare; la forma enolica è in equilibrio con quella chetonica (tale equilibrio si verifica soprattutto a bassi valori di pH) [153]. In soluzione la curcumina presenta isomeria *cis-trans*, con la forma *trans*-leggermente più stabile di quella *cis*-, poiché i due gruppi fenolici metossi- si trovano da parti opposte della struttura [153]; le possibili forme per la curcumina sono mostrate in Figura 4.2.3. La forma enolica prevale anche nella curcumina allo stato cristallino [8].

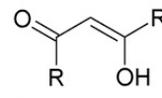
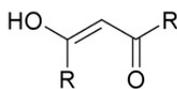
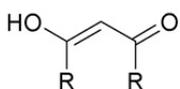
(A) Forme enoliche



Forma enolica
cis aperta

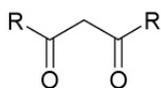


Forma enolica
cis chiusa

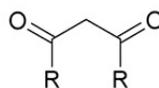
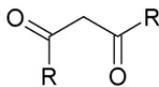


Forma enolica
trans

(B) Forme chetoniche



Dichetone cis



Dichetone trans

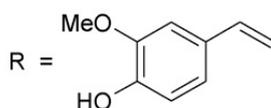


Figura 4.2.3. Forme chetoniche/enoliche e cis/trans possibili per la curcumina [153].

4.3. Produzione

La curcumina è principalmente estratta dalla sua fonte naturale; sono tuttavia presenti in letteratura modelli di produzione della curcumina da *E. Coli*²⁶ ingegnerizzato non patogeno: questa via potrebbe essere particolarmente promettente per la produzione *in situ* di curcumina, in prossimità dell'organo bersaglio, al fine di superare le difficoltà legate alla sua scarsa solubilità nei fluidi corporei [163] [164] [165].

L'estrazione della curcumina è stata possibile già a partire dai primi anni del XIX secolo; il settore è tuttavia in continuo sviluppo e, ad oggi, nuove tecniche vengono proposte per un processo più efficiente e a minor impatto ambientale [8]. Nell'estrarre questa sostanza è necessario tener conto che la curcumina tende a degradarsi per ossidazione piuttosto rapidamente in presenza di luce e calore; per questa ragione, i metodi utilizzati devono consentire un buon controllo del calore sviluppato [166].

La tecnica più utilizzata è l'estrazione in colonna con solvente: i rizomi della curcumina vengono tritati ed essiccati; si effettua poi l'estrazione vera e propria [167]. Vengono utilizzati solventi polari e non polari organici, tra i quali l'etanolo è il più comune (i solventi clorurati, per quanto molto efficienti, non sono adeguati all'uso alimentare; lo stesso può essere detto dei derivati del petrolio) [8]. Accanto all'estrazione in colonna, processi basati sull'estrattore Soxhlet²⁷ (in Figura 4.3.1) e pretrattamenti agli ultrasuoni e con microonde sono allo studio (ultrasuoni e microonde, in particolare, rappresenterebbero alternative poco costose e molto efficienti alla semplice estrazione con solvente [168]). Sono inoltre di particolare interesse commerciale metodi che utilizzano solventi alimentari o la CO₂ supercritica (modificata con etanolo 10% v/v [169]), specialmente per l'industria alimentare [8]. La CO₂ supercritica, soprattutto, risulta un solvente vantaggioso per l'estrazione di sostanze termolabili: è inerte, facilmente disponibile, non tossica, non corrosiva, riciclabile e stabile in condizioni non estreme, il che consente di preservare le caratteristiche delle sostanze termolabili estratte [8] [166]. Anche l'uso di enzimi quali α -amilasi e glucoamilasi ha dato buone rese, nonostante il costo elevato di un processo enzimatico [8]. Per separare la curcumina dai suoi analoghi presenti nella curcumina, è necessario utilizzare tecniche cromatografiche [165].

²⁶ *Escherichia coli* (*E. coli*) è un batterio Gram-, utilizzato ampiamente come organismo-modello in campo microbiologico e biotecnologico [298].

²⁷ L'estrattore Soxhlet è un'apparecchiatura di laboratorio, formata da tre parti sovrapposte: in basso, un pallone da distillazione, posto sopra una sorgente di calore; al centro, l'estrattore vero e proprio, all'interno del quale si posiziona il filtro a ditale che contiene il materiale solido; in alto, un condensatore, dal quale si ottiene di volta in volta il solvente puro (si veda Figura 4.3.1). Questo tipo di estrattore sfrutta il ricircolo di liquido attraverso un sifone per effettuare una separazione più efficiente dei componenti [301].

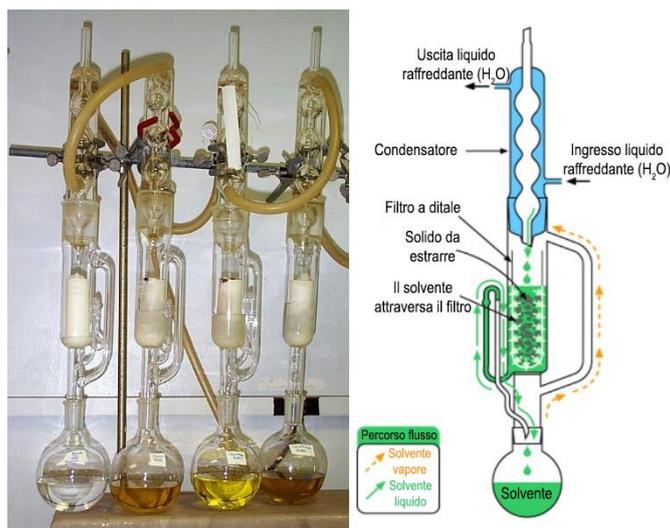


Figura 4.3.1. Tipica estrazione di curcumina in estrattore Soxhlet [170].

Braga *et al.* hanno confrontato varie tecniche di estrazione di uso comune, rilevando rese massime con l' estrazione Soxhlet (27% in peso) e massima attività antiossidante con l' estrazione Soxhlet e quella a bassa pressione; fra i solventi, etanolo e alcol isopropilico consentono un' estrazione maggiore [171].

4.4. Reattività

La curcumina è caratterizzata da un dicitone e da due gruppi fenolici; tipiche di questo composto sono le reazioni di ossidazione (donazione di uno o più protoni), di addizione nucleofila reversibile e irreversibile, di idrolisi e di degradazione e le reazioni enzimatiche [8].

4.4.1. Reazioni con i ROS

Una delle proprietà maggiormente apprezzate della curcumina, che le consente di agire su numerosi bersagli biologici e di produrre benefici anche a livello sistemico, è la sua attività antiossidante [7]. La curcumina è in grado di reagire con le specie reattive dell'ossigeno (ROS)²⁸ (similmente ad altre molecole quali la vitamina E [147]) e “spegnere” tali sostanze riducendo lo stress ossidativo [147]. Si suppone che la curcumina reagisca con molte specie ossidanti mediante il trasferimento di un elettrone; tra gli elettroni trasferibili, il sito di attacco più probabile è il gruppo ossidrilico della porzione fenolica [172]. Tale ipotesi è stata confermata sperimentalmente osservando che i curcuminoidi non fenolici non possiedono attività antiossidante [173] [174].

Si pensa che il meccanismo antiossidante sia caratterizzato da due stadi:

1. Nel primo stadio, la specie ossidante (radicale o molecola ossidante) reagisce con la curcumina non ossidata. La curcumina si comporta da donatore di elettroni e diviene a sua volta un radicale, “spegnendo” la molecola iniziale [172]. Il radicale formato dalla curcumina è meno reattivo rispetto alla specie ossidante: si tratta generalmente di un radicale fenossile ottenuto per riorganizzazione della struttura della curcumina in

²⁸ Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono specie derivate dall'ossigeno altamente reattive, come il radicale idrossido, il perossido di idrogeno, i perossinitriti; possono danneggiare i tessuti in quanto cause di stress ossidativo [296].

seguito all'azione antiossidante [172] [175]. Tale radicale è meno reattivo in quanto la sua struttura è stabilizzata per risonanza elettronica [173].

2. Nel secondo stadio, il radicale formato dalla curcumina viene convertito in materiale non radicale (stadio di terminazione) [176].

Numerosi studi mostrano inoltre la possibilità di reazione fra curcumina e radicali superossido [177] [178] [179]. In particolare, in solventi quali l'acetonitrile, la curcumina si comporta da donatore di protoni convertendo il superossido in radicale idro-perossido. Il radicale idro-perossido, instabile, produce perossido di idrogeno e ossigeno per disproporzionamento²⁹; la curcumina deprotonata è poi in grado di captare i protoni presenti in soluzione [177].

4.4.2. Reazioni di degradazione

La curcumina presenta due principali problematiche di stabilità *in vitro*, che ne riducono l'uso come farmaco: la degradazione e modificazione ossidativa e la solvolisi³⁰ [158] (Figura 4.4.1).

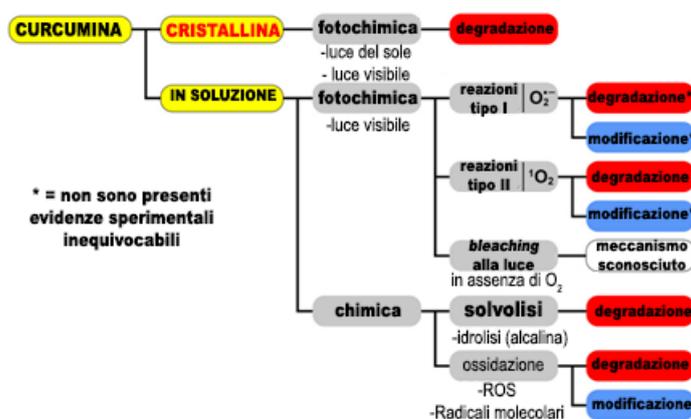


Figura 4.4.1. Meccanismi di degradazione della curcumina in soluzione e in forma cristallizzata [158].

La degradazione e modificazione ossidativa può avvenire in processi fotochimici (catalizzati dalla luce) o chimici (in assenza di luce). La curcumina va incontro a modificazione chimica e, di conseguenza, la sua struttura e le sue proprietà di legame variano [158].

Processi fotochimici

La curcumina è un cromoforo, con assorbimento elevato nel range del visibile, il che la rende suscettibile alla degradazione fotoossidativa e alla modificazione alla luce naturale e artificiale [158] [180]. La degradazione fotoindotta della curcumina avviene indipendentemente dall'ambiente, sia allo stato solido sia in vari solventi organici [157]; essa è causata perlopiù da processi ossidativi, innescati dalla produzione di ROS da parte della curcumina in stato di tripletto (³Cur) in seguito all'esposizione alla luce [158].

In soluzione, la cinetica di degradazione è fortemente dipendente dal solvente; l'esposizione alla luce visibile, peraltro, produce modifiche strutturali oltre alla degradazione [157].

²⁹ Le reazioni di disproporzionamento sono quelle reazioni redox in cui un composto con stato di ossidazione intermedio si converte in due composti, uno di stato di ossidazione maggiore e l'altro con stato di ossidazione minore (schema di reazione $A + A \rightarrow A' + A''$) [25].

³⁰ Si definisce solvolisi la reazione tra un soluto e il rispettivo solvente; rispetto alla solvazione, nella solvolisi il soluto perde la propria identità chimica originaria [17] [297].

Degradazione chimica

Accanto alla degradazione fotoindotta, la curcumina subisce una degradazione considerevole e piuttosto rapida anche in soluzioni tampone alcaline, nei mezzi di coltura cellulari e nel plasma umano [7] [147] [150] [157] [158]; la velocità di degradazione e l'ordine del processo di degradazione sono funzione rispettivamente del pH del mezzo e della temperatura; secondo le prime ipotesi, tale degradazione consisterebbe essenzialmente in solvolisi o idrolisi [158]. L'idrolisi fornisce vanillina, acido ferulico e feruloilmetano come prodotti di degradazione [155] (Figura 4.4.2). L'idrolisi è promossa dagli ioni OH^- , perciò, la sua velocità aumenta con il pH [158].

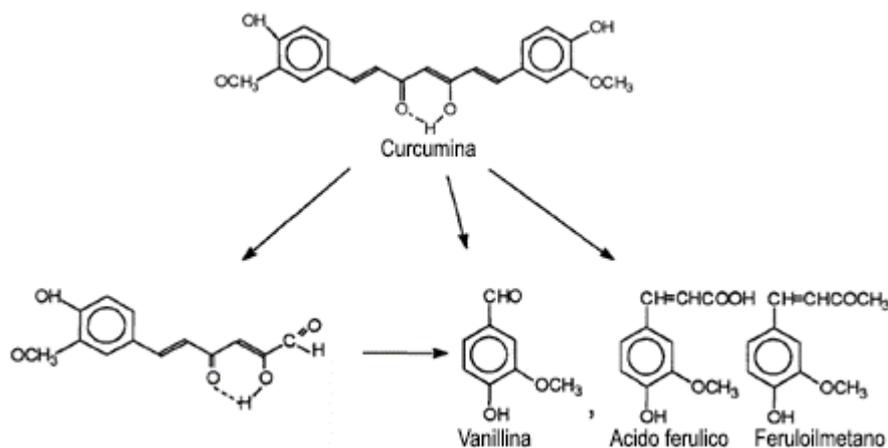


Figura 4.4.2. Prodotti di idrolisi della curcumina [155].

Ulteriore degradazione chimica della curcumina è dovuta non ad un'idrolisi, bensì a reazioni con i ROS non fotoiniziate [158]. La presenza di tali reazioni è giustificata dall'osservazione della presenza di prodotti catabolici ciclici, dimerizzati e monometossifenilici della curcumina, che certamente non possono provenire da reazioni di idrolisi. L'ipotesi più accreditata è che tali prodotti siano formati a partire da una curcumina in forma radicale, anche se il meccanismo di formazione di tali radicali è tuttora oggetto di studio [158].

Un'ipotesi proposta da Schneider *et al.* [181] è che la degradazione della curcumina in soluzioni tampone sia soprattutto un processo auto-ossidativo. Il prodotto maggiore di questa reazione sarebbe un biciclopentadione [181], secondo lo schema proposto in Figura 4.4.3. La velocità del processo di autossidazione è pH-dipendente, massima a pH 8 [182].

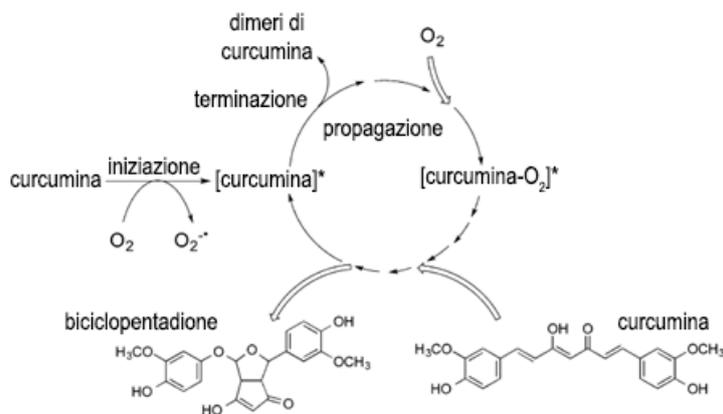


Figura 4.4.3. La reazione di degradazione della curcumina è una autossidazione che fornisce biciclopentadione [181].

Accanto alla degradazione chimica e fotochimica della curcumina, risulta fondamentale per le applicazioni terapeutiche l'analisi del metabolismo di questa sostanza *in vivo*.

4.4.3. Metabolismo *in vivo*

La modificazione chimica della curcumina *in vivo* è significativamente differente rispetto alla degradazione *in vitro*, perché i processi metabolici sono perlopiù catalizzati da enzimi e conducono a prodotti di degradazione differenti [160] [181] [183]. Il metabolismo della curcumina somministrata per via orale avviene principalmente nel fegato e nell'intestino attraverso reazioni di riduzione e di coniugazione [181] [183]. I prodotti delle reazioni di riduzione, che coinvolgono i doppi legami della catena eptadiendione, sono di-, tetra-, esa- e ottaidrocurcumina. Le reazioni di riduzione iniziano nell'intestino ad opera della reduttasi NADPH-dipendente³¹ *CurA*, individuata negli *E. coli* intestinali; nel fegato, gli enzimi alcol-deidrogenasi riducono la curcumina a di-, tetra- esa- e ottaidrocurcumina [183]. I prodotti del metabolismo intestinale possiedono minore attività biologica rispetto al loro precursore, e di questo è necessario tener conto quando si realizzino formulazioni contenenti curcumina [184]. La seconda fase del metabolismo prevede la coniugazione della curcumina con i prodotti di riduzione: la piccola quantità di curcumina assorbita si trova perciò nel sangue in forma di coniugato [183].

Studi di biodisponibilità condotti su ratti hanno mostrato che la curcumina, quando è somministrata per via orale (1 g/kg di peso corporeo), viene per la maggior parte escreta attraverso le feci [185] [186]; a livello epatico e intestinale ne sono assorbite scarse quantità che vengono poi escrete attraverso le urine [186] [187]. Negli studi clinici si è registrato un valore di concentrazione sierica massima C_{max} di 50 ng/mL in seguito a somministrazione per via orale di dosi crescenti da 500 mg a 12 g di curcumina [183]. Si possono assumere fino a 8-12 g/die di curcumina senza effetti collaterali, tuttavia l'assorbimento e la biodisponibilità nel siero sono molto basse e nella maggior parte dei casi la curcumina non viene rintracciata nel siero; ciò determina quantità tissutali di curcumina molto contenute [183]. La scarsa biodisponibilità della curcumina rappresenta il principale ostacolo al suo impiego come farmaco; l'interesse nello sviluppo di formulazioni in grado di incrementare la biodisponibilità di questa molecola è tuttavia crescente, a causa delle sue potenziali azioni terapeutiche che saranno meglio approfondite nel paragrafo seguente.

4.5. Azioni terapeutiche

Numerosi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato come la curcumina possieda azione antinfiammatoria, antisettica e antiossidante [7]. Questa sostanza è stata utilizzata con successo nella cura di molte malattie infiammatorie, come l'artrite, la gastrite, le allergie, nonché di patologie autoimmuni, quali la psoriasi e il diabete. Grazie alla sua azione antiossidante può essere utilizzata nella prevenzione di malattie legate all'invecchiamento cellulare; risulta infine particolarmente promettente l'impiego della curcumina nel trattamento e nella prevenzione di alcune tipologie di tumore [7] [8] [149] [150].

³¹ Le ossidoreduttasi o, più brevemente, reduttasi sono degli enzimi in grado di catalizzare il trasferimento di elettroni nelle reazioni di ossidoriduzione. Sono classificate in gruppi differenti a seconda dei donatori e accettori di elettroni [25].

Tali proprietà sarebbero legate alla grande quantità di bersagli molecolari possibili per la curcumina: questo composto è infatti in grado di modulare fattori di trascrizione³², citochine³³, fattori di crescita³⁴, chinasi³⁵ ed altri enzimi; è inoltre implicata nella regolazione dello stato ossido-riduttivo della cellula [150]. Rispetto ad altri antinfiammatori utilizzati comunemente in medicina, come gli steroidi e gli antinfiammatori non steroidei, la curcumina presenta pochi effetti collaterali; i suoi benefici sono tuttavia verificati perlopiù con studi *in vitro* o su modelli murini, in quanto la scarsa biodisponibilità della curcumina pura ne limita l'impiego in studi clinici [150].

Sono presenti in letteratura alcuni studi clinici randomizzati in doppio cieco che confermano le promettenti caratteristiche della curcumina: l'analisi sistematica di Jakubczyk *et al.* [188], ad esempio, mostra come la curcumina sia in grado di ridurre i livelli sierici di alcuni *marker* tipici dell'ossidazione, come la malondialdeide, e di incrementare l'attività antiossidante totale della cellula. L'analisi di Daily *et al.* [189], basata su studi clinici, ipotizza che la curcumina potrebbe essere efficace nel trattamento dell'artrite, ma il numero di studi presenti in letteratura è ancora esiguo per poter trarre conclusioni definitive. Per poter realizzare studi clinici di maggior peso, nonché per poter effettivamente impiegare la curcumina nella pratica medica, è necessario realizzare dei sistemi per il *delivery* di curcumina che consentano di incrementarne sensibilmente la biodisponibilità [189] [190]. Alcuni esempi di tali sistemi saranno presentati nei paragrafi successivi.

³² Si definisce fattore di trascrizione un qualsiasi gruppo di proteine in grado di regolare il legame fra RNA polimerasi e DNA e, di conseguenza, la trascrizione del DNA [31].

³³ Sono citochine tutte le proteine di piccole dimensioni, rilasciate da varie cellule, che influiscono sul comportamento delle cellule agendo da molecole-segnale [31].

³⁴ I fattori di crescita sono sostanze chimiche (soprattutto polipeptidi) con ruolo nella stimolazione della crescita e del mantenimento cellulare [31].

³⁵ Le chinasi sono enzimi in grado di trasferire gruppi fosfato da molecole ad elevato contenuto energetico, come gli ATP, ad altre molecole organiche [31].

4.6. Nanotecnologie per il *delivery* di curcumina

Gli studi presentati nei paragrafi precedenti hanno evidenziato le numerose proprietà della curcumina e i potenziali sviluppi nell'utilizzo di questa sostanza in ambito medico: grazie ai suoi molteplici bersagli cellulari, la curcumina rappresenta di fatto una promettente alternativa alle cure tradizionali, essendo peraltro priva di effetti collaterali nei dosaggi testati [7] [183].

Il principale ostacolo all'applicazione della curcumina è la sua scarsa solubilità in acqua: come visto, la curcumina è una sostanza lipofila; la sua solubilità aumenta leggermente nelle soluzioni acquose alcaline, nelle quali tuttavia è instabile e tende a degradarsi. I sistemi *nanocarrier* per incapsulare la curcumina rappresentano una possibile soluzione a questa problematica [8] [191]. Nella Figura 4.6.1 sono mostrati alcuni esempi di sistemi colloidali per il *delivery* di curcumina, delle quali si presenteranno caratteristiche, vantaggi e limiti nei paragrafi successivi.

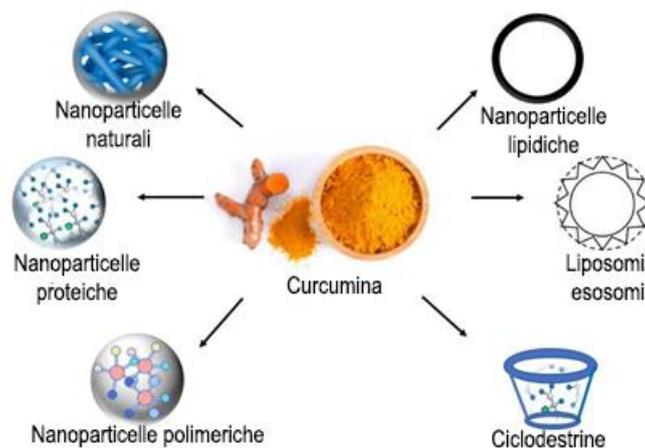


Figura 4.6.1. Sistemi colloidali per l'incapsulamento della curcumina [166].

4.6.1. Nanoemulsioni

Una nanoemulsione è costituita da gocce di acqua o olio (diametro massimo 200 nm [9] [192] [193] [194]) disperse rispettivamente in un mezzo lipofilo o acquoso. Questo sistema di trasporto del farmaco è stato utilizzato con successo con numerosi principi attivi liposolubili, inseriti all'interno della fase lipofila [195] [196] [197].

Tipologie e produzione di nanoemulsioni

A seconda della disposizione dei componenti, si distinguono tre tipologie di nanoemulsioni (Figura 4.6.2) [197]:

- Olio in acqua (O/W);
- Acqua in olio (W/O);
- Emulsioni bicontinue o multiple, nelle quali dei microdomini di acqua ed olio sono interdispersi nel sistema (ad esempio, W/O/W o O/W/O).

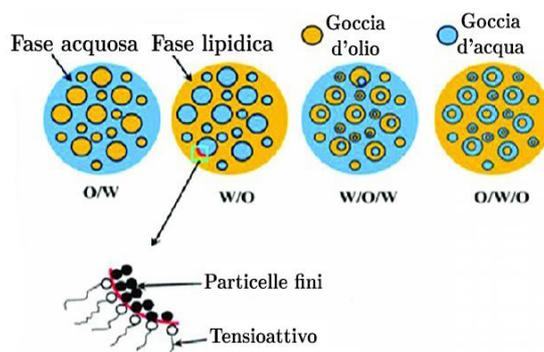


Figura 4.6.2. Tipologie di nanoemulsioni [198].

Per realizzare una nanoemulsione a partire da una macroemulsione (una emulsione con gocce di dimensioni nel *range* dei micrometri) sono necessari quattro elementi: due liquidi immiscibili, un agente emulsionante (tensioattivo) e dell'energia. Il contributo energetico è fondamentale per incrementare la superficie specifica di contatto fra i due liquidi; l'agente emulsionante riduce l'energia associata all'interfaccia olio-acqua, si adsorbe sulla superficie delle gocce e contribuisce a impedire la coalescenza delle gocce; può essere necessario un cotensioattivo qualora l'azione di un solo tensioattivo non sia sufficiente a stabilizzare l'emulsione [193] [198]. A seconda della carica superficiale delle gocce disperse conferita dall'agente emulsionante, le nanoemulsioni possono essere cationiche, anioniche o neutre [197].

È possibile ottenere nanoemulsioni con metodi a elevato dispendio energetico (ultrasuoni, omogeneizzatori ad alta pressione [9]) o con tecniche dal costo energetico più contenuto, come l'uso di canali microfluidici o le tecniche di inversione di fase³⁶ [193] [194] [199] [200]. Rispetto alle tecniche a elevato dispendio energetico, nelle quali l'energia necessaria viene fornita principalmente per via meccanica, i processi con costo energetico basso sfruttano solamente l'energia chimica della miscela tensioattivo-olio-acqua [193] [194].

Vantaggi e svantaggi delle nanoemulsioni

La curcumina in nanoemulsione ha una maggiore disperdibilità (fino a 1400 volte maggiore rispetto alla curcumina pura [9] [201]) e più efficace azione antiossidante; è inoltre più stabile e più resistente all'ossidazione, alle variazioni di pH e forza ionica, ai trattamenti termici e ai raggi UV, passaggi piuttosto comuni nell'industria di processo [196]. L'uso di nanoemulsioni, infine, conferisce alla curcumina una maggiore solubilità nei fluidi intestinali [196].

L'inserimento di curcumina in una nanoemulsione potrebbe andare ad influenzare la dimensione delle gocce e, conseguentemente, la stabilità del sistema. La biodisponibilità della curcumina, peraltro, è fortemente dipendente da dimensioni e composizione delle gocce in nanoemulsione: gocce più piccole determinano una maggiore biodisponibilità dei principi attivi liposolubili; a seconda della lunghezza delle catene idrofobiche e del loro grado di insaturazione, peraltro, l'interazione fra curcumina e fase lipidica può variare [196].

³⁶ L'inversione di fase di una emulsione è un fenomeno che si verifica in risposta a variazioni nella composizione e/o nella temperatura del sistema che causano una riduzione dell'energia dell'interfaccia acqua/olio [194].

4.6.2. Nanoliposomi

I liposomi sono strutture sferiche costituite da molecole anfifiliche (i fosfolipidi), caratterizzate da un doppio strato fosfolipidico che separa l'ambiente idrofilo interno (*core*) dall'ambiente idrofilo esterno. In pratica, i fosfolipidi si dispongono a doppio strato in maniera tale da esporre le teste idrofile all'ambiente acquoso, mentre le code idrofobe vanno a delimitare un ambiente idrofobico (Figura 4.6.3) [9] [202]. Data la loro natura, i liposomi sono ottimi *carrier* sia per molecole lipofile che per molecole idrofile. Sono in grado di includere in sé contemporaneamente principi attivi con differenti solubilità: i principi attivi idrofili, infatti, si posizionano all'interno del *core*; i principi attivi idrofobi, invece, si posizionano all'interno del doppio strato fosfolipidico [9].

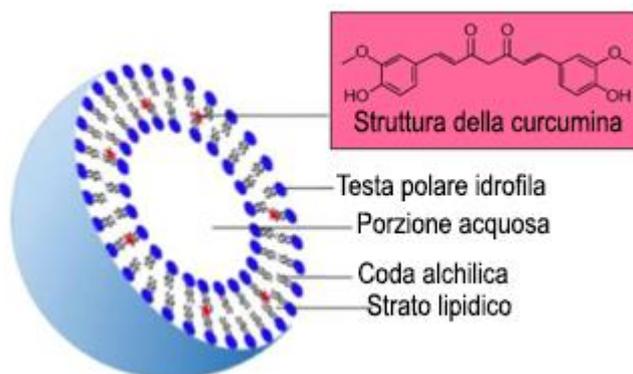


Figura 4.6.3. Rappresentazione schematica di un liposoma; la curcumina si posiziona all'interno del doppio strato fosfolipidico [202].

Tipologie e produzione di nanoliposomi

Esistono più tipologie di vescicole liposomali, differenti fra loro per dimensioni, struttura e funzione:

- Vescicole multilamellari, caratterizzate da più doppi strati concentrici e dimensioni comprese fra i 500 e i 5000 nm;
- Vescicole unilamellari piccole, di dimensione più contenuta (100 nm) e costituite da un solo doppio strato fosfolipidico; sono le più utili in campo medico, grazie alla possibilità di raggiungere numerosi *target* altrimenti inaccessibili, come il cervello [203];
- Vescicole unilamellari grandi, come quelle piccole ma con dimensioni fra i 200 e gli 800 nm;
- Immunoliposomi, modificati con ligandi superficiali (in genere, immunoglobuline o loro frammenti) in grado di legarsi in maniera altamente specifica al bersaglio cellulare [204].

La produzione di liposomi può essere effettuata mediante vari processi, dei quali i più comuni sono il metodo del film sottile [205] e quello di iniezione di etanolo [203].

Nel primo caso, il principio attivo liposolubile è miscelato con i fosfolipidi ed un lipide in un solvente organico come l'etanolo; la miscela viene poi fatta evaporare sottovuoto; i liposomi sono infine idratati con una soluzione tampone acquosa. Questo metodo fornisce vescicole multilamellari di dimensioni eterogenee [203]: per ridurre le dimensioni dei liposomi, ottenendo vescicole unilamellari piccole, è possibile sottoporli a trattamento agli ultrasuoni [202]. Lin *et al.* [205] hanno utilizzato questa tecnica per preparare una formulazione iniettabile contenente curcumina: l'uso di nanoliposomi ha consentito un incremento fino al 30% dell'attività antitumorale del principio attivo.

L'iniezione di etanolo consente di ottenere direttamente vescicole unilamellari piccole, senza la necessità di trattamenti successivi sui liposomi [203]. In questo caso, la miscela di principio attivo, fosfolipidi e lipidi in etanolo viene iniettata in un grande quantitativo di tampone acquoso; l'espansione del piccolo quantitativo di fase organica nella fase acquosa innesca il processo di auto-assemblamento dei fosfolipidi e la formazione dei nanoliposomi [206].

Shin *et al.* [207] hanno utilizzato l'iniezione di etanolo per produrre nanoliposomi con *coating* di chitosano. L'utilizzo di chitosano ha permesso l'applicazione di questa formulazione al *delivery* intranasale di curcumina, incrementando di fatto l'adesione dei liposomi alle mucose [207]; è stato inoltre possibile incapsulare la curcumina con efficienza del 65% [207].

Vantaggi e svantaggi dei nanoliposomi

Questo sistema di incapsulamento consente sia di migliorare la solubilità della curcumina, sia di proteggerla dalla fotodegradazione e dalla degradazione chimica [205] [208]. Data la loro somiglianza alle membrane cellulari, inoltre, i liposomi sono facilmente impiegabili nel *delivery* intracellulare di farmaci, poiché sono in grado di fondersi con le membrane cellulari [205]; infine, possiedono elevata biocompatibilità [20]. Tali caratteristiche hanno determinato la scelta dei liposomi come *carrier* di principi attivi liposolubili, come la doxorubicina, nonché di plasmidi [9] [202] [209]. Ad oggi, tuttavia, l'uso dei nanoliposomi è piuttosto limitato a causa della loro breve emivita e della suscettibilità a ossidazione ed idrolisi [9]. Per migliorare la stabilità dei liposomi in dispersione è possibile utilizzare additivi lipidici come il colesterolo o *coating* in chitosano o PEG [9].

Takahashi *et al.* [208] hanno incapsulato la curcumina in nanoliposomi (diametro medio 220 nm) ottenuti da due differenti lecitine disponibili in commercio (SLP-WHITE e SLP-PC70); utilizzando SLP-PC70, è stato possibile raggiungere il 68% in peso di curcumina nei nanoliposomi, e una concentrazione massima di circa 320 µg/L nel plasma a 30 minuti dalla somministrazione, contro i 65 µg/L massimi ottenuti per la curcumina pura. Lo studio propone tre possibili ragioni per la maggiore biodisponibilità della curcumina incapsulata:

- L'assorbimento diretto delle nanoparticelle attraverso il tratto gastrointestinale;
- Una maggiore permeabilità da parte dei tensioattivi;
- Una minore degradazione della curcumina, "protetta" dai nanoliposomi.

4.6.3. Nanoparticelle lipidiche

Le nanoparticelle lipidiche (SLN, *Solid Lipid Nanoparticles*) sono delle goccioline lipidiche cristallizzate, con una struttura cristallina organizzata; queste particelle sono costituite da lipidi allo stato solido, tensioattivi ed acqua [9]. Il principio attivo può essere incorporato nella matrice cristallina della nanoparticella, in maniera omogenea (*bioactive-enriched matrix* o *homogeneous matrix*), nel *core* della particella (*bioactive-enriched core*) o nel suo *shell*, vale a dire, nello strato più esterno (*bioactive-enriched shell*) [9] [210] (Figura 4.6.4). Mentre l'incapsulamento nel *core* o nell'intero volume della particella è utile per un rilascio controllato e prolungato, isolare il principio attivo sulla sola superficie consente di ottenere un rilascio di farmaco più rapido, quasi "esplosivo" [211].

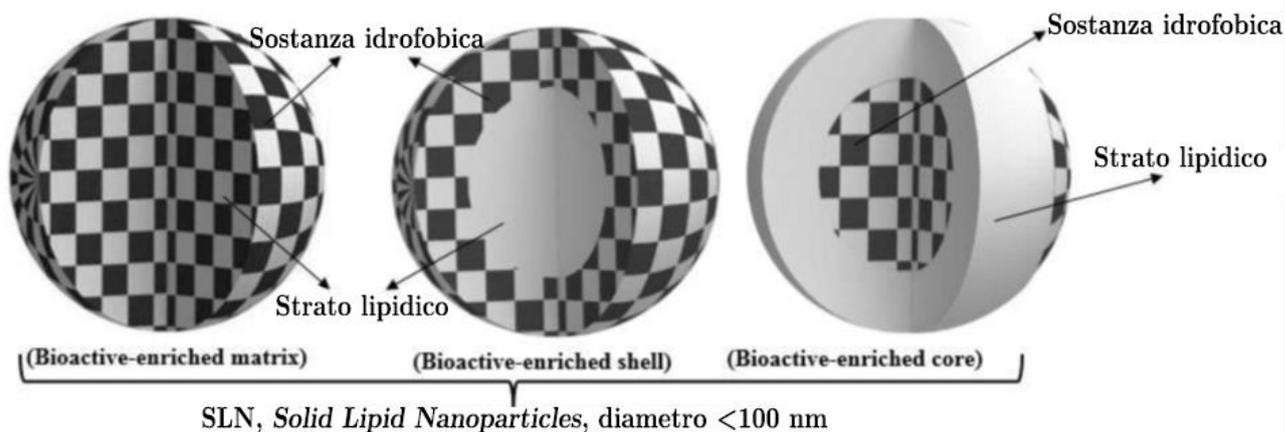


Figura 4.6.4. Tipologie di SLN (in bianco, la miscela lipidica; in bianco e nero, il principio attivo liposolubile) [210].

Produzione di SLN

I metodi di produzione delle SLN riportati in letteratura sono essenzialmente tre [212]:

- Omogeneizzazione del fuso;
- Microemulsione del fuso;
- Omogeneizzazione a freddo.

Nel primo caso, il principio attivo e il lipide scelto vengono miscelati e portati a una temperatura superiore a quella di fusione del lipide *carrier*; si aggiungono poi a una soluzione di tensioattivo a elevata temperatura, e il tutto è sottoposto a omogeneizzazione ad alta pressione. Il raffreddamento finale avviene generalmente in uno scambiatore di calore, in seguito a vari passaggi di omogeneizzazione [212]. Sun *et al.* [213] hanno realizzato nanoparticelle lipidiche utilizzando questo metodo; hanno poi confrontato la stabilità della curcumina pura con quella della curcumina incapsulata, mantenute entrambe in condizioni fisiologiche (PBS³⁷ 0.1 M, pH 7.4). Al contrario della curcumina pura, degradata al 90% dopo solamente 10 minuti di incubazione, dopo 12 ore di incubazione solamente il 40% della curcumina incapsulata si è degradato.

Il processo di microemulsificazione sfrutta la tendenza dei tensioattivi ad arrangiarsi in micelle [212]. La miscela di lipidi e principio attivo viene fusa e unita ad una soluzione di tensioattivo al di sopra della propria CMC; si raffredda e diluisce il preparato utilizzando acqua a 2-3°C, in

³⁷ PBS (*Phosphate-Buffered Saline*): è una tipologia di soluzione tampone salina, realizzata in maniera tale da avere la medesima pressione osmotica delle cellule e pH fisiologico [294].

modo tale da provocare la solidificazione delle particelle [212]. Questo genere di processo non necessita di energia meccanica. Kakkar *et al.* [214] hanno prodotto SLN caricate con curcumina mediante un processo di microemulsificazione: le particelle hanno mantenuto la propria stabilità anche dopo un anno di conservazione a 5°C; a dosi di 1 mg/kg di peso corporeo, inoltre, la curcumina incapsulata ha una biodisponibilità 155 volte maggiore rispetto alla curcumina libera.

L'omogeneizzazione a freddo viene scelta quando il principio attivo da incapsulare è sensibile al calore [212]. In breve, i lipidi scelti per la formulazione vengono fusi, il principio attivo è disperso nel fuso e la dispersione viene raffreddata rapidamente utilizzando azoto liquido. Si sottopone il preparato a macinatura, generalmente in un mulino a sfere, facendo attenzione a non superare la temperatura critica per il principio attivo, ed infine lo si miscela con una soluzione di tensioattivo a bassa temperatura, per poi sottoporlo nuovamente a una macinatura più fine. Questa tecnica consente di ottenere SLN con distribuzione omogenea del principio attivo nella matrice lipidica [211].

La produzione di SLN con farmaco isolato nel *core* o nello *shell* è realizzata regolando opportunamente la temperatura e la concentrazione relativa di principio attivo e lipidi, in maniera tale da modificare la solubilità del principio attivo nelle fasi lipidica e acquosa e ottenere, rispettivamente, precipitazione dal fuso lipidico al centro della particella o accumulo sulla sua superficie [210].

Nel caso delle SLN con principio attivo nel guscio esterno, la concentrazione del farmaco nel fuso lipidico è mantenuta bassa, in maniera tale da ottenere dapprima la solidificazione di lipidi puri, il *core* della particella, e in superficie la miscela di lipidi e principio attivo; la tecnica più adatta per produrre queste particelle è dunque l'omogeneizzazione del fuso [211].

Le particelle con principio attivo nel *core*, invece, sono realizzate con concentrazioni elevate di principio attivo nel fuso lipidico, vicine alla concentrazione di saturazione: si ottiene in questa maniera la precipitazione del farmaco al centro della particella, seguita dalla solidificazione del resto del fuso. Anche in questo caso, perciò, la tecnica più adatta è quella di omogeneizzazione del fuso [211].

Grazie alla loro struttura cristallina e all'uso di lipidi allo stato solido, le nanoparticelle lipidiche presentano numerose caratteristiche utili per l'incapsulamento di principi attivi lipofili.

Vantaggi e svantaggi delle SLN

I numerosi vantaggi di questi *nanocarrier* riguardano soprattutto i principi attivi lipofili, come la curcumina. Nello specifico, le SLN garantiscono i seguenti benefici [210]:

- Elevata efficienza di incapsulamento: le nanoparticelle lipidiche contengono generalmente il 90% della curcumina introdotta nel sistema [213] [215];
- Produzione senza necessità di solventi organici, semplice e poco costosa: le nanoparticelle lipidiche rappresentano una scelta promettente per la successiva produzione su larga scala;
- Possibilità di proteggere il principio attivo da condizioni esterne avverse;
- Maggiore stabilità del principio attivo rispetto alle nanoemulsioni, incapsulato in una matrice solida e dunque soggetto a minor mobilità [212];
- Profili di rilascio prolungati, modulabili a seconda delle caratteristiche del lipide scelto;
- Biocompatibilità.

L'uso delle SLN in ambito farmaceutico è tuttavia ancora limitato a causa di alcune problematiche ad esse connesse [210] [212]:

- La struttura cristallina di una SLN ha una capacità di incapsulamento piuttosto scarsa; se la capacità massima è superata, la particella può espellere il principio attivo o rompersi;
- Le SLN possono subire trasformazioni cristalline polimorfiche al variare delle condizioni esterne, e il principio attivo potrebbe essere espulso dal *carrier*; in seguito a trasformazioni polimorfiche della SLN, peraltro, la sospensione potrebbe convertirsi in gel;
- Al variare delle condizioni esterne, la sospensione di SLN potrebbe destabilizzarsi, portando a coalescenza delle nanoparticelle; questa problematica risulta particolarmente rilevante per quei processi, come la sterilizzazione, che prevedono un considerevole incremento della temperatura del prodotto.

Le limitazioni legate alle nanoparticelle lipidiche solide sono state parzialmente superate introducendo un'altra tipologia di *nanocarrier* a base lipidica, i *carrier* lipidici nanostrutturati (NLC): questi *carrier*, caratterizzati da superficie costituita da lipidi allo stato solido e *core* costituito da lipidi allo stato liquido, hanno consentito l'incapsulamento di quantità maggiori di farmaco, nonché maggiore biodisponibilità del principio attivo rispetto alle SLN, caratteristiche garantite dalla presenza di una fase liquida all'interno della particella [210]. In Figura 4.6.5 è mostrato un confronto tra le strutture di SLN e NLC.

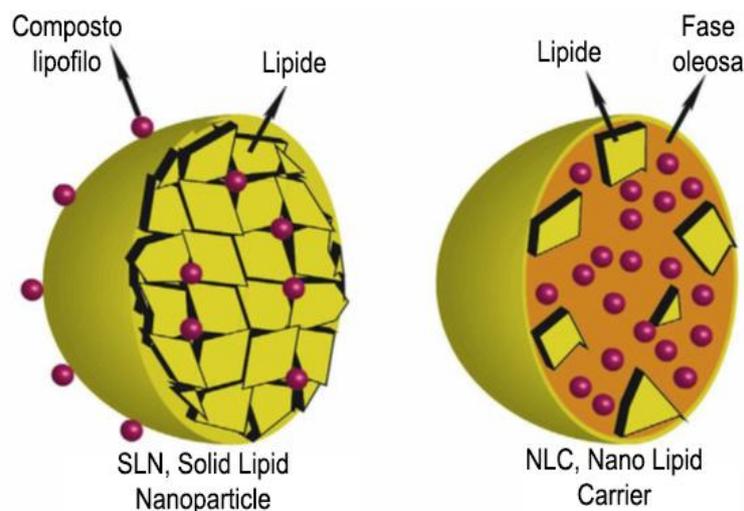


Figura 4.6.5. Confronto tra nanoparticelle lipidiche solide (SLN) e carrier lipidici nanostrutturati (NLC) [210]

4.6.4. Nanoparticelle polimeriche

Le nanotecnologie per incapsulamento di principi attivi prevedono l'uso di materiali polimerici biodegradabili, siano essi di origine naturale (chitosano, alginati, amido, gel proteici, ecc.) o sintetica (PLA, PLGA, ecc.). Questi *nanocarrier* sono particolarmente adatti per l'uso medico perché biocompatibili, non tossici e non immunogenici [9] [216]; consentono il rilascio controllato di farmaco grazie alla compresenza di due meccanismi, la biodegradazione della nanoparticella e la diffusione [217].

Tipologie e produzione di nanoparticelle polimeriche

A seconda della tipologia di nanoparticelle, si parla di nanocapsule, nanosfere, nanomicelle. Nel caso delle nanocapsule, il principio attivo lipofilo è disperso nel *core* liquido della particella, circondato da una "membrana" polimerica. Le nanosfere sono caratterizzate da una

distribuzione uniforme del principio attivo nell'intero volume della particella [9] [216]. Le nanomicelle, infine, sono particolari nanoparticelle costituite da copolimeri a blocchi (con unità idrofile e idrofobe), caratterizzate da *shell* idrofilo e *core* idrofobo [9] [218]. In generale, tutte le tipologie di particelle polimeriche consentono un incremento della stabilità della curcumina nella formulazione [9]; le nanomicelle sono caratterizzate da dimensioni inferiori rispetto agli altri sistemi, con diametri medi generalmente al di sotto dei 100 nm [9].

I metodi di produzione di nanoparticelle polimeriche differiscono a seconda dell'origine del polimero utilizzato, e si distinguono perciò in tecniche per polimeri di sintesi e tecniche per biopolimeri. Il farmaco può essere incorporato fisicamente o coniugato chimicamente alle particelle durante la loro sintesi, oppure adsorbito sulla loro superficie mediante incubazione post-sintesi; la prima tecnica consente di inserire maggiori quantità di farmaco [217]. Di seguito si presenteranno brevemente le tecniche più utilizzate, facendo riferimento inoltre alla produzione di nanomicelle polimeriche.

Nanoparticelle da polimeri di sintesi

Nel caso di nanoparticelle polimeriche di sintesi, l'incapsulamento può essere effettuato mediante evaporazione del solvente oppure per nanoprecipitazione.

Nella tecnica di evaporazione del solvente, la miscela di principio attivo e polimero incapsulante è unita ad un apposito solvente non polare; si crea poi un'emulsione di olio in acqua utilizzando un agente emulsionante (come la gelatina) e si provoca infine l'evaporazione del solvente, ottenendo particelle polimeriche caricate con il principio attivo idrofobico [9] [216] (Figura 4.6.6). A seconda della scelta di solventi e agenti emulsionanti, la formazione dell'emulsione può richiedere l'introduzione di energia meccanica (con un omogeneizzatore ad alta pressione o ultrasuoni) [9].

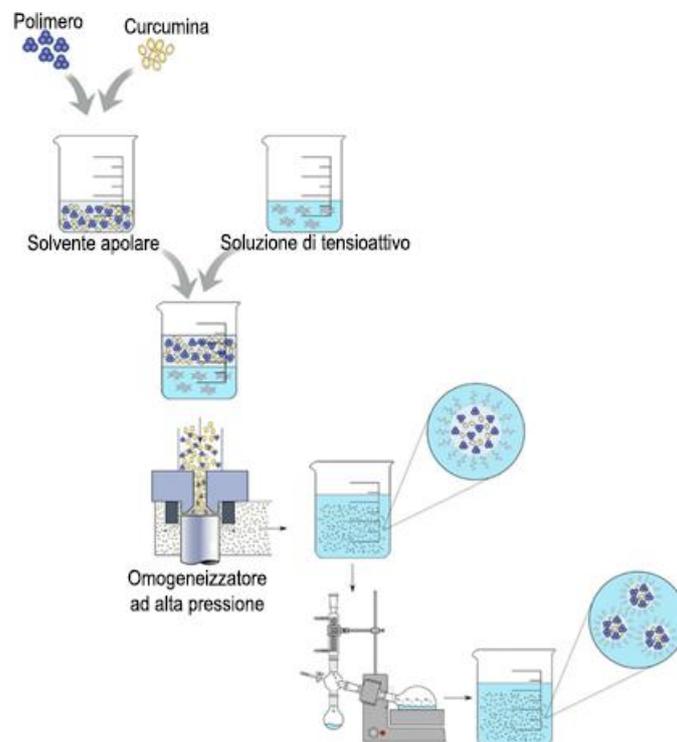


Figura 4.6.6. Meccanismo di incapsulamento per evaporazione del solvente [20]

Tsai *et al.* [219] hanno realizzato nanoparticelle polimeriche caricate con curcumina utilizzando questa tecnica. Le particelle ottenute hanno diametro medio inferiore ai 200 nm, con distribuzione delle dimensioni piuttosto ridotta: questa caratteristica risulta fondamentale nello

sviluppo di *nanocarrier* di farmaci, in quanto consente di mantenere le caratteristiche farmacocinetiche il più omogenee possibile fra le varie particelle, ed è stata ottenuta aggiungendo saccarosio alla fase acquosa, in maniera tale da incrementarne la viscosità [219]. *In vivo*, in seguito a somministrazione intravenosa, queste particelle si accumulano principalmente nella milza e nei polmoni e sono in grado di penetrare attraverso la barriera emato-encefalica; la loro emivita risulta significativamente incrementata nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo rispetto a quella della curcumina pura [219].

La nanoprecipitazione non richiede l'uso di emulsioni come precursori, il che la rende un metodo più rapido [9]. In breve, il principio attivo e il polimero incapsulante sono disciolti in un solvente organico polare, e la soluzione è aggiunta goccia a goccia in un liquido non solvente (di solito l'acqua); dal momento che il soluto non è solubile nella miscela binaria formata, precipita formando le nanoparticelle [9] [220].

Caon *et al.* [220] hanno realizzato nanoparticelle polimeriche mediante nanoprecipitazione, confrontando le caratteristiche della sospensione ottenuta con quelle di una nanoemulsione e di una sospensione di nanoparticelle lipidiche solide; la formulazione realizzata è stata studiata per l'applicazione al *delivery* cutaneo. La sperimentazione ha fornito particelle caratterizzate da dimensioni contenute in tutti e tre i sistemi; tra i tre, le nanoparticelle polimeriche sono caratterizzate da minimo indice di polidispersità³⁸ e massima ritenzione a livello epidermico, nonché da massima efficienza di incapsulamento, quasi unitaria [220].

Nanoparticelle da biopolimeri

La sintesi di nanoparticelle formate da biopolimeri viene effettuata mediante tecniche basate sul *self-assembly* di molecole, dette desolvazione (nel caso in cui il polimero utilizzato sia di tipo proteico) e nanoprecipitazione (per i polisaccaridi) [9]. Entrambi i metodi prevedono le seguenti operazioni:

1. Il biopolimero e il principio attivo sono disciolti rispettivamente in acqua e in un solvente organico polare (agente desolvante, ad esempio l'etanolo);
2. Mantenendo in agitazione, la soluzione di agente desolvante è aggiunta goccia a goccia a un grande quantitativo di soluzione acquosa di biopolimero;
3. Si attende il completamento del processo di desolvazione, al cui termine la soluzione ha un aspetto torbido;
4. Le particelle sono stabilizzate mediante *cross-linking*³⁹ e separate dalla soluzione per centrifugazione [9].

In breve, il processo di desolvazione (Figura 4.6.7) vede sostituire l'acqua in cui il biopolimero è disciolto con un altro solvente, l'agente desolvante, e ciò determina variazioni nella conformazione del polimero che ne causano la precipitazione.

³⁸ L'indice di polidispersità (PDI, *Polydispersity Index*) è una misura dell'ampiezza della distribuzione delle masse molecolari in un polimero; si calcola come rapporto fra la media pesata e la media numerica delle masse molecolari. Un polimero si dice monodisperso quando il suo indice di polidispersità è minore o uguale a 1.1 [275] [299].

³⁹ Si definisce *cross-linking* la formazione di legami chimici tra le catene polimeriche grazie a reazioni chimiche, bombardamento con elettroni o vulcanizzazione [302].

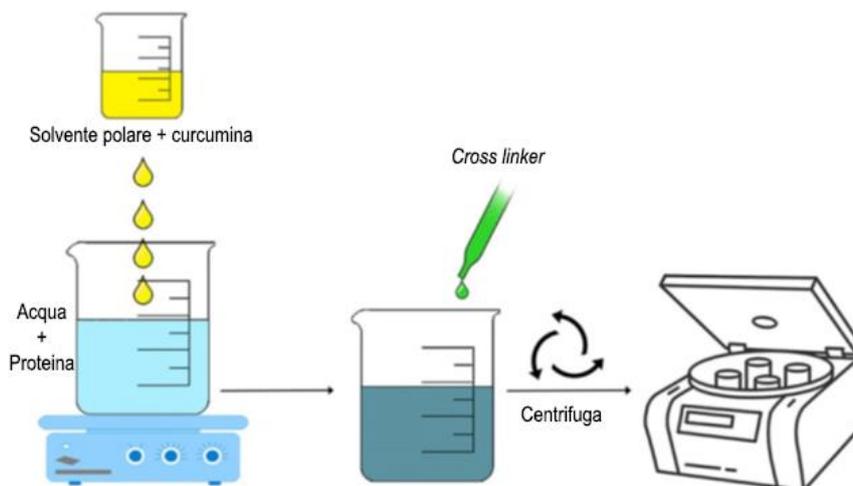


Figura 4.6.7. Schema del processo di desolvazione [20].

La tecnica di desolvazione, seppur con leggere modifiche, è stata utilizzata per la sintesi di particelle di zeina⁴⁰ caricate con curcumina [221]. Dopo aver impiegato vari agenti desolvanti con differenti affinità per la zeina, è stato osservato il diametro particellare minimo utilizzando il metanolo; tuttavia, data la maggiore affinità della curcumina per l'etanolo, si è scelto di utilizzare questo solvente per la sintesi di nanoparticelle. La curcumina così incapsulata possiede maggiore resistenza alla fotodegradazione; è inoltre protetta dalla degradazione dovuta a pH fisiologico e basico [221].

Nanomicelle polimeriche

Le nanomicelle polimeriche possono essere sintetizzate sia per via chimica che per via meccanica. La sintesi chimica prevede una coniugazione tra il principio attivo incapsulato e il polimero idrofobico contenuto nel *core* della micella mediante legame covalente; l'incapsulamento per via fisica può essere effettuato mediante dialisi⁴¹ o emulsificazione [216]. Nel primo caso, il polimero è disciolto in un solvente organico miscibile con acqua; la miscela viene poi diluita con acqua e fatta passare attraverso una membrana da dialisi fino a completa rimozione del solvente organico; le micelle possono essere quindi liofilizzate, oppure la soluzione concentrata per evaporazione [216].

Nel secondo caso, i copolimeri a blocchi vengono disciolti in solventi organici che sono poi fatti evaporare, fino a formare un film sottile; si aggiungono quindi soluzioni acquose e si tratta la miscela con ultrasuoni, fino ad ottenere delle micelle; la soluzione viene fatta evaporare fino a rimuovere completamente il solvente organico [216].

Gong *et al.* [222] hanno sintetizzato delle nanomicelle polimeriche contenenti curcumina; il procedimento utilizzato, in un solo stadio, non ha richiesto l'utilizzo di tensioattivi o solventi organici tossici. In breve, la curcumina e il copolimero sono stati disciolti assieme in alcol disidratato e coevaporati, ottenendo l'inserimento della curcumina all'interno del polimero in forma amorfa; l'aggiunta di acqua ha determinato la formazione delle micelle. L'analisi della reazione con software di dinamica molecolare ha mostrato che la curcumina è in grado di

⁴⁰ La zeina è una proteina contenuta nell'endosperma del grano; costituisce il 45-50% del contenuto proteico della pianta [270].

⁴¹ La dialisi è un processo in cui le molecole di soluto vengono scambiate tra due liquidi per diffusione attraverso una membrana semipermeabile, in risposta a differenze tra i potenziali chimici dei due liquidi [296].

inserirsi all'interno delle micelle grazie all'interazione con la porzione idrofoba del polimero: il meccanismo di formazione delle micelle è perciò di tipo chimico [222]. Le micelle formate, di dimensioni medie fra i 10 e i 40 nm, hanno mostrato maggiori citotossicità e assorbimento da parte delle cellule tumorali rispetto alla curcumina non incapsulata [216] [222].

Vantaggi e svantaggi delle nanoparticelle polimeriche

Rispetto ad altri sistemi di rilascio del farmaco, le nanoparticelle polimeriche offrono una maggiore versatilità: la possibilità di modificare il polimero, infatti, consente di adattare le caratteristiche *nanocarrier* al farmaco prescelto e al necessario profilo di rilascio [223]. Altri vantaggi di questo *drug delivery system* sono [223]:

- Semplicità di produzione;
- Elevata efficienza di incapsulamento;
- Protezione del principio attivo;
- Elevato rapporto superficie/volume;
- Profilo di rilascio facilmente regolabile;
- Possibilità di funzionalizzare la superficie della nanoparticella per ottenere rilascio più lento o verso specifici organi *target*;

Allo stesso tempo, le nanoparticelle polimeriche soffrono di alcune cruciali limitazioni, che dovranno essere superate per un loro impiego futuro nelle terapie [224]:

- Alcuni polimeri tendono a formare prodotti di degradazione tossici nel sito di rilascio: un esempio è il PAC (polialchilcianoacrilato), degradato dalle esterasi [224];
- I processi di produzione di nanoparticelle polimeriche sono piuttosto costosi e la produzione su larga scala di particelle monodisperse è più difficoltosa;
- La correlazione tra le proprietà delle nanoparticelle e il loro comportamento *in vivo*, nonché la loro stabilità a lungo termine è ancora ignota.

4.6.5. Ciclodestrine

Le ciclodestrine sono degli oligosaccaridi prodotti a partire dall'amido per via enzimatica [9]; sono costituite da 6, 7 o 8 unità di glucopiranosio, legate con legame glicosidico⁴² [9] [216]. Le ciclodestrine possono esistere in tre differenti forme cilindriche, dette α -, β - o γ -ciclodestrine, rispettivamente; la forma β - è la più utilizzata come *carrier* di principi attivi [216] (Figura 4.6.8).

⁴² Il legame glicosidico è un legame covalente che si instaura tra il carbonio anomero di un saccaride (il carbonio la cui configurazione determina i due stereoisomeri) e un gruppo -OR [130].

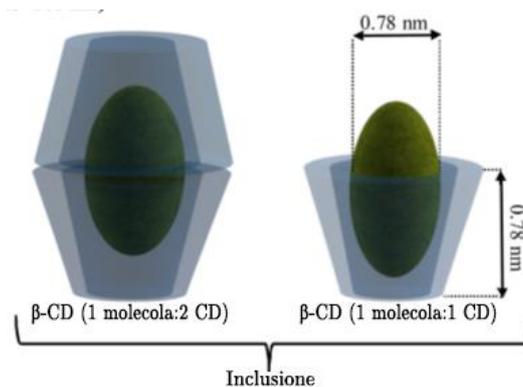


Figura 4.6.8. Inclusione di un principio attivo in una (a destra) o due (a sinistra) β -ciclodestrine [82].

La struttura a tronco di cono delle β -ciclodestrine è caratterizzata da una cavità centrale, relativamente idrofobica poiché verso l'interno sono rivolti gli atomi di ossigeno coinvolti nel legame glicosidico e gli atomi di idrogeno, e una superficie esterna, idrofila grazie alla presenza di gruppi idrossilici polari [9]. Generalmente, è possibile includere una molecola ospite per ogni ciclodestrina (stechiometria 1:1 [216] [225]); sono presenti tuttavia casi in cui una singola ciclodestrina accoglie più di un ospite molecolare [225]. La curcumina e, in generale, i principi attivi idrofobici si inseriscono all'interno delle ciclodestrine formando complessi stabili grazie alle interazioni idrofobiche con la superficie interna della cavità [9] [225]; l'inserimento dei principi attivi all'interno di ciclodestrine consente di proteggerli dal calore, dalla luce, dall'ossidazione e dalla riduzione [9] [225].

Generalmente, non esiste una sola metodologia per la produzione di ciclodestrine, e il processo di incapsulamento è sviluppato secondo il principio attivo scelto e le apparecchiature disponibili [225]. Accanto a tecniche già descritte per altri *nanocarrier* come l'evaporazione del solvente e la coprecipitazione, un metodo piuttosto comune per la produzione di ciclodestrine è la miscelazione a secco del principio attivo con le β -ciclodestrine [216] [225]. In breve, le ciclodestrine e il principio attivo vengono tritati e miscelati; per ottenere particelle di dimensioni desiderate si passa la miscela al setaccio [225].

Yallapu *et al.* [226] hanno incapsulato la curcumina in β -ciclodestrine per incrementare l'efficacia di questo principio attivo nella cura del cancro alla prostata. Il processo di incapsulamento utilizzato è stato quello di evaporazione del solvente: la curcumina disciolta in acetone è stata miscelata con una soluzione acquosa di ciclodestrine; la miscela è stata sottoposta a centrifugazione e le ciclodestrine sono state recuperate dal surnatante mediante liofilizzazione⁴³; il procedimento è stato effettuato con vari quantitativi di curcumina. Le ciclodestrine così ottenute contengono curcumina in forma amorfa, fino al 26% sul peso totale del *carrier* [226]; sono in grado di migliorare la solubilità della curcumina in ambiente acquoso (fino a 30 volte in PBS [226]), di incrementarne la stabilità (a pH fisiologico, più dell'80% della curcumina è rimasta intatta dopo 72 ore [226]) e di inibirne la precipitazione a pH fisiologico. La curcumina incapsulata in ciclodestrine possiede inoltre maggiore attività citotossica a confronto con la curcumina pura [226].

⁴³ La liofilizzazione è un processo utilizzato per rimuovere il solvente mediante sublimazione dallo stato congelato. Il processo viene utilizzato per conservare o estendere la *shelf-life* di materiali sensibili al calore rimuovendo il solvente con un congelamento rapido e l'essiccamento sottovuoto [17].

Vantaggi e svantaggi delle ciclodestrine

Le ciclodestrine sono un prodotto seminaturale, con bassissima tossicità e ottima biocompatibilità [226]; rispetto alle nanoparticelle, inoltre, consentono di incorporare una maggior quantità di farmaco [226]. Grazie alle ciclodestrine è possibile incrementare la solubilità dei principi attivi idrofobici in ambienti acquosi, e proteggerli dall'idrolisi, dalla fotodegradazione e dal calore [118] [226].

Allo stesso tempo, le ciclodestrine soffrono alcune limitazioni: innanzitutto, l'efficienza di incapsulamento del principio attivo in una ciclodestrina è fortemente dipendente dalla sua affinità per la ciclodestrina nonché da vari parametri di processo quali la temperatura, la velocità di agitazione e le condizioni di separazione delle forme complessate dalle forme non complessate [225]; sono inoltre necessari studi più approfonditi riguardo la loro tossicità e i meccanismi di eliminazione di queste particelle [227].

4.6.6. Silici mesoporose, mesostrutturate, ibride

Come già osservato nel Capitolo 1, le silici mesoporose rappresentano un promettente *drug delivery system* grazie alle loro numerose caratteristiche favorevoli, che si riportano brevemente di seguito [26] [36]:

- Dimensioni delle particelle e dei pori facilmente regolabili secondo le esigenze;
- Possibilità di funzionalizzare internamente ed esternamente le particelle;
- Elevata resistenza a stress meccanici, calore, variazioni di pH;
- Elevati volume poroso e superficie specifica;
- Bassa tossicità e costo contenuto;
- Biocompatibilità elevata e biodegradabilità.

Queste proprietà rendono le silici mesoporose un *carrier* ideale per principi attivi idrofobici come la curcumina.

Elbially *et al.* [36] hanno sintetizzato delle silici mesoporose contenenti curcumina, funzionalizzate in superficie con PEG: la curcumina è stata incorporata nelle silici dopo la rimozione del tensioattivo, mediante un trattamento agli ultrasuoni, con efficienza del 92%; in seguito è stato aggiunto il PEG, ancora per sonicazione. Le silici ottenute sono caratterizzate da dimensioni uniformi al di sotto dei 200 nm e porosità ordinate; il *coating* con PEG consente di incrementare la circolazione delle particelle nel sangue e rende possibile il rilascio controllato di curcumina in ambiente a pH acido, l'ambiente tumorale [36]. Solamente l'1% della curcumina presente è stato rilasciato in fluidi simulanti il sangue (pH 7.4), mentre il 52% della curcumina è rilasciato quando le nanoparticelle sono poste in ambiente acido (pH 5.5), mostrando l'efficacia del *coating* polimerico.

Al contrario delle silici mesoporose, le silici mesostrutturate e ibride sono state raramente utilizzate per l'incorporazione di curcumina; in particolare, l'utilizzo del tensioattivo *templating agent* per incorporare la curcumina è scarsamente documentato. Nel presente lavoro di tesi si è tentato di sviluppare una procedura per sintetizzare una silice ibrida, contenente il tensioattivo utilizzato per il *templating*, a partire da uno scarto di una tipica sintesi da materie prime. Nel capitolo seguente si descriveranno i materiali e le tecniche di caratterizzazione impiegate

Capitolo 5

Materiali e metodi

5.1. Materiali

Per le sintesi delle particelle ibride e le successive caratterizzazioni sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Acqua demineralizzata di grado 3 tramite sistema RO CUBIC 30/d;
- Idrossido di sodio (NaOH), BioXtra, $\geq 98\%$, pellet anidro, Sigma-Aldrich®;
- Esadeciltrimetilammonio bromuro ("CTAB", $C_{19}H_{42}BrN$), BioXtra, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich®;
- Curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), $\geq 65\%$, in polvere da *Curcuma Longa*, Sigma-Aldrich®;
- Tetraetile ortosilicato ("TEOS", $SiC_8H_{20}O_4$), $\geq 99.995\%$, Sigma-Aldrich®;
- Etanolo (C_2H_5OH), Fluka®

5.2. Metodi

5.2.1. Sintesi

Le sintesi a partire da materie prime, riassunte in Figura 5.2.1, sono state realizzate modificando il procedimento di Cai *et al.* e Onida *et al.* [228] [229] come già riportato da Gallo *et al.* [230]. La sintesi viene effettuata in condizioni blande (soluzione acquosa, temperatura ambiente) e consente di ottenere un materiale ibrido mesostrutturato, vale a dire, una silice con un ordine a livello mesoscopico e contenente tensioattivo all'intero dei propri pori. Il tensioattivo non viene eliminato, ma rimane all'interno della silice e trattiene in sé la curcumina incorporata durante la sintesi, originando così un materiale ibrido. Sono state realizzate cinque sintesi: le sintesi HYBRID_RAW_1 e HYBRID_RAW_2, realizzate a partire da materie prime con i rapporti molari indicati in Tabella 5.2.1, hanno fornito dei filtrati di scarto che sono stati utilizzati come preparato di partenza per le sintesi successive, denominate rispettivamente HYBRID_FILTRATE_1 e HYBRID_FILTRATE_2. La sintesi HYBRID_RAW_3, realizzata a partire da materie prime e della quale si discuterà in Appendice, ha fornito alcune preziose indicazioni riguardo la degradazione della curcumina nei filtrati.

Le sintesi da materie prime sono realizzate utilizzando i rapporti molari indicati nella Tabella 5.2.1. In breve, 0.193 g di NaOH (in forma di pellet) sono disciolti in 95 mL di acqua distillata, ottenendo una soluzione 0.05 M di NaOH. La soluzione viene agitata manualmente fino a completa solubilizzazione dell'idrossido di sodio; si aggiungono quindi 0.400 g di tensioattivo (CTAB), ottenendo un preparato dall'aspetto lattiginoso. Si mantiene la soluzione in agitazione con agitatore magnetico (velocità di circa 300 rpm) per almeno 30-45 minuti, fino ad ottenere una soluzione più limpida (il tempo totale di agitazione dipende, come ovvio, dalla velocità di agitazione utilizzata). Si aggiungono quindi 62 mg di curcumina, si mantiene la soluzione in agitazione a 150 rpm e si attendono circa 5 minuti per la sua solubilizzazione (dato l'aspetto torbido del preparato in seguito all'aggiunta di curcumina, la scelta di un tempo di 5 minuti è del tutto arbitraria).

Al preparato così ottenuto si aggiunge, goccia a goccia, il precursore della silice (TEOS, 2 mL). L'aggiunta goccia a goccia consente di ottenere particelle più grandi e regolari, come riportato in letteratura [231].

Dopo circa tre ore di miscelazione (sempre a 150 rpm), si procede filtrando la soluzione con l'ausilio di una pompa ad acqua per velocizzare il processo. Il precipitato è sottoposto a due lavaggi consecutivi con acqua distillata (circa 50 mL per ciascun lavaggio) al fine di rimuovere eventuali residui di reagenti; in seguito, è lasciato essiccare in stufa a 40°C per circa 15 h. Il filtrato ottenuto è conservato al buio per la sintesi successiva da filtrato. Il procedimento è riassunto in Figura 5.2.1.

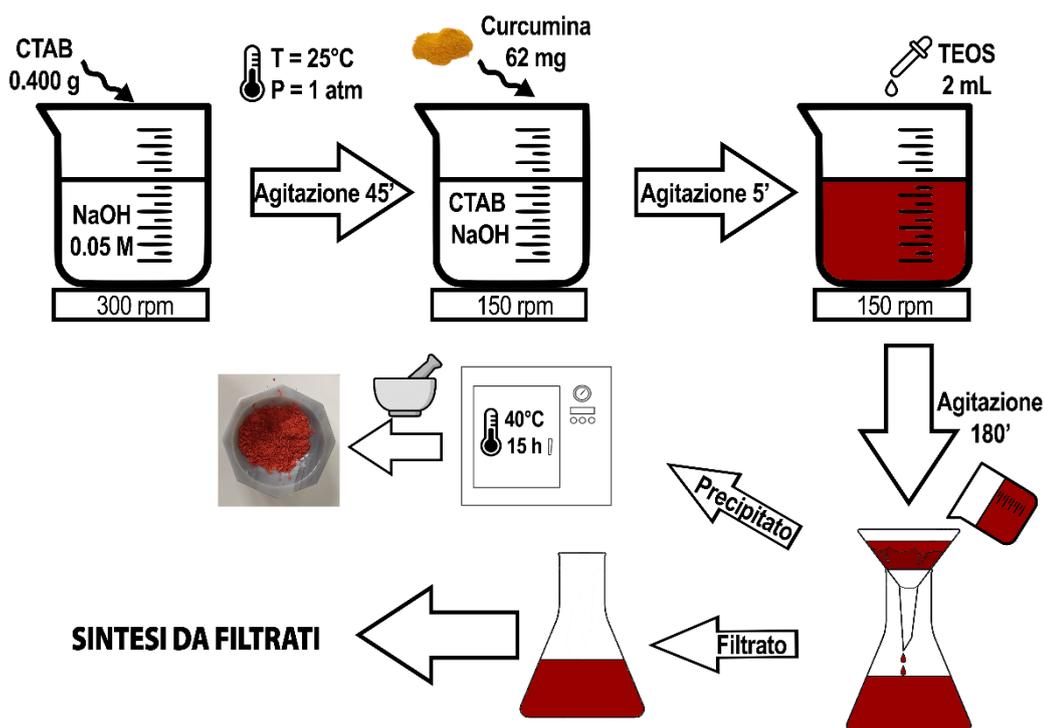


Figura 5.2.1. Schema delle sintesi a partire da materie prime.

Tabella 5.2.1. Rapporti molari utilizzati per le sintesi da materie prime HYBRID_RAW_1 e HYBRID_RAW_2.

TEOS	CTAB	NaOH	H ₂ O	Curcumina
1	0.122	0.536	589	0.02

I filtrati delle sintesi HYBRID_RAW_1 e HYBRID_RAW_2 sono stati impiegati per le sintesi senza pretrattamenti, aggiungendo solamente i reagenti mancanti. Il calcolo dei reagenti necessari per le sintesi da filtrati è stato effettuato nell'ipotesi di utilizzo dell'intero quantitativo di curcumina rimasto libero nel filtrato; i rapporti molari scelti per la sintesi sono i medesimi delle sintesi da materie prime. Il calcolo dei reagenti necessari per le sintesi da filtrati sarà esplicitato più estesamente nel Capitolo 6.

5.2.2. Tecniche di caratterizzazione

Di seguito si descriveranno le tecniche di caratterizzazione utilizzate per l'analisi dei precipitati e dei filtrati ottenuti dalle sintesi; l'analisi dei precipitati è stata effettuata per le sintesi HYBRID_FILTRATE_1, HYBRID_FILTRATE_2 e HYBRID_RAW_3.

Analisi termogravimetrica (ATG)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica di caratterizzazione che consente di valutare la perdita di peso di un campione solido in funzione del tempo e/o della sua temperatura [119]. Grazie alla termogravimetria è possibile individuare, pur con una certa approssimazione, le sostanze presenti nel materiale analizzato: per ogni sostanza è infatti nota la temperatura caratteristica di transizione (cambiamento di stato, degradazione, temperatura di transizione vetrosa, ...) e, osservando gli intervalli di temperatura in corrispondenza dei quali si verificano le perdite in peso, è possibile risalire alla composizione del campione [232].

In particolare, per i fini posti nel presente lavoro, si è osservata la variazione percentuale in massa del campione, valutata nell'Equazione (7):

$$\Delta m_{\%} = \frac{m_{iniz} - m_{fin}}{m_{iniz}} \cdot 100 \quad (7)$$

Strumentazione e procedura

Per effettuare l'analisi termogravimetrica viene utilizzato un DSC/TGA 92-16.18 Setaram. In una analisi termogravimetrica tipica, circa 5-15 mg di campione vengono versati all'interno di un crogiolo in allumina. L'analisi viene effettuata incrementando la temperatura di 10 °C/min a partire dalla temperatura ambiente fino ad arrivare a 800 °C; l'atmosfera è controllata insufflando una miscela di argon e ossigeno, in modo da allontanare eventuali prodotti di degradazione volatili [232].

I risultati dell'analisi vengono rappresentati in un grafico "Perdita in massa percentuale vs. Temperatura", accompagnato generalmente dalla sua curva derivata. Nel presente lavoro di tesi, l'analisi termogravimetrica viene utilizzata per valutare la perdita in massa a partire dai 150°C, in modo da escludere quella dovuta all'allontanamento dal materiale dell'acqua fisiosorbita, che si presume completo a 150°C. La perdita in massa fra 150° e 650°C è dovuta alla degradazione del tensioattivo, alla degradazione della curcumina e (in misura minore) alla condensazione dei silanoli superficiali (formazione del gruppo -Si-O-Si- in luogo del gruppo -Si-OH) [231]. Si assume, per semplicità, che tale perdita in massa sia dovuta esclusivamente alla degradazione della componente organica del materiale: in questa maniera è possibile stimare la percentuale in massa di materia organica (tensioattivo e curcumina) presente nel campione.

Spettroscopia UV-VIS

La spettroscopia è una tecnica analitica che si basa sull'utilizzo della luce, che può essere assorbita, emessa o trasmessa da un campione. In particolare, la spettroscopia UV-Visibile viene effettuata con luce di lunghezza d'onda nella regione dell'ultravioletto e del visibile (tra 200 e 700 nm) [130]. Questo tipo di radiazione elettromagnetica è caratterizzato da elevata energia, sufficiente a causare la transizione degli elettroni che costituiscono il materiale dallo stato fondamentale allo stato eccitato (da un orbitale ad un altro a energia maggiore) [233].

In particolare, sono possibili le seguenti transizioni elettroniche [130] [233]:

- $\pi \rightarrow \pi^*$: promozione di una coppia di elettroni da un orbitale di legame π a un orbitale di antilegame π^* ;
- $n \rightarrow \pi^*$: promozione di una coppia di elettroni da un orbitale di non legame a un orbitale di antilegame π^* .

Le sostanze analizzate con la spettroscopia UV-VIS possono contenere cromofori. I cromofori sono dei gruppi funzionali in grado di assorbire luce a una determinata lunghezza d'onda caratteristica; questa proprietà viene utilizzata per identificare le sostanze presenti in soluzione e, grazie alla legge di Lambert-Beer (Equazione (8)), la concentrazione delle sostanze [233]. In particolare, la legge di Lambert-Beer (valida per soluzioni molto diluite) mette in relazione l'assorbanza di un campione ad una determinata lunghezza d'onda e la concentrazione della sostanza corrispondente [130].

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad (8)$$

Dove A indica l'assorbanza del campione registrata dallo strumento (adimensionale), ε è il coefficiente di assorbimento molare⁴⁴ ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$), b è la lunghezza del cammino ottico (cm) e C la concentrazione molare del campione [130]. Noti i gruppi funzionali cromofori presenti in una sostanza e le lunghezze d'onda corrispondenti ai massimi di assorbimento, è perciò possibile correlare l'assorbanza di una soluzione alla sua concentrazione [233].

Strumentazione e procedura

La spettroscopia UV-VIS viene effettuata utilizzando uno spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer; le cuvette utilizzate sono in quarzo e hanno un cammino ottico di 1 cm.

Per misurare l'assorbanza di una soluzione è necessario utilizzare due cuvette. Inizialmente, lo strumento viene tarato utilizzando due cuvette contenenti solvente puro; in questa maniera è possibile ottenere il valore di assorbimento del solvente puro, che verrà sottratto da quello della soluzione; sarà così possibile ricavare l'assorbanza del soluto puro. In seguito, si inseriscono nello spettrofotometro due cuvette, una contenente il solvente puro ("bianco") e l'altra contenente la soluzione.

Ciascuna misura viene ripetuta tre volte: le prime due utilizzando lo stesso campione, in modo da verificare il corretto funzionamento dello strumento; la terza utilizzando un campione differente della medesima soluzione, in maniera tale da verificare l'omogeneità della soluzione. La media delle tre misure è rappresentata in un grafico "Assorbanza vs. Lunghezza d'onda".

Nel presente lavoro, la spettroscopia UV-VIS viene utilizzata sia in forma qualitativa, per verificare la presenza di una sostanza nella miscela analizzata, sia in forma quantitativa sugli estratti in etanolo, assieme ad una retta di taratura della soluzione, per valutarne la

⁴⁴ Il coefficiente di assorbimento molare rappresenta l'assorbanza specifica di una soluzione a concentrazione molare unitaria, ad una data lunghezza d'onda, attraverso una cella di lunghezza ottica unitaria (in genere espressa in centimetri) [130].

concentrazione. L'utilizzo della retta di taratura sarà meglio esplicitato nel paragrafo "Estrazione in etanolo".

Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X è una tecnica analitica rapida e non distruttiva grazie alla quale è possibile determinare la struttura cristallina di un materiale; fornisce inoltre informazioni riguardo le dimensioni delle celle cristalline [234] [235].

La diffrazione di raggi X si basa sull'interferenza costruttiva di raggi X monocromatici con un campione cristallino. I raggi X sono generati da un catodo, filtrati per produrre radiazione monocromatica, orientati per concentrarli e diretti verso il campione [234] [235]. L'interazione dei raggi incidenti con il campione produce interferenza costruttiva (e un raggio diffratto) quando le condizioni soddisfano la legge di Bragg (Equazione (9)).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (9)$$

Questa legge correla la lunghezza d'onda λ della radiazione elettromagnetica con l'angolo di diffrazione θ e la spaziatura tra i piani cristallini paralleli d ; n è un numero intero, detto ordine della diffrazione [235]. La condizione di interferenza costruttiva è schematizzata nella Figura 5.2.2.

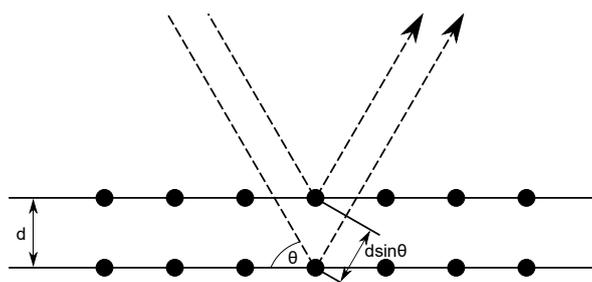


Figura 5.2.2. Interferenza costruttiva.

I raggi X diffratti vengono rilevati e rielaborati. Scansionando il campione su un range di angoli 2θ è possibile coprire tutte le direzioni di diffrazione del cristallo possibili [234] [235]. La conversione dei picchi di diffrazione in distanze tra i piani cristallini consente l'identificazione del materiale, dal momento che ogni materiale possiede distanze tra i piani cristallini caratteristiche. Tipicamente, si ottiene questo risultato confrontando le distanze ottenute con dei riferimenti standard [234] [235].

Strumentazione e procedura

Il diffrattometro utilizzato è X'PERT3 Panalytical. I raggi X vengono emessi da un anodo in rame, con lunghezza d'onda $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$. Lo strumento opera con tensione di 40 kV e corrente di 40 mA.

Per effettuare una analisi XRD del campione, lo si macina finemente con un pestello. Nel caso di materiali mesoporosi e mesostrutturati, l'analisi viene effettuata su due differenti range angolari: l'analisi a bassi angoli consente di verificare la presenza di un ordine a lungo raggio dovuto alla mesostruttura, mentre l'analisi ad alti angoli permette di valutare se il materiale sia amorfo o cristallino (ciò è particolarmente importante, come visto, nel caso di materiali utilizzati come *carrier* di principi attivi) [236].

Di seguito vengono indicati i parametri impostati sullo strumento per l'analisi dei campioni:

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

I risultati dell'analisi XRD sono rappresentati in un grafico "Intensità vs. Angolo di diffrazione".

Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia IR è una tecnica spettroscopica utilizzata in chimica organica per identificare le sostanze presenti in un campione [130]. Tale tecnica si basa sull'interazione fra la materia e la luce di frequenza nella "regione infrarossa vibrazionale". In questa regione, la radiazione è comunemente identificata attraverso il numero d'onda ν (detto anche, in maniera impropria, frequenza), per definizione l'inverso della lunghezza d'onda (Equazione (10)).

$$\nu = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} = \frac{10^{-2}(\text{m} \cdot \text{cm}^{-1})}{\lambda(\text{m})} \quad (10)$$

Il numero d'onda è espresso in cm^{-1} ; la regione vibrazionale si estende da 4000 a 600 cm^{-1} [130].

La radiazione IR, colpendo il campione, fa incrementare l'energia vibrazionale delle molecole che la assorbono. Gli atomi legati sono caratterizzati da una distanza di legame di equilibrio, ma si allontanano e si avvicinano "vibrando" sulle loro posizioni; ciascuna molecola può perciò essere trattata come un oscillatore armonico, dove le vibrazioni possono essere di stiramento (*stretching*) del legame o di deformazione dell'angolo di legame (*bending*) [130].

Un grande numero n di atomi costituisce un "circuito" di oscillatori: i gruppi funzionali, anche se ogni molecola ha stato vibrazionale specifico, vibrano approssimativamente sempre alla stessa maniera. Si può dunque considerare i gruppi funzionali e, in generale, specifici aggregati di atomi come "staccati dal circuito" e sfruttare questa loro proprietà per identificare i composti [130]. I dati relativi alle frequenze caratteristiche di assorbimento dei gruppi funzionali sono raccolti in tabelle chiamate tavole di correlazione; solitamente sono utili gli assorbimenti per $\nu > 1500 \text{ cm}^{-1}$, ossia quelli più a sinistra nello spettro infrarosso [130].

Generalmente, si utilizza una strumentazione in grado di registrare l'assorbanza del campione per differenti numeri d'onda nel tempo; il risultato così ottenuto viene poi elaborato mediante una trasformata di Fourier, in modo da ottenere l'andamento dell'assorbanza nel dominio delle frequenze. Per questa ragione, la tecnica viene detta spettroscopia FT-IR [237].

In un tipico spettro FT-IR è possibile identificare due regioni:

- Regione dei gruppi funzionali, tra 4000 e 1500 cm^{-1} : è la regione più utile per identificare i gruppi funzionali presenti nel campione. Può essere distinta a sua volta in tre regioni [237]:
 - Regione dello stiramento X-H (tra 4000 e 2500 cm^{-1});
 - Regione dei tripli legami (tra 2500 e 2000 cm^{-1});
 - Regione dei doppi legami (tra 2000 e 1500 cm^{-1}).
- Regione delle impronte digitali, tra 1500 e 600 cm^{-1} : in questa regione sono presenti bande originate dalla vibrazione della molecola nella sua interezza [130] [237].

Strumentazione e procedura

Lo strumento utilizzato per la spettroscopia FT-IR è lo spettrofotometro Equinox 55 Bruker. L'analisi FT-IR viene utilizzata come tecnica qualitativa per identificare i gruppi funzionali presenti nel campione. Il risultato di ciascuna analisi è rappresentato in un grafico "Assorbanza vs. Numero d'onda", nel quale i valori dell'asse delle ascisse sono riportati in ordine inverso per convenzione. In una tipica analisi FT-IR, il campione viene ridotto in polvere fine e miscelato con KBr per diluirlo (il bromuro di potassio è un solido ionico ed è perciò trasparente agli IR [11]); generalmente si effettua una miscela 1:1 dei due componenti, al fine di ridurre l'intensità dei picchi ed evitare la saturazione del detector dello strumento. La miscela di campione e KBr è dunque ridotta ad una pastiglia di alcuni mg mediante una pressa idraulica; è poi inserita all'interno di un portacampione in lamina d'oro. Il portacampione è introdotto in una cella trasparente alla radiazione infrarossa. Le misure vengono effettuate sia a pressione atmosferica sia sottovuoto, grazie al sistema di vuoto connesso alla cella; la misura sottovuoto è necessaria per eliminare dallo spettro i picchi dovuti all'umidità atmosferica.

5.2.3. Estrazione in etanolo

La curcumina ha scarsa solubilità in ambiente acquoso, mentre è molto solubile in solventi organici come l'etanolo [8]: si è scelto perciò, al fine di valutare la quantità di curcumina presente nei materiali sintetizzati, di procedere con l'estrazione in etanolo del materiale. Per ciascun campione si è disciolto qualche mg di polvere in 15 g di etanolo; l'estrazione è stata mantenuta per 5 ore, al termine delle quali il campione è stato sottoposto ad ultrasuoni. Sono stati registrati spettri UV-VIS del campione a 15 minuti, 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 3 ore e 5 ore dall'inizio dell'estrazione, e uno spettro dopo il trattamento agli ultrasuoni; per gli spettri UV-VIS si sono effettuate misure in triplicato delle quali si riportano i valori medi, come indicato in precedenza. Lo strumento utilizzato per registrare gli spettri UV-VIS è il medesimo indicato nel Paragrafo "Spettroscopia UV-VIS". I risultati delle estrazioni sono stati interpretati utilizzando una retta di taratura della curcumina in etanolo ottenuta in lavori precedenti [238]. Attraverso la retta di taratura è possibile associare all'assorbanza dell'estratto a 425 nm la quantità di curcumina presente (il massimo di assorbanza della curcumina in etanolo si trova infatti a 425 nm [8]).

Capitolo 6

Prima sintesi da materie prime (HYBRID_RAW_1) e da filtrato (HYBRID_FILTRATE_1)

6.1. Sintesi HYBRID_RAW_1

La sintesi HYBRID_RAW_1 viene realizzata da materie prime pure, seguendo il procedimento già descritto nel Capitolo 5. La sintesi HYBRID_RAW_1 fornisce 714 mg di materiale finito (Figura 6.1.1) e 76 g di filtrato, di colore rosso scuro e contenente curcumina.



Figura 6.1.1. Sintesi HYBRID_RAW_1 macinata.

Il filtrato di HYBRID_RAW_1 viene conservato al buio; la sintesi HYBRID_FILTRATE_1 viene effettuata il giorno successivo, aggiungendo i reagenti necessari per consumare tutta la curcumina presente. Il procedimento seguito per la sintesi HYBRID_FILTRATE_1 è schematizzato in Figura 6.1.2; i reagenti da aggiungere al filtrato sono stati calcolati secondo la procedura descritta nel paragrafo seguente.

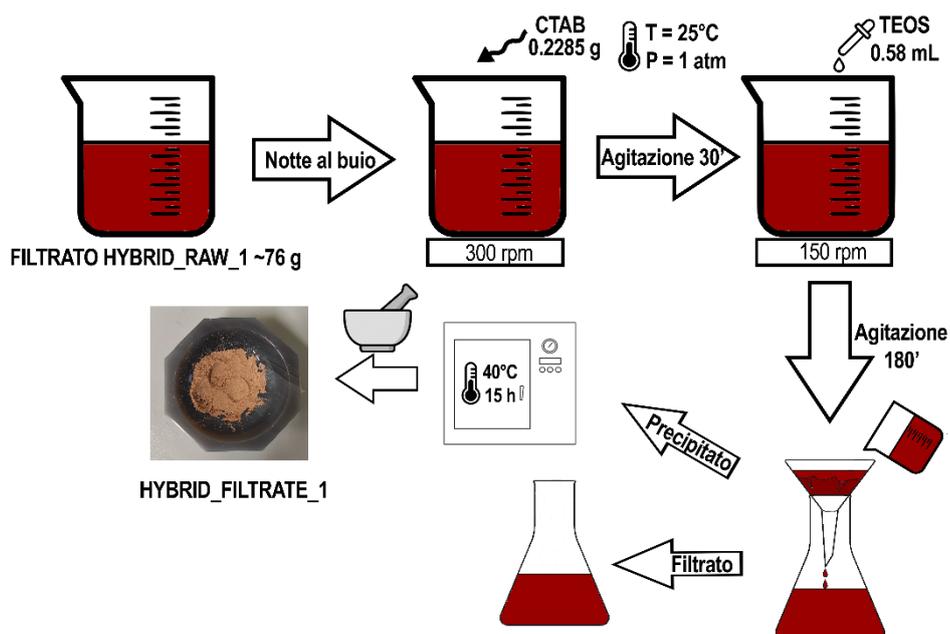


Figura 6.1.2. Schema della sintesi HYBRID_FILTRATE_1.

6.2. Calcolo dei reagenti necessari per la sintesi HYBRID_FILTRATE_1

Per ragioni di tempo, il calcolo dei reagenti necessari è effettuato a partire dalla caratterizzazione di una sintesi precedente [239], effettuata con i medesimi rapporti stechiometrici di HYBRID_RAW_1 e denominata di seguito REF. La caratterizzazione di tale campione solido consente di stimare il quantitativo di reagenti effettivamente consumati per la sintesi. Sottraendo tali quantità a quelle inserite inizialmente nella miscela di reazione (che sono note e vengono riportate nella Tabella 6.2.1) è possibile stimare i reagenti ancora presenti nel filtrato. La sintesi HYBRID_FILTRATE_1 viene realizzata supponendo di utilizzare tutta la curcumina rimanente nel filtrato; i rapporti molari utilizzati sono i medesimi della sintesi REF, corrispondenti alla massima resa in materiale. Tali rapporti sono stati riportati precedentemente nella Tabella 5.2.1.

Tabella 6.2.1. Quantità molari dei reagenti utilizzati per la sintesi REF.

TEOS/mmol	CTAB/mmol	NaOH/mmol	H ₂ O/mmol	Curc/mmol
9.02	1.10	4.75	5270	0.18

La sintesi REF ha fornito 687 mg di solido. Tale campione viene sottoposto a caratterizzazione termogravimetrica al fine di stimare, come già osservato nel Capitolo 5, la quantità di materia organica presente. Sottraendo tale quantitativo alla massa totale del campione è quindi possibile ricavare la massa della silice presente. Fra 150 e 650°C il campione subisce una perdita in massa del 53%: si può ipotizzare, come già osservato, che tale perdita in massa sia dovuta esclusivamente alla degradazione della componente organica del materiale (CTAB e curcumina). Il resto del campione (47% in massa) è dunque costituito esclusivamente da silice. Ciò significa che il campione conterrebbe 323 mg di silice (circa 5.4 mmol, essendo la massa molare della silice 60.08 g/mol [240]).

Di seguito sono riassunti i passaggi di calcolo seguiti (Equazioni (11) e (12)):

Perdita massa tra 150 e 650°C (%) → 53% (degradazione componente organica)
 Resa sintesi → 687 mg

$$\text{mg di silice nel materiale} = 47\% \cdot 687 \text{ mg} = 323 \text{ mg} \quad (11)$$

$$\text{M.W. Silice} \rightarrow 60.08 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \Rightarrow \text{mol di silice} = \frac{323 \text{ mg}}{60.08 \text{ g/mol}} = 5.4 \text{ mmol} \quad (12)$$

Assumendo, ancora, che tutto il TEOS inserito per la sintesi abbia reagito a formare silice, e che non siano stati formati oligomeri di TEOS (come visto nel Capitolo 1, tale approssimazione è accettabile al termine del processo sol-gel), si ricava che 5.4 mmol di TEOS si trovano nel materiale, e rimangono perciò circa 3.6 mmol di TEOS libero nel filtrato (Equazione (13)):

$$\begin{aligned} \text{TEOS nel filtrato} &= \text{TEOS inserito} - \text{TEOS nel materiale} \\ &= 9 \text{ mmol} - 5.4 \text{ mmol} = 3.6 \text{ mmol} \end{aligned} \quad (13)$$

L'estrazione in etanolo, come già visto nel Capitolo 5, consente di stimare il quantitativo di curcumina presente nel materiale. Dall'analisi dei risultati dell'estrazione in etanolo si deduce che la curcumina rappresenta circa il 4% in massa sul totale (circa 27 mg).

Sottraendo questa quantità alla percentuale di materia organica nel solido (53% come ottenuto dall'analisi termogravimetrica), si ricava che il CTA rappresenta il 49% in peso del campione (circa 336.6 mg). La massa molare del CTA è di 284.5 g/mol [241], perciò nel materiale sono presenti 1.1 mol di CTA: tutto il CTAB utilizzato per la sintesi è stato incorporato nel materiale. I passaggi seguiti sono riassunti di seguito (Equazioni (14), (15), (16) e (17)).

$$\text{Curc incorporata} = 4\% \cdot \text{Massa campione} = 4\% \cdot 687 \text{ mg} = 27.5 \text{ mg} \quad (14)$$

$$\text{CTA incorporato} = 49\% \cdot \text{Massa campione} = 49\% \cdot 687 \text{ mg} = 336.6 \text{ mg} \quad (15)$$

$$\text{M.W. CTA} = 284.5 \text{ g/mol} \Rightarrow \text{CTA incorporato} = \frac{336.6 \text{ mg}}{284.5 \text{ g/mol}} = 1.1 \text{ mmol} \quad (16)$$

$$\begin{aligned} \text{CTA nel filtrato} &= \text{CTA inserito} - \text{CTA nel materiale} \\ &= 1.1 \text{ mmol} - 1.1 \text{ mmol} = 0 \text{ mmol} \end{aligned} \quad (17)$$

Dei 65.3 mg di curcumina utilizzati, invece, solamente 27 mg sono stati incorporati nella silice: 38.3 mg si trovano nel filtrato (circa 0.104 mmol, essendo la massa molecolare della curcumina 368.4 g/mol [146]), come mostrato nell'Equazione (18).

$$\begin{aligned} \text{Curc nel filtrato} &= \text{Curc inserita} - \text{Curc nel materiale} \\ &= 65.3 \text{ mg} - 27 \text{ mg} = 38.3 \text{ mg} = 0.104 \text{ mmol} \end{aligned} \quad (18)$$

Il calcolo delle quantità di reagenti necessarie per la sintesi HYBRID_FILTRATE_1 è stato dunque effettuato ipotizzando il completo *recovery* della curcumina presente nel filtrato; i rapporti stechiometrici sono gli stessi utilizzati nella prima sintesi (HYBRID_RAW_1). Nella Tabella 6.2.2 si riportano tali rapporti, normalizzati rispetto al quantitativo di curcumina.

Tabella 6.2.2. Rapporti molari utilizzati per le sintesi HYBRID_RAW_1 e HYBRID_FILTRATE_1.

TEOS	CTAB	NaOH	H ₂ O	Curcumina
50	6.1	26.8	29450	1

I risultati della caratterizzazione del materiale REF mostrano che circa 38.3 mg di curcumina (circa 0.104 mmol) sono presenti nel filtrato di sintesi. Per utilizzare tutta la curcumina presente nel filtrato realizzando la sintesi HYBRID_FILTRATE_1 con i medesimi rapporti molari di HYBRID_RAW_1 (Tabella 6.2.2), è necessario aggiungere al filtrato le quantità di materie prime “fresche” indicate nella Tabella 6.2.3.

Tabella 6.2.3. Quantità teoriche dei reagenti da aggiungere al filtrato di HYBRID_RAW_1.

	TEOS/mL (mmol)	CTAB/g (mmol)	NaOH/g (mmol)	H ₂ O/g (mmol)	Curc/mg (mmol)
Necessari	1.15 (5.2)	0.231 (0.634)	0.111 (2.79)	55.16 (3063)	38.30 (0.104)
Nel filtrato	0.798 (3.6)	0	0.193 (4.75)	95 (5270)	38.30 (0.104)
Da aggiungere	0.354 (1.6)	0.231 (0.634)	0	0	0

6.3. Sintesi HYBRID_FILTRATE_1

6.3.1. Procedimento

La sintesi HYBRID_FILTRATE_1 a partire dal filtrato è effettuata dopo che quest'ultimo è stato conservato per una notte al buio, in maniera tale da ridurre quanto più possibile la fotodegradazione della curcumina presente (della fotodegradazione della curcumina si è parlato nel Capitolo 4). Dopo una notte al buio, il filtrato ha assunto una colorazione aranciata, visibile in Figura 6.3.1.

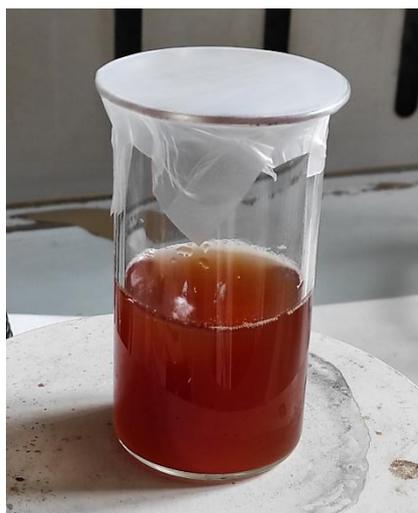


Figura 6.3.1. Filtrato di HYBRID_RAW_1 dopo circa 15 h al buio.

Il filtrato è utilizzato senza pretrattamenti; si aggiungono 0.2285 g di CTAB e, dopo 30 minuti circa di agitazione magnetica, 0.58 mL di TEOS (circa 0.21 mL in più rispetto ai valori teorici calcolati in precedenza, a causa di un errore sperimentale). In seguito, si mantiene la soluzione

in agitazione per 3 ore, la si filtra come descritto in precedenza e si lava il precipitato per due volte con aliquote da 30 mL di acqua distillata per ciascun lavaggio. Il precipitato ottenuto è fatto asciugare in stufa a 40 °C. Questo procedimento è riassunto in Figura 6.1.2.

6.3.2. Risultati e caratterizzazione

La sintesi HYBRID_FILTRATE_1 fornisce 379.1 mg di solido (Figura 6.3.2).



Figura 6.3.2. HYBRID_FILTRATE_1 macinata.

Il campione solido HYBRID_FILTRATE_1 presenta colorazione debolmente rosata. Su questo campione si effettuano analisi XRD, FT-IR e ATG; il filtrato di HYBRID_FILTRATE_1, di colore giallo paglierino (Figura 6.3.3) è analizzato con spettroscopia UV-VIS. Il campione solido di HYBRID_FILTRATE_1 è inoltre sottoposto a estrazione in etanolo. I risultati delle caratterizzazioni verranno presentati nei paragrafi seguenti.

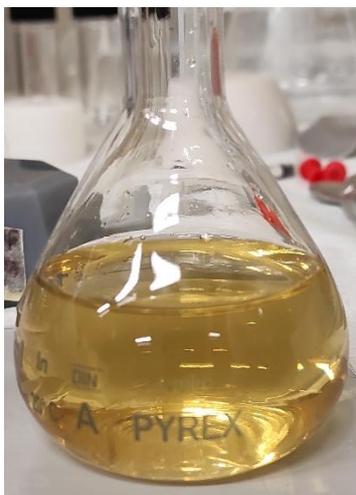


Figura 6.3.3. Filtrato sintesi HYBRID_FILTRATE_1.

Analisi ATG

L'analisi termogravimetrica del campione consente di stimare il contenuto di curcumina presente nel materiale, come già osservato nel Capitolo 5. I risultati sono mostrati in Figura 6.3.4 e nella Tabella 6.3.1:

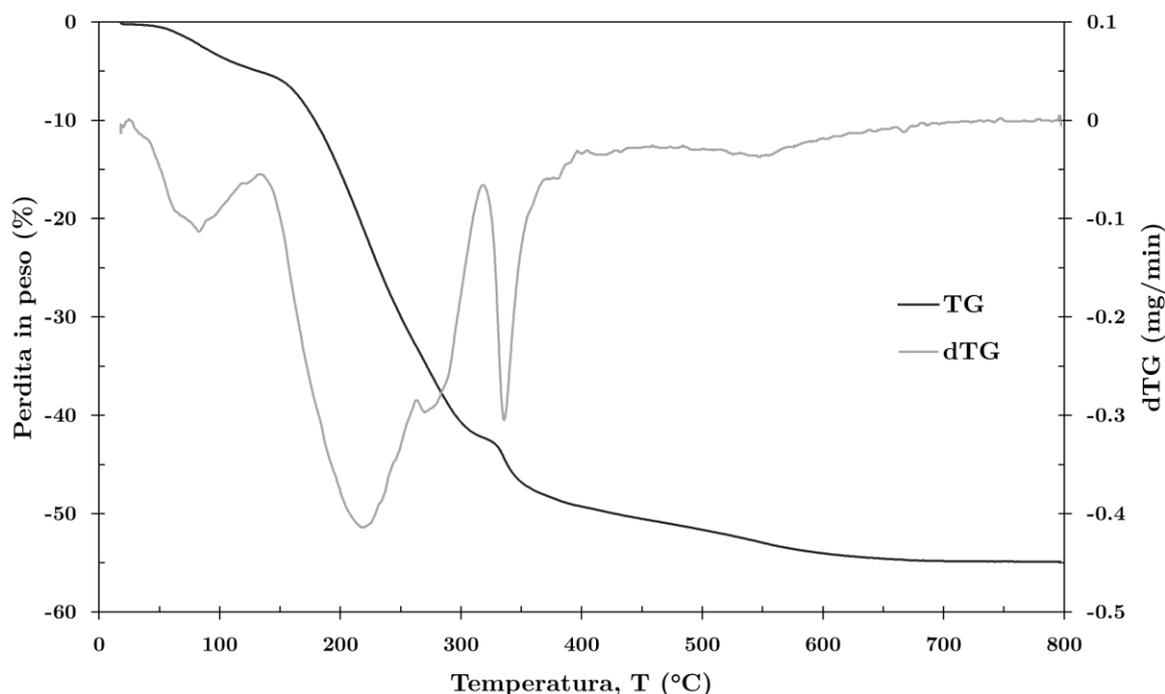


Figura 6.3.4. Curve TG e dTG relative alla sintesi HYBRID_FILTRATE_1.

Tabella 6.3.1. Risultati analisi termogravimetrica della sintesi HYBRID_FILTRATE_1.

Massa iniziale /mg	Massa finale /mg	Perdita totale /%	Perdita senza acqua /%
12.512	5.646	-54.9	-49.0

Una prima perdita in massa tra 0 e 150°C (circa il 5%) si suppone dovuta alla perdita dell'acqua fisiosorbita. Si osserva, tra 150 e 450°C, la massima perdita in massa (45% circa); questa è dovuta presumibilmente a 3 meccanismi: degradazione del CTA, degradazione della curcumina (se presente), deidrossilazione e perdita dei silanoli [146] [241] [242]. Oltre i 650°C non si verifica più perdita di massa. Sebbene il profilo TG del campione sia confrontabile con quanto ottenuto in lavori precedenti [238, 239], la perdita in massa complessiva risulta leggermente inferiore, anche se la differenza può essere dovuta alle incertezze intrinseche alla misura. La perdita di massa dovuta all'eventuale presenza di curcumina non può essere dissociata da quella causata dal CTA, quindi la presenza della curcumina deve essere verificata con ulteriori caratterizzazioni.

Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia FT-IR viene utilizzata per identificare i gruppi funzionali presenti nel campione e, conseguentemente, verificare la presenza di curcumina e CTA nel solido ottenuto. In Figura 6.3.5 e Figura 6.3.6 sono mostrati gli spettri FT-IR caratteristici della curcumina e del CTAB, rispettivamente: i picchi nella regione relativa allo *stretching* degli anelli aromatici, attorno a 1600 cm^{-1} [243] [244], vengono utilizzati per il riconoscimento della curcumina, essendo gli altri picchi molto vicini a quelli caratteristici del CTAB.

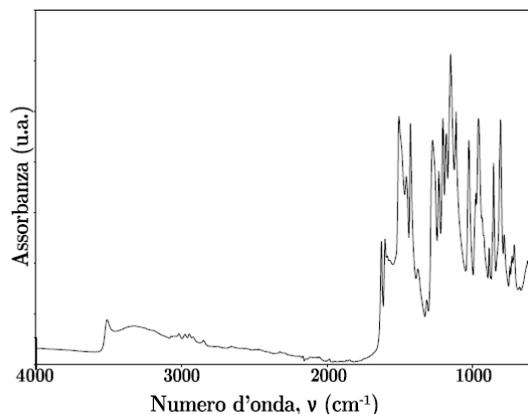


Figura 6.3.5. Spettro FT-IR della curcumina pura [245].

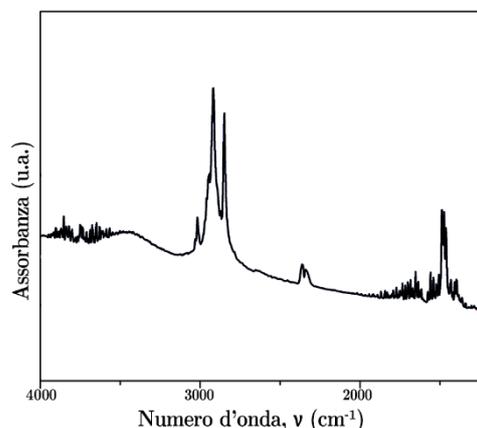


Figura 6.3.6. Spettro FT-IR del CTAB [246].

Dall'analisi del campione HYBRID_FILTRATE_1 si ottengono gli spettri di assorbimento mostrati in Figura 6.3.7.

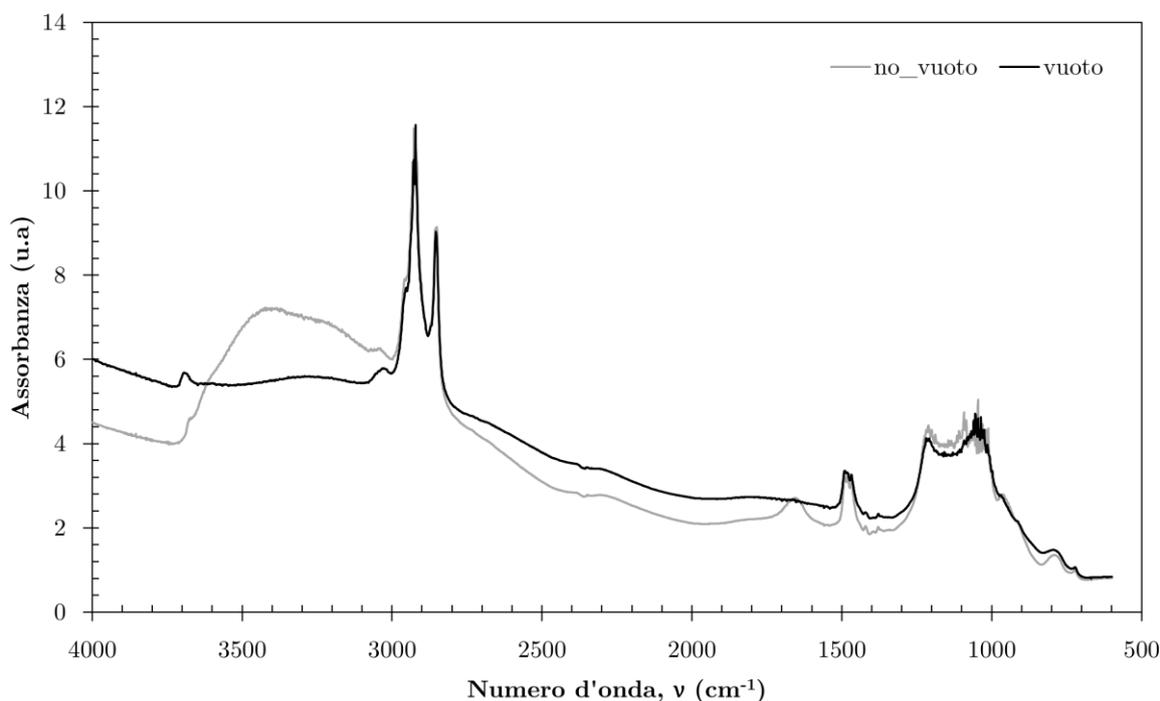


Figura 6.3.7. Spettro FT-IR di HYBRID_FILTRATE_1 in vuoto e a pressione atmosferica.

La banda di assorbimento presente fra 3500 e 3000 cm^{-1} non è presente nello spettro sottovuoto e viene perciò imputata alla presenza di acqua fisiosorbita; lo stesso si può dire riguardo alla banda a 1650 cm^{-1} , assegnabile alla vibrazione di *bending* delle molecole d'acqua fisiosorbite.

Nello spettro non si distingue la banda tipica della curcumina nella regione di *stretching* degli anelli aromatici.

Tuttavia, il colore rosato della polvere indica la presenza di un cromoforo, che potrebbe essere dovuto ad una quantità minima di curcumina (sotto la soglia di sensibilità dello FTIR) o ad un prodotto di degradazione (degradazione in corrispondenza dell'anello aromatico) della curcumina; la presenza di prodotti di degradazione deve essere tuttavia verificata con altre caratterizzazioni.

Si evidenziano alcuni picchi tipici del tensioattivo, in particolare quelli relativi allo *stretching* del legame C-H, confrontati in Figura 6.3.8 con analoghi di letteratura [247].

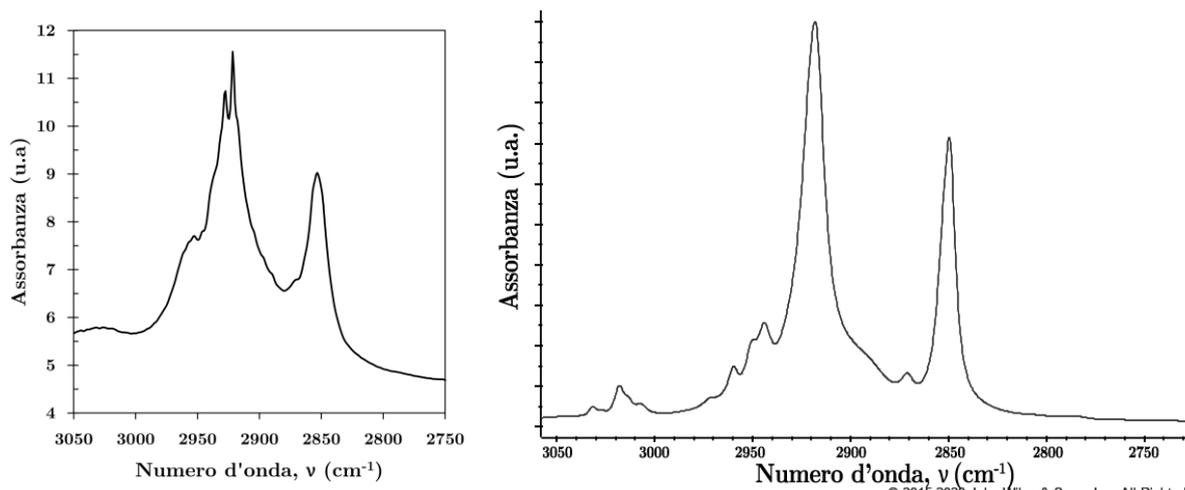


Figura 6.3.8. Confronto picchi caratteristici delle vibrazioni del legame C-H fra campione HYBRID_FILTRATE_1 (a sinistra) e un analogo di letteratura (a destra) [247].

Diffrazione a raggi X

Di seguito vengono presentati i risultati dell'analisi diffrattometrica a raggi X, realizzata per valutare l'ordine della mesostruttura come già osservato nel Capitolo 5. In Figura 6.3.9 è mostrato lo spettro ad alti angoli di HYBRID_FILTRATE_1: l'assenza di picchi ben risolti indica che il campione ha struttura amorfa.

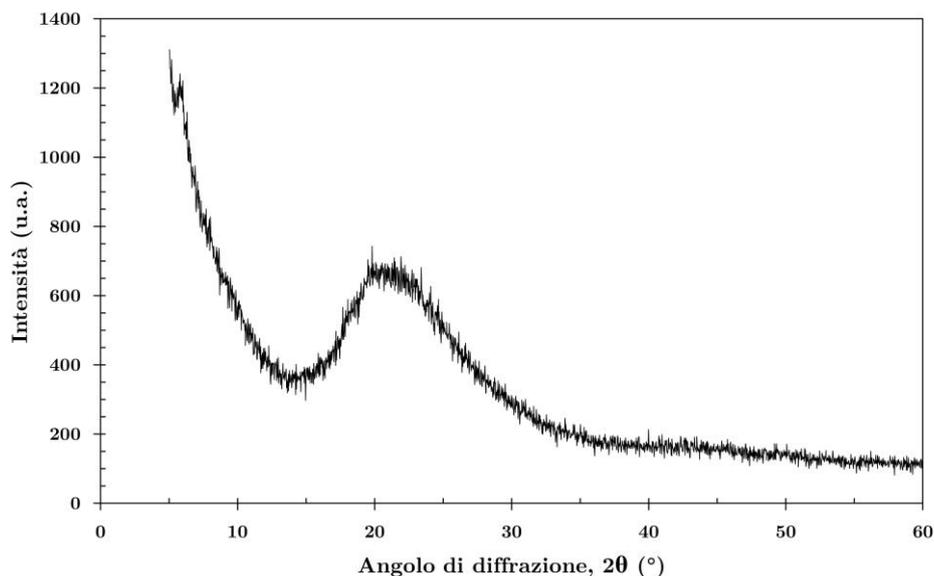


Figura 6.3.9. Spettro XRD ad alti angoli di HYBRID_FILTRATE_1.

Lo spettro a bassi angoli in Figura 6.3.10 mostra un picco ben risolto intorno a 2.2 (2θ) e due picchi poco risolti intorno a 3.8 e 4 (2θ); è inoltre presente un debole segnale mal definito a 6 (2θ). Si tratta di picchi tipici delle MCM-41, leggermente traslati verso angoli più alti rispetto ai valori presenti in letteratura [231] [248] [249]. La scarsa risoluzione di questi picchi fa supporre che il materiale sia poco ordinato a lungo raggio. Il risultato sarebbe in linea con quanto osservato da Chiang *et al.* [250]: l'eccesso di TEOS potrebbe aver determinato la formazione di una struttura con basso ordine.

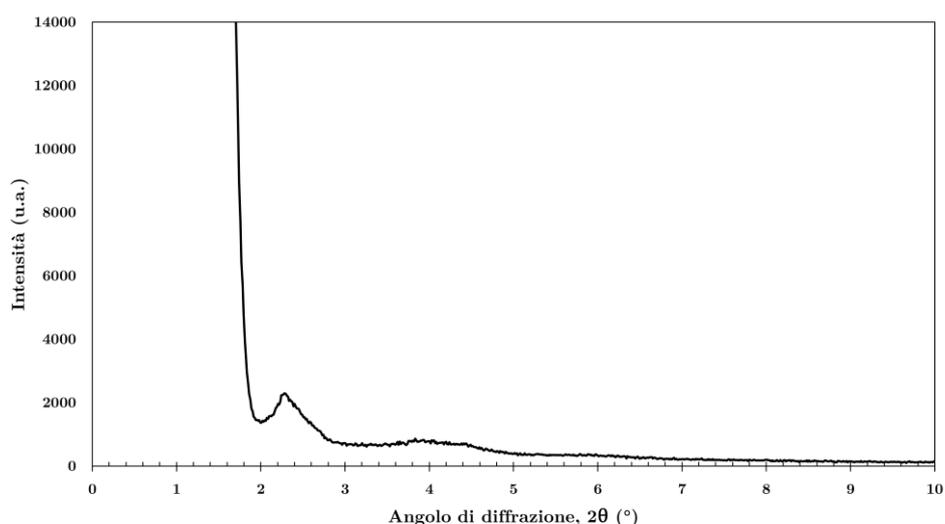


Figura 6.3.10. Spettro XRD a bassi angoli di HYBRID_FILTRATE_1.

Estrazione in etanolo

L'estrazione in etanolo di HYBRID_FILTRATE_1 viene effettuata secondo le modalità già indicate nel Capitolo 5. Al termine delle 5 ore di estrazione e dopo un passaggio agli ultrasuoni, la soluzione di etanolo appare come in Figura 6.3.11.



Figura 6.3.11. Campione HYBRID_FILTRATE_1 estratto in etanolo dopo 5 ore.

L'aspetto trasparente della soluzione fa supporre che non sia stata estratta curcumina; l'estratto tal quale viene analizzato con spettroscopia UV-VIS. I risultati ottenuti sulla soluzione dopo 5 ore dall'inizio dell'estrazione sono mostrati in Figura 6.3.12. L'assenza del picco caratteristico della curcumina in etanolo, a 425 nm secondo Priyadarsini [8], conferma quanto già ipotizzato in base ai risultati della spettroscopia FT-IR sul campione (paragrafo Spettroscopia FT-IR): la curcumina presente nel filtrato di HYBRID_RAW_1 non è stata incorporata nel campione.

Si osserva una banda poco sopra 200 nm, riconducibile al CTA secondo lavori precedenti [238], e tre assorbimenti a lunghezze d'onda maggiori. Un primo, definito, è visibile a circa 240 nm, gli altri due compaiono come spalle a circa 290 nm e 340 nm. La spalla a 290 nm è assegnabile al CTA, secondo i risultati ottenuti in lavori precedenti [238]. Gli altri assorbimenti sono attribuiti al prodotto di degradazione della curcumina.

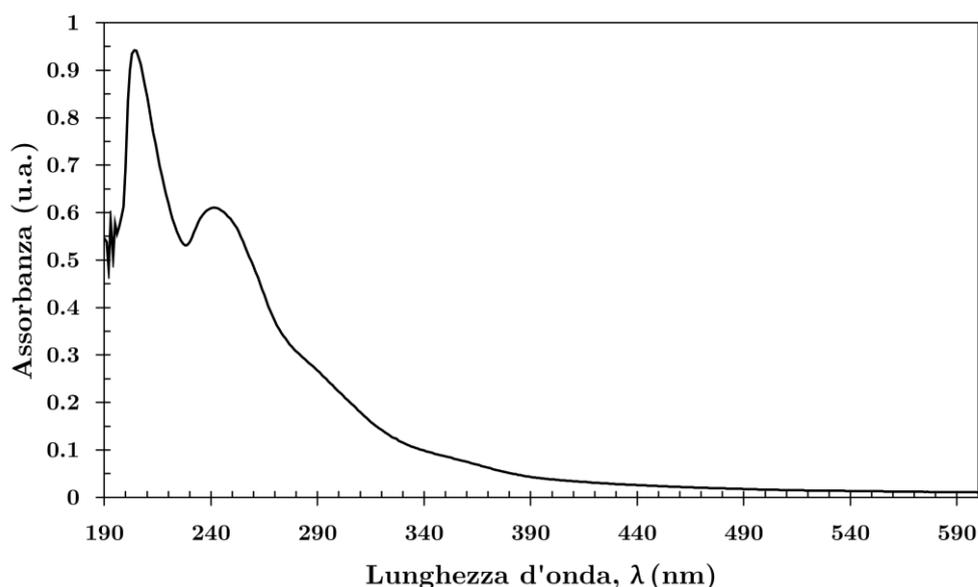


Figura 6.3.12. Spettro UV-VIS dell'estratto di HYBRID_FILTRATE_1 dopo 5 ore.

Spettroscopia UV-VIS sul filtrato

La spettroscopia UV-VIS sul filtrato di HYBRID_FILTRATE_1 è effettuata per identificare i cromofori presenti; come “bianco” si utilizza una soluzione di NaOH 0.05 M (in quanto questa corrisponde alla soluzione acquosa nella quale avviene la sintesi). I risultati dell’analisi effettuata sul filtrato non diluito sono mostrati in Figura 6.3.13.

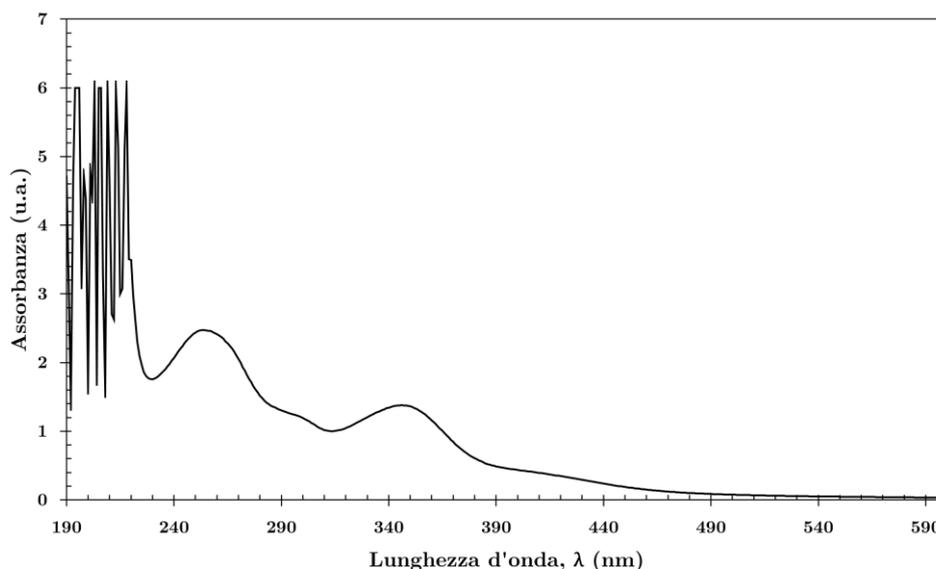


Figura 6.3.13. Spettro UV-VIS del filtrato di HYBRID_FILTRATE_1.

Lo spettro UV-VIS non presenta il picco caratteristico intorno a 462-465 nm [8] della curcumina deprotonata in soluzioni basiche: il filtrato, perciò, non contiene curcumina; il suo colore giallo paglierino fa presupporre la presenza di prodotti di degradazione cromofori [251]. Goel *et al.* [149] hanno osservato che la curcumina si degrada completamente in 1-2 ore quando è disciolta in una soluzione 0.1 M di NaOH; il filtrato di HYBRID_FILTRATE_1 è stato ottenuto il giorno precedente l’analisi, perciò è ragionevole pensare che la curcumina si sia degradata durante la conservazione in ambiente basico. Si evidenziano due bande intorno a 250 nm e 350 nm, rispettivamente, attribuibili al prodotto della degradazione della curcumina. La spalla intorno a 290-300 nm è imputabile al CTA.

Osservazioni

La sintesi HYBRID_FILTRATE_1 ha fornito un materiale con scarso ordine a lungo raggio; la curcumina non è stata incorporata nel materiale finito, probabilmente perché degradata ancor prima della sintesi (come suggerito dall’analisi UV-VIS sul filtrato in Figura 6.3.13). Il processo deve essere perciò ottimizzato su due fronti:

- È necessario modificare l’iter di sintesi, in maniera tale da ridurre al minimo la degradazione della curcumina in ambiente basico e consentire il *loading* nelle particelle di silice;
- Può essere utile ragionare sui rapporti molari utilizzati, che differiscono rispetto a quelli della sintesi da materie prime per ciò che riguarda i quantitativi di NaOH e acqua presenti (Tabella 6.3.2; il calcolo dei rapporti molari è stato effettuato considerando una perdita di circa il 25% di NaOH e acqua iniziali a causa delle operazioni di filtraggio necessarie per la separazione del precipitato).

Tabella 6.3.2. Confronto tra i rapporti molari effettivi di HYBRID_RAW_1 e quelli di HYBRID_FILTRATE_1.

Campione	TEOS	CTABr	NaOH	H ₂ O	Curcumina
HYBRID_FILTRATE_1	1	0.103	0.776	848	0.02
HYBRID_RAW_1	1	0.122	0.536	589	0.02

L'utilizzo dell'intero filtrato ha determinato una generale diluizione del preparato di reazione insieme ad un incremento del quantitativo di NaOH rispetto a quello di curcumina e di TEOS; i due fattori potrebbero aver contribuito alla struttura poco ordinata del campione e alla rapida degradazione della curcumina.

Cai *et al.* [228] hanno realizzato delle sintesi di silici mesoporose in condizioni blande, utilizzando i seguenti rapporti molari riferiti al TEOS ed ottenendo delle silici ordinate di tipo MCM-41.

Tabella 6.3.3. Rapporti molari della sintesi 19 di Cai *et al.* [228], che fornisce silici MCM-41 ordinate.

TEOS	CTABr	NaOH	H ₂ O
1	0.125	0.32	1221

I rapporti molari sono simili a quelli utilizzati per la HYBRID_FILTRATE_1, fatta eccezione per il quantitativo di NaOH più che doppio in HYBRID_FILTRATE_1. La diluizione del preparato di sintesi di HYBRID_FILTRATE_1 rispetto a quello di HYBRID_RAW_1, tuttavia, fa sì che il rapporto NaOH/H₂O si mantenga pressappoco il medesimo delle sintesi da materie prime e che, perciò, l'eccesso di NaOH non determini variazioni di pH.

Per quanto riguarda la degradazione della curcumina nel filtrato, Wang *et al.* [155] hanno osservato che l'utilizzo di micelle di tensioattivo potrebbe stabilizzarla, anche in soluzioni basiche: tale ipotesi sarà alla base delle scelte effettuate per la sintesi HYBRID_FILTRATE_2, descritta nel Capitolo 7.

Capitolo 7

Seconda sintesi da filtrati (HYBRID_FILTRATE_2)

7.1. Procedimento

La sintesi HYBRID_FILTRATE_2 è realizzata a partire dal filtrato della sintesi HYBRID_RAW_2. La sintesi HYBRID_RAW_2 è stata effettuata a partire da materie prime, in maniera esattamente identica alla sintesi HYBRID_RAW_1, e ha fornito 698.6 mg di solido e 74.5 g di filtrato. Il filtrato di HYBRID_RAW_2, denominato HYBRID_RAW_2_fil, presenta colorazione arancione intenso (Figura 7.1.1). Si è analizzato HYBRID_RAW_2_fil con spettroscopia UV-VIS e si è poi aggiunto il CTAB necessario per “proteggere” la curcumina dalla degradazione (come già osservato nel Capitolo 6).



Figura 7.1.1. HYBRID_RAW_2_fil appena ottenuto.

Il preparato è stato mantenuto in agitazione magnetica per circa 45 minuti e conservato al buio per una notte. Lo spettro UV-VIS sul filtrato di HYBRID_RAW_2, effettuato sul campione diluito 1:20 con NaOH 0.05 M, è mostrato in Figura 7.1.2.

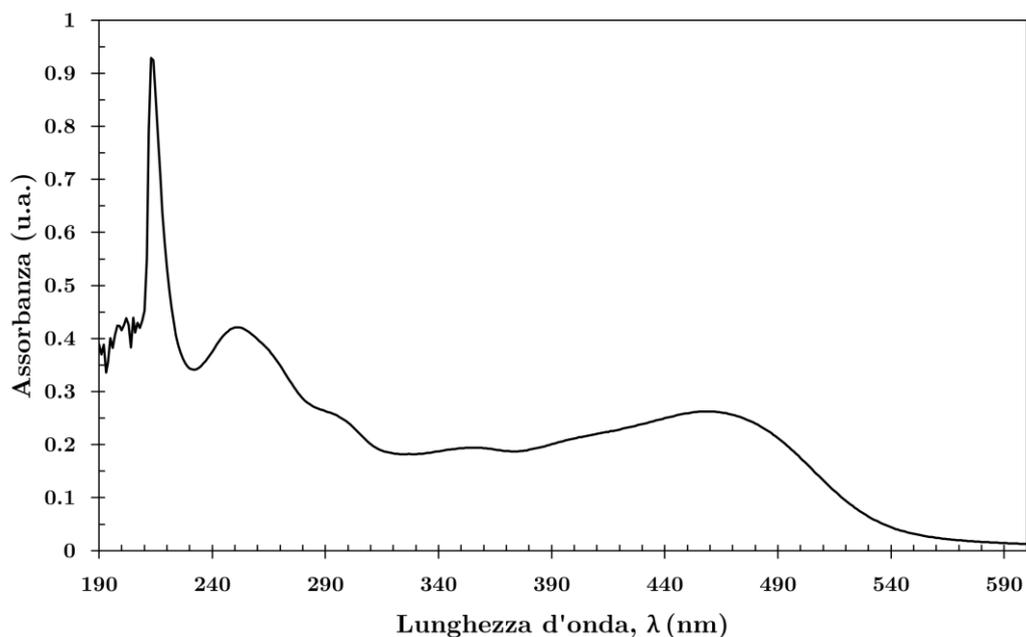


Figura 7.1.2. Spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil diluito 1:20 con NaOH 0.05 M.

Lo spettro UV-VIS del filtrato di HYBRID_RAW_2 presenta un picco piuttosto evidente intorno a 460 nm, indice della presenza di curcumina deprotonata come già osservato nel Capitolo 4. È quindi ragionevole procedere con la sintesi a partire da filtrato.

Dopo una notte di conservazione al buio, il filtrato appare poco omogeneo e sul fondo si intravede una certa quantità di precipitato (Figura 7.1.3).

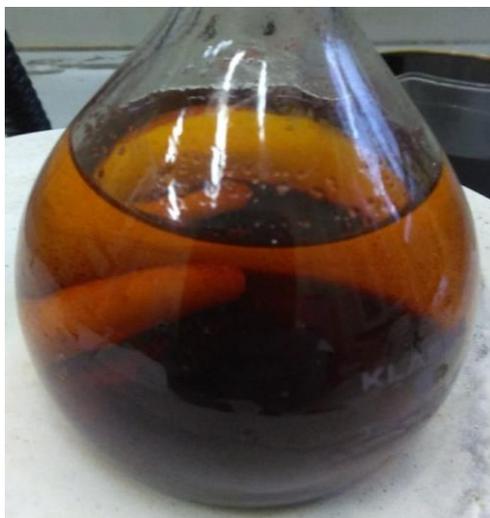


Figura 7.1.3. Filtrato della sintesi HYBRID_RAW_2 dopo una notte di conservazione al buio.

Parte di questo campione (diluito 1:20 con NaOH 0.05 M), denominato HYBRID_RAW_2_fil_1D, è analizzata con spettroscopia UV-VIS. Il risultato dell'analisi è mostrato in Figura 7.1.4.

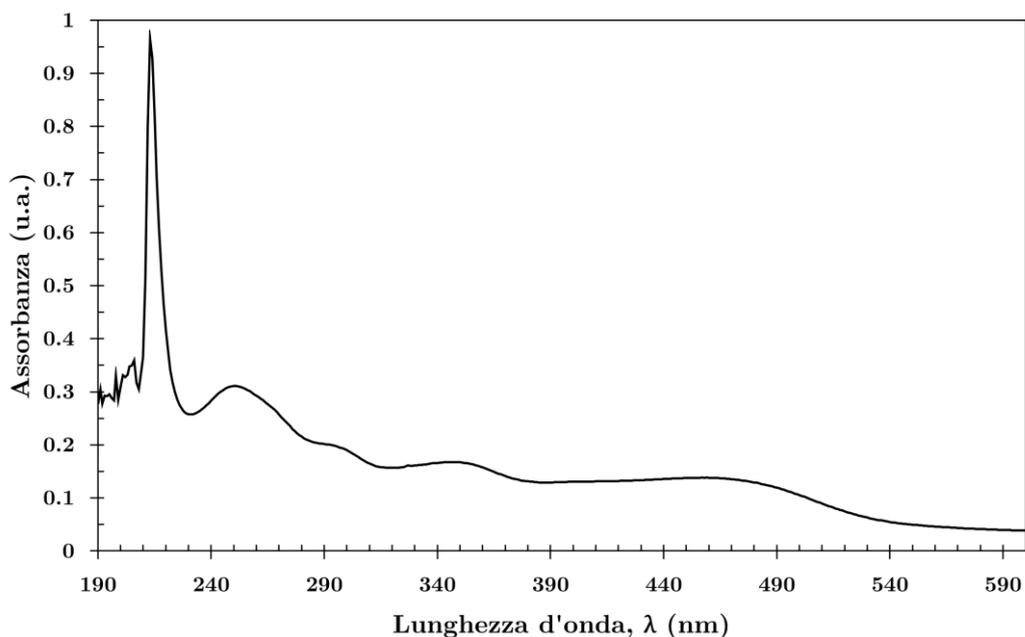


Figura 7.1.4. Spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil_1D diluito 1:20 con NaOH 0.05 M.

Come evidente dalla riduzione dell'ampiezza del picco a 460 nm, probabilmente parte della curcumina è andata incontro a degradazione; si procede con la sintesi HYBRID_FILTRATE_2, per valutare se la curcumina rimasta può essere incorporata nel materiale.

Differentemente dalla sintesi HYBRID_FILTRATE_1, nella sintesi HYBRID_FILTRATE_2 si tiene conto del volume ridotto del filtrato rispetto alla soluzione di sintesi iniziale: in media, le sintesi precedenti hanno fornito un volume di filtrato che è circa il 25% inferiore rispetto al volume di soluzione iniziale (circa 75 mL di filtrato da 95 mL di soluzione iniziale). Dal momento che, perciò, circa il 25% di acqua e NaOH sono stati “perduti” con il filtraggio, anche le quantità da aggiungere degli altri reagenti dovranno essere ridotte allo stesso modo. Nella Tabella 7.1.1 si riporta, per chiarezza, la composizione molare di HYBRID_RAW_2_fil ipotizzata (tenendo conto di quest'ultima assunzione): si è ammesso che anche per HYBRID_RAW_2_fil i quantitativi di reagenti rimasti nel filtrato fossero approssimativamente gli stessi ricavati dalla sintesi REF (Capitolo 6).

Tabella 7.1.1. Composizione di HYBRID_RAW_2_fil ipotizzata.

TEOS/mmol	CTAB/mmol	NaOH/mmol	H ₂ O/mmol	Curcumina/mmol
3.6	0	3.75	4139	0.104

Le Equazioni (19) e (20) consentono di calcolare le quantità di reagenti da aggiungere (calcolate secondo il procedimento riportato al Paragrafo 6.2), ridotte come appena esposto:

$$\begin{aligned}
 \text{mL}_{\text{TEOS}} \text{ per } 74.5 \text{ mL} &= \frac{\text{mL}_{\text{TEOS}} \text{ per } 95 \text{ mL} \cdot 74.5 \text{ mL}}{95 \text{ mL}} \\
 &= \frac{0.34 \text{ mL} \cdot 74.5 \text{ mL}}{95 \text{ mL}} = 0.27 \text{ mL}
 \end{aligned}
 \tag{19}$$

$$g_{\text{CTAB}} \text{ per } 74.5 \text{ mL} = \frac{g_{\text{CTAB}} \text{ per } 95 \text{ mL} \cdot 74.5 \text{ mL}}{95 \text{ mL}} = \frac{0.231 \text{ g} \cdot 74.5 \text{ mL}}{95 \text{ mL}} \quad (20)$$

$$= 0.180 \text{ g}$$

La Tabella 7.1.2 riassume le quantità effettive di reagenti aggiunte a HYBRID_RAW_2_fil_1D.

Tabella 7.1.2. Quantità di reagenti aggiunte a HYBRID_RAW_2_fil_1D.

TEOS/mL	CTAB/g
0.27	0.1796

Come anticipato, il CTAB viene aggiunto non appena si ottiene il filtrato (HYBRID_RAW_2_fil). Dopo una notte si aggiunge anche il TEOS al filtrato (ora identificato come HYBRID_RAW_2_fil_1D) e si lascia la soluzione in agitazione magnetica per circa 3 ore. La soluzione viene filtrata con una pompa ad acqua; il precipitato di HYBRID_FILTRATE_2 viene lavato due volte e asciugato in stufa a 40 °C per una notte. Il procedimento utilizzato per la sintesi HYBRID_FILTRATE_2 viene riassunto in Figura 7.1.5.

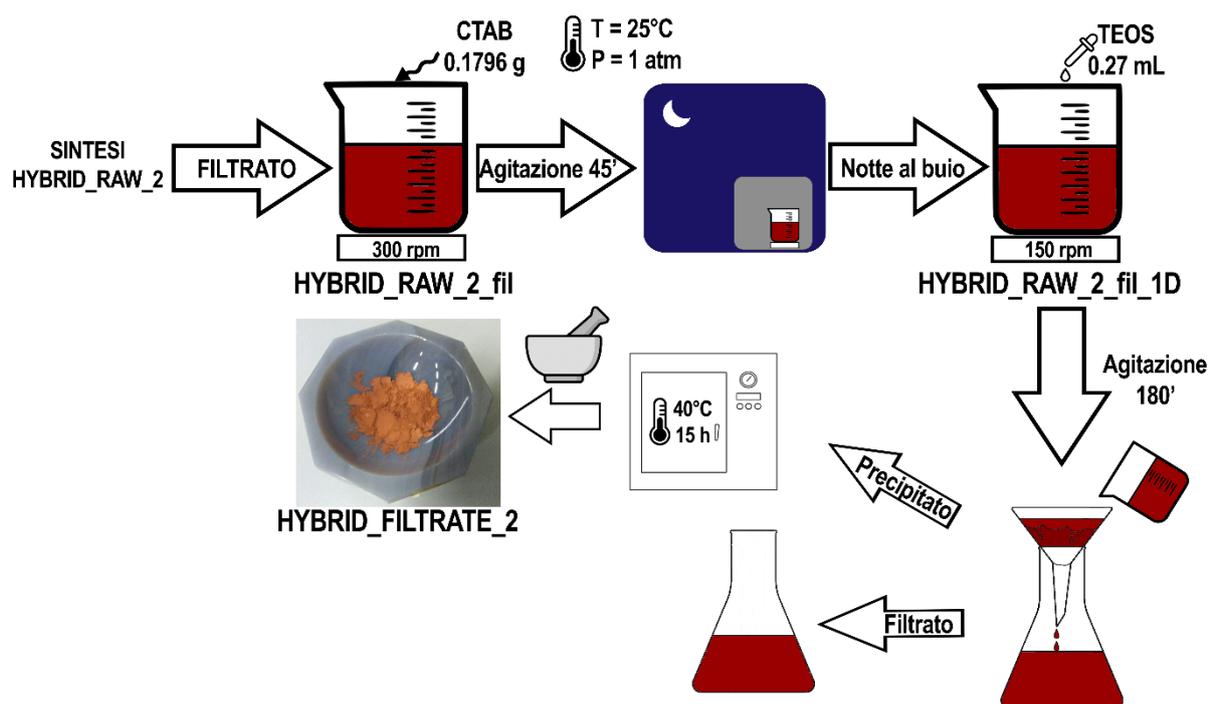


Figura 7.1.5. Schema della sintesi HYBRID_FILTRATE_2.

7.1.1. Osservazioni

In Figura 7.1.6 è mostrato il confronto tra gli spettri di HYBRID_RAW_2_fil e HYBRID_RAW_2_fil_1D, ottenuti a distanza di circa 15 h.

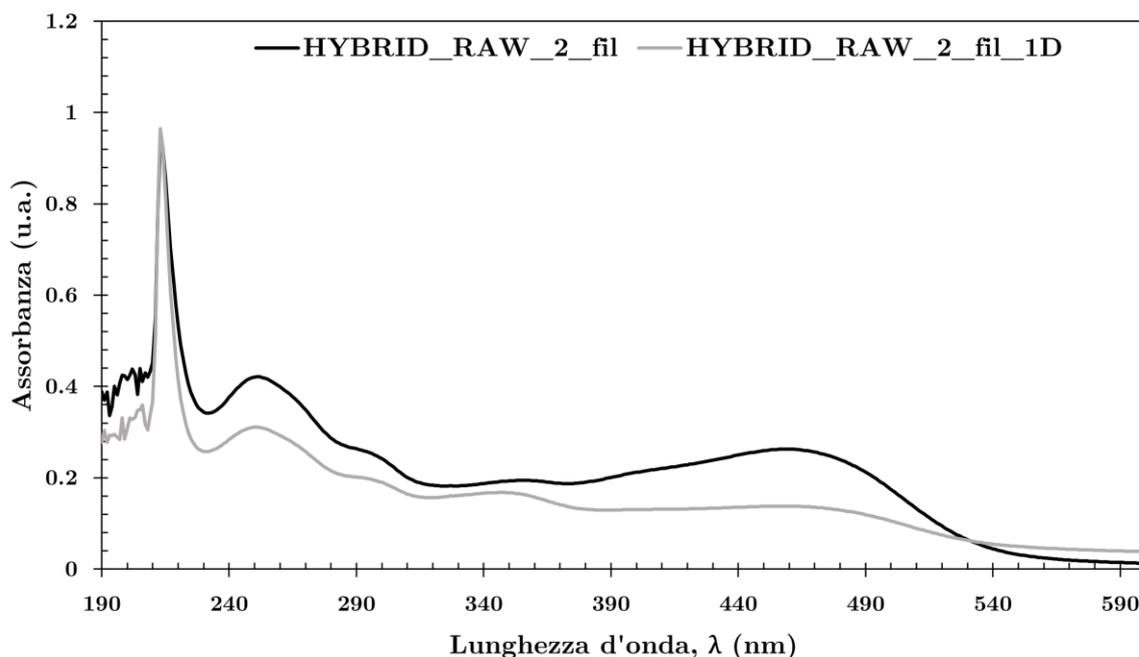


Figura 7.1.6. Spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil a confronto con HYBRID_RAW_2_fil_1D.

La Tabella 7.1.3 mostra la variazione in assorbanza di alcuni assorbimenti specifici del filtrato prima (HYBRID_RAW_2_fil) e dopo la notte (HYBRID_RAW_2_fil_1D). Trascorsa la notte, tutto lo spettro appare meno intenso (ad eccezione del picco poco sopra 200 nm attribuito al CTA); la banda maggiormente ridotta è quella a circa 460 nm. La generale riduzione in assorbanza potrebbe essere dovuta alla formazione di precipitato, come osservato in precedenza, che sottrae alla soluzione le specie responsabili dell'assorbimento.

Tabella 7.1.3. Assorbimenti notevoli dello spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil prima e dopo la notte.

Lunghezza d'onda, λ (nm)	Assorbanza (u.a.)		Rapporto fil_1D/fil
	fil	fil_1D	
459	0.263	0.138	0.52
350	0.193	0.167	0.87
301	0.238	0.188	0.79
251	0.421	0.311	0.74

Una caratteristica dello spettro di HYBRID_RAW_2_fil_1D è la riduzione meno spiccata della banda a 350 nm, in particolare rispetto agli assorbimenti a 460 nm e a 250 nm: tale riduzione meno marcata potrebbe essere dovuta alla formazione in soluzione di prodotti di degradazione della curcumina che contribuiscono all'assorbimento intorno a tale lunghezza d'onda. L'assorbanza della curcumina intorno a 360 nm in ambiente basico è documentata in letteratura: Bernabé-Pineda *et al.* [252] hanno osservato una tendenza simile registrando nel tempo lo spettro UV-VIS della curcumina libera in NaOH 0.5 M (Figura 7.1.7).

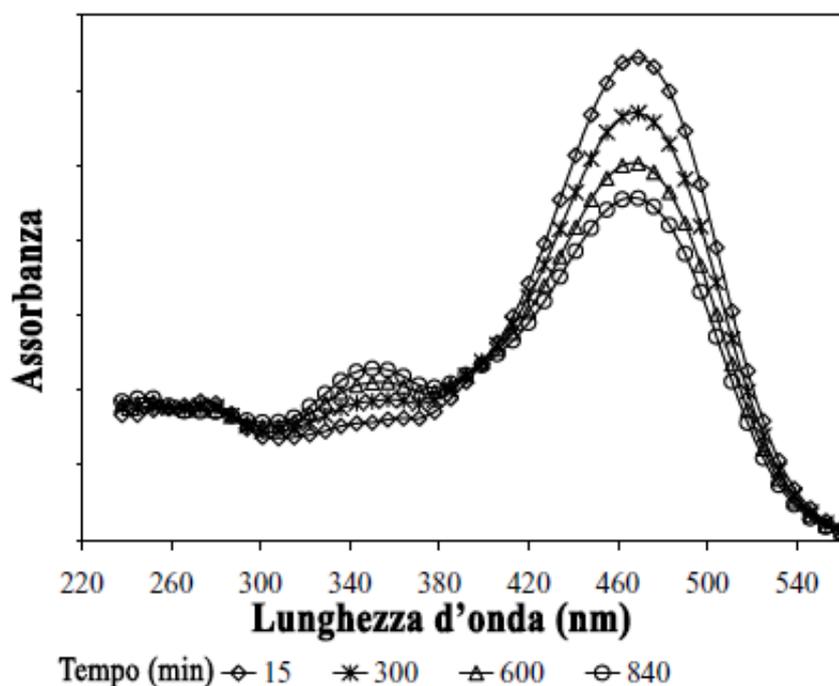


Figura 7.1.7. Spettro UV-VIS della curcumina in NaOH 0.5 M nel corso di 14 ore [252].

In particolare, anche in questo caso si osserva la decrescita del picco a 460 nm e un picco crescente nel tempo a 350 nm circa; la formazione di un picco intorno a 350 nm, indice della degradazione autossidativa della curcumina, è stata osservata anche da Gordon *et al.* a pH fisiologico [253]. Un simile picco è stato osservato anche nello spettro UV-VIS del filtrato di HYBRID_FILTRATE_1 (Capitolo 6). Sharma e Jani [254] hanno attribuito tale picco all'assorbimento dei gruppi ferulici; lo studio è tuttavia di limitata rilevanza rispetto agli scopi del presente lavoro poiché è stato realizzato in condizioni debolmente acide. Pur tenendo in considerazione la formazione del precipitato (Figura 7.1.3), occorre sottolineare che non tutta la curcumina viene sottratta dalla soluzione per precipitazione, e ciò è evidente dalla presenza, nello spettro, di assorbanza residua a 460 nm anche dopo la notte (Figura 7.1.6). L'ipotesi proposta, perciò, è che la banda a 350 nm si riduca meno a causa della progressiva degradazione autossidativa di parte della curcumina ancora in soluzione. Tale autossidazione proseguirebbe, secondo tale ipotesi, dopo la formazione del precipitato (come già osservato da Gordon *et al.* [253], d'altra parte, il fenomeno di autossidazione non è istantaneo e prevede la formazione di numerosi prodotti intermedi). L'assorbimento a 250 nm, che pure si riduce nella notte, è attribuito ad altri prodotti di degradazione, presenti già nel momento in cui si è registrato lo spettro UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil e che subiscono precipitazione nel corpo di fondo.

7.2. Risultati e caratterizzazione

La sintesi HYBRID_FILTRATE_2 fornisce 261.5 mg di solido (Figura 7.2.1). Rispetto alla sintesi HYBRID_FILTRATE_1, il solido appare di colore spiccatamente rosso, simile a quello delle sintesi da materie prime (Figura 7.2.2 e Figura 7.2.3): la curcumina protetta nelle micelle di CTA potrebbe essere stata effettivamente incorporata nel campione.



Figura 7.2.1. Campione solido HYBRID_FILTRATE_2 dopo macinatura.



Figura 7.2.2. Confronto HYBRID_FILTRATE_1 (a sinistra) e HYBRID_FILTRATE_2 (a destra).



Figura 7.2.3. Da sinistra a destra: HYBRID_RAW_1, HYBRID_FILTRATE_1, HYBRID_RAW_2, HYBRID_FILTRATE_2.

7.2.1. Analisi ATG

L'analisi ATG del campione HYBRID_FILTRATE_2 viene effettuata, come nei casi precedenti, per avere una stima approssimativa del quantitativo di CTA e di curcumina incorporato nel materiale; i risultati sono riassunti nella Figura 7.2.4 e nella Tabella 7.2.1.

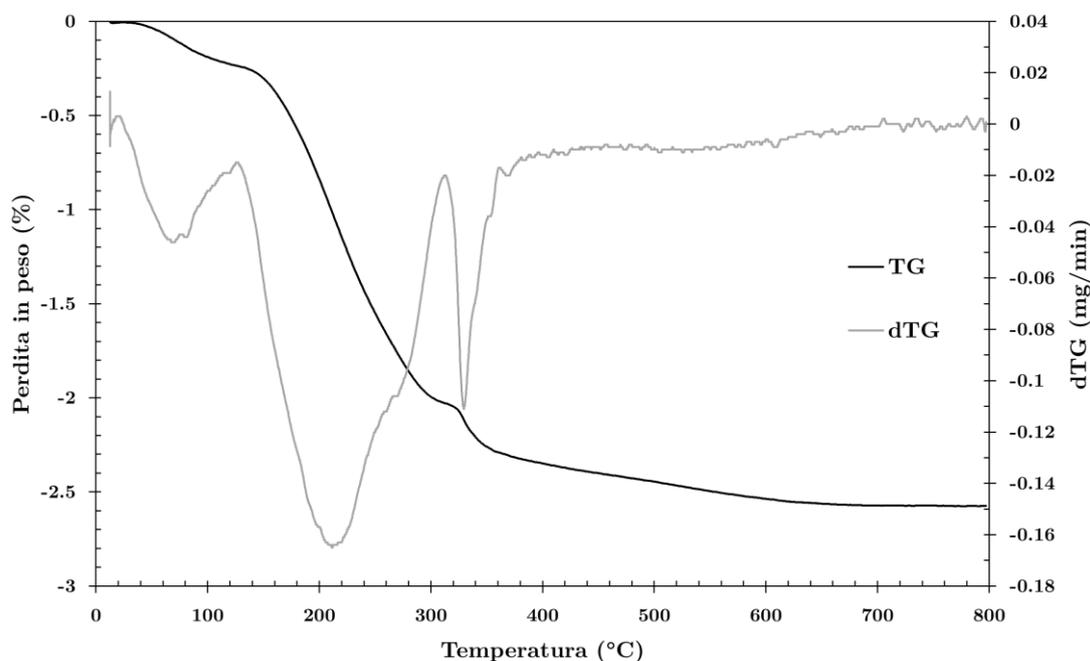


Figura 7.2.4. Curve TG e dTG relative alla sintesi HYBRID_FILTRATE_2.

Tabella 7.2.1. Risultati analisi termogravimetrica della sintesi HYBRID_FILTRATE_2.

Massa iniziale /mg	Massa finale /mg	Perdita totale /%	Perdita senza acqua /%
4.551	1.976	-56.58	-49.99

La curva risulta sovrapponibile a quella ottenuta per HYBRID_FILTRATE_1; come osservato per HYBRID_FILTRATE_1 (Capitolo 6), la perdita di massa complessiva è leggermente inferiore rispetto ai valori di riferimento di sintesi da materie prime, ma la differenza è tale da poter essere imputata ad errori strumentali. Dal momento che per i campioni di riferimento senza curcumina la perdita in massa è di circa il 46%, tenendo conto dell'errore strumentale, è ragionevole credere che il campione contenga al massimo l'1-2% di curcumina. La presenza o meno di curcumina resta quindi da accertare con altre tecniche di caratterizzazione.

7.2.2. Spettroscopia FT-IR

Come per il campione HYBRID_FILTRATE_1, la spettroscopia FT-IR viene utilizzata come tecnica qualitativa per verificare la presenza di curcumina e CTA nel campione. Lo spettro FT-IR del campione è mostrato in Figura 7.2.5.

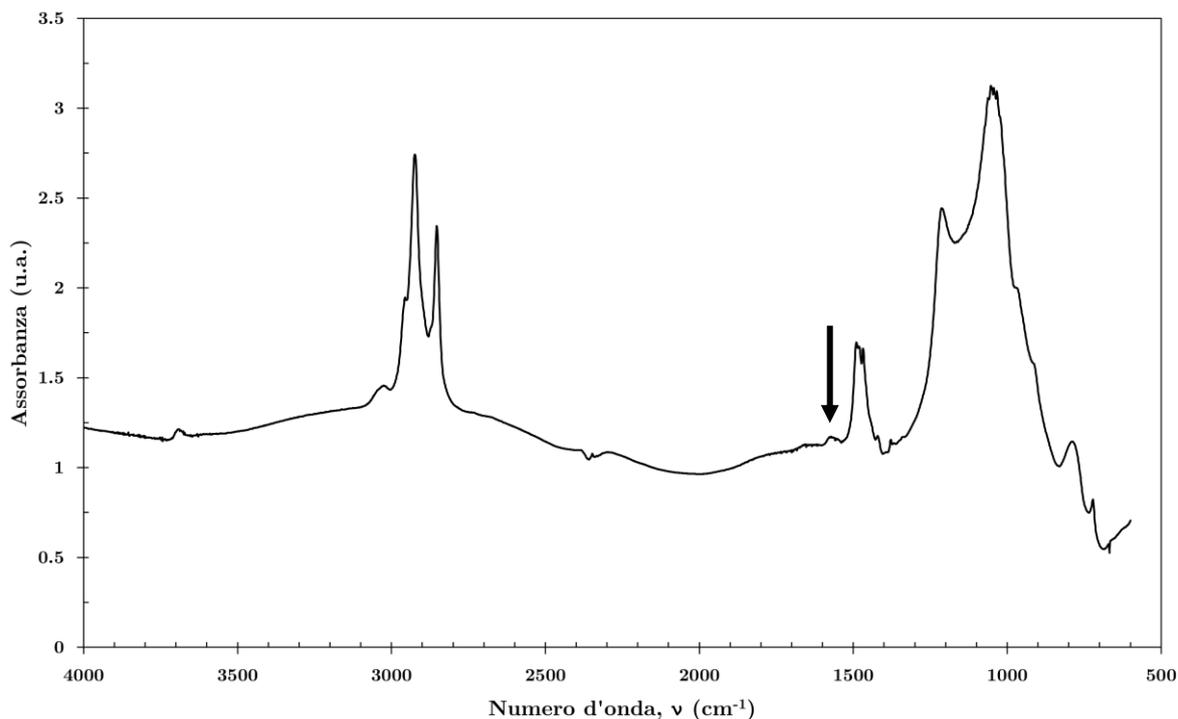


Figura 7.2.5. Spettro FT-IR di HYBRID_FILTRATE_2 in vuoto.

Rispetto allo spettro della sintesi HYBRID_FILTRATE_1, si evidenzia un picco, benché di bassa intensità, intorno ai 1570 cm^{-1} , che potrebbe corrispondere allo *stretching* degli anelli aromatici e perciò alla presenza di curcumina [230]; ciò giustificherebbe anche il colore rosso intenso della polvere osservato.

In Figura 7.2.6 sono confrontati lo spettro FT-IR di HYBRID_FILTRATE_2 con una sintesi effettuata in un precedente lavoro a partire da materie prime, contenente curcumina (MESO_SiO₂_cur) [238], e una sintesi senza curcumina ottenuta anch'essa da materie prime (MESO_SiO₂) [238]. Il confronto diretto dimostra che il “picco” individuato a 1570 cm^{-1} corrisponde alla curcumina. Il campione privo di curcumina, infatti, non presenta il picco a 1570 cm^{-1} presente sia in HYBRID_FILTRATE_2 che in MESO_SiO₂_cur. Gli spettri sono rappresentati qualitativamente; la quantificazione della curcumina incorporata dovrà essere effettuata utilizzando altre tecniche di caratterizzazione.

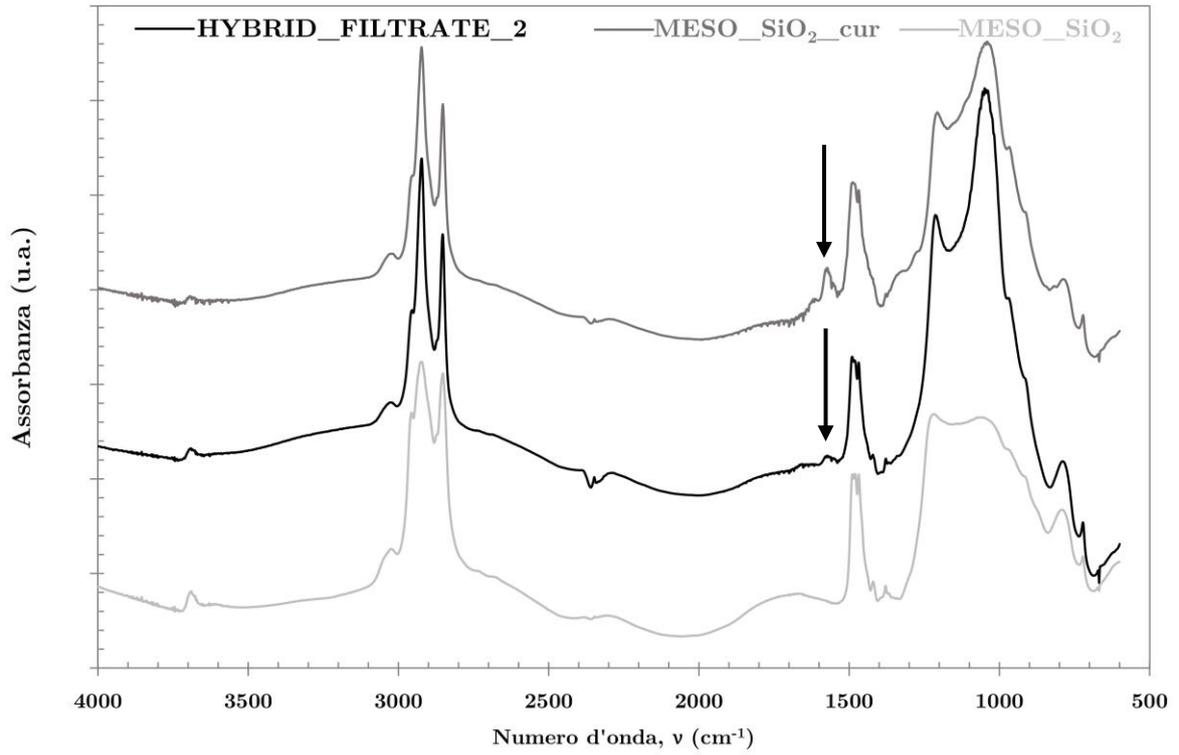


Figura 7.2.6. Confronto spettro FT-IR di HYBRID_FILTRATE_2 con campioni MESO_SiO₂_cur e MESO_SiO₂ (tratti da [238]).

7.2.3. Diffrazione a raggi X

L'analisi ad alti angoli in Figura 7.2.7 mostra la presenza di una struttura amorfa, così come osservato anche per il campione HYBRID_FILTRATE_1 (Figura 6.3.9). Rispetto al campione HYBRID_FILTRATE_1, invece, il campione solido HYBRID_FILTRATE_2 sembra non possedere una mesostruttura ordinata, come evidente dall'assenza di picchi nell'analisi a bassi angoli in Figura 7.2.8. Tale perdita di ordine rispetto al campione HYBRID_FILTRATE_1 è in linea con quanto già osservato in lavori precedenti [230]: la curcumina si comporta da agente "co-templante" insieme al CTA e determina una perdita dell'ordine a lungo raggio.

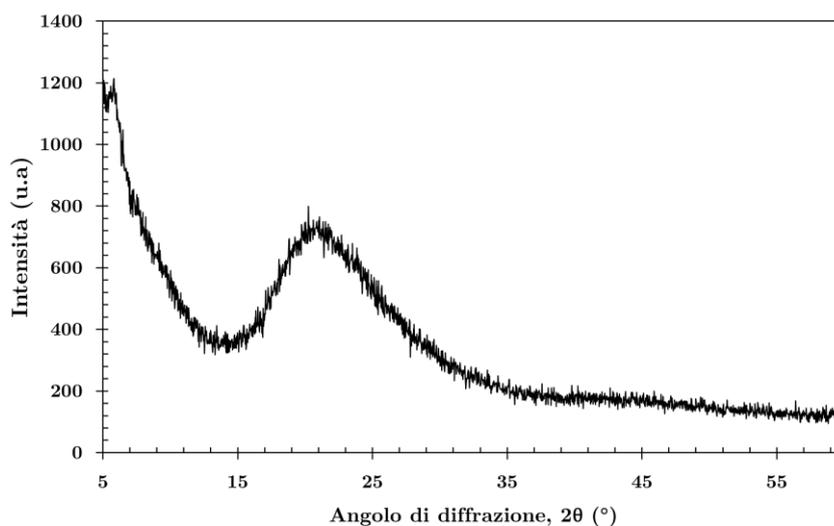


Figura 7.2.7. Spettro XRD ad alti angoli di HYBRID_FILTRATE_2.

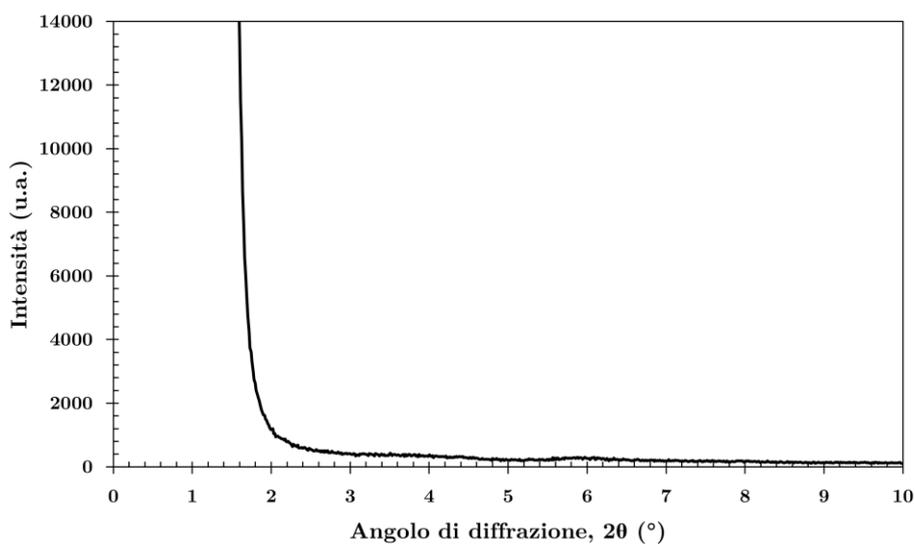


Figura 7.2.8. Spettro XRD a bassi angoli di HYBRID_FILTRATE_2.

7.2.4. Estrazione in etanolo

Il colore rosso intenso della polvere ottenuto con la sintesi HYBRID_FILTRATE_2 insieme ai risultati presentati nel Paragrafo 7.2.2 fanno supporre l'effettivo incorporamento di curcumina nel campione. La presenza di curcumina viene verificata effettuando un'estrazione in etanolo, secondo le modalità già descritte nel Capitolo 5; nello specifico, circa 2.8 mg di campione

vengono disciolti in 15 g di etanolo. Differentemente dal campione HYBRID_FILTRATE_1, lo spettro effettuato sull'estratto in etanolo del campione HYBRID_FILTRATE_2 presenta un picco a 425 nm crescente nel tempo (Figura 7.2.9).

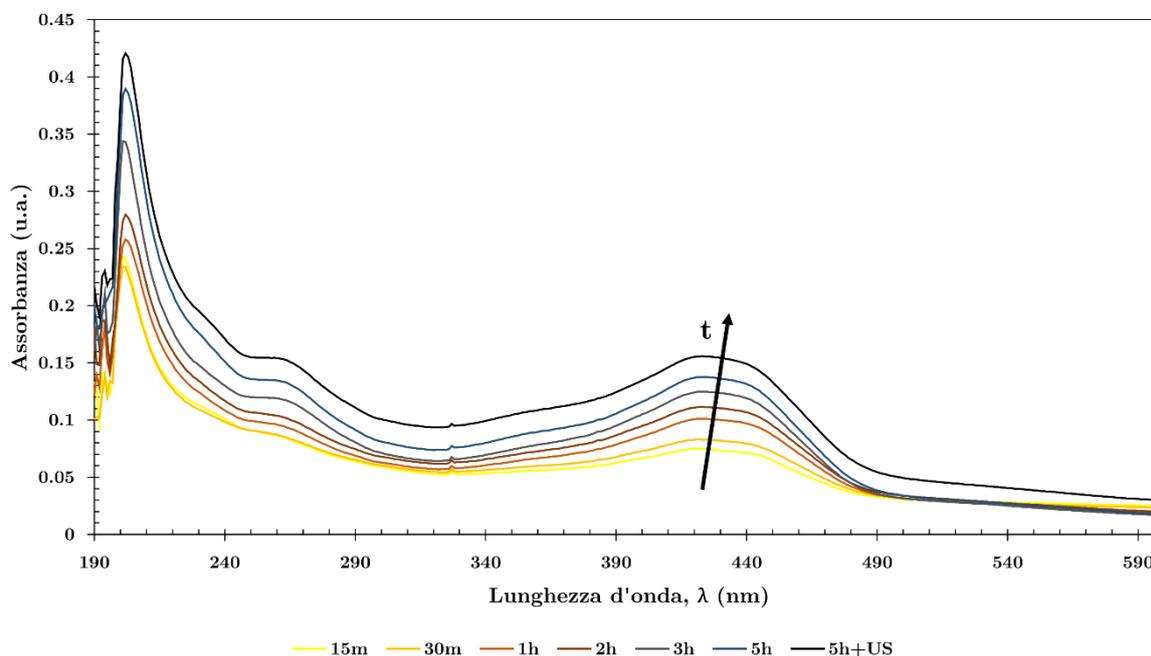


Figura 7.2.9. Spettro UV-VIS dell'estratto di HYBRID_FILTRATE_2.

Il picco a 425 nm presenta ampiezza crescente nel tempo secondo una curva logaritmica, indice di un rilascio più rapido all'inizio e che si avvicina ad uno stazionario con il tempo (Figura 7.2.10).

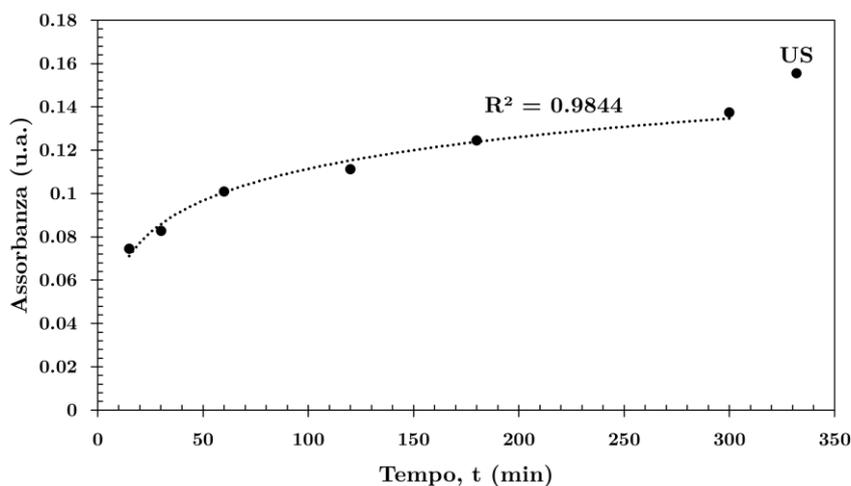


Figura 7.2.10. Andamento dell'ampiezza del picco a 425 nm nel tempo.

Per quantificare la curcumina presente nel campione, si assume in ragione del profilo logaritmico che l'assorbanza arrivi al valore limite massimo dopo 5 ore di estrazione in etanolo e il passaggio agli ultrasuoni. L'assorbanza della soluzione di curcumina in etanolo viene correlata alla sua concentrazione utilizzando una retta di taratura della curcumina in etanolo puro ottenuta in lavori precedenti [238] (Figura 7.2.11). Si è ipotizzato che il sistema ibrido

rilasci curcumina in PBS all'interno delle micelle di CTAB [238, 239]: ciò potrebbe avvenire anche per l'etanolo e, nonostante il CTAB in etanolo non assorba a 425 nm [238], è possibile che l'inserimento della curcumina nelle micelle determini una modifica della sua assorbanza in etanolo. Un effetto di aumento dell'assorbanza, ad esempio, è stato riportato da Sharma e Jani [254] per la curcumina inserita in micelle di CTAB in PBS.

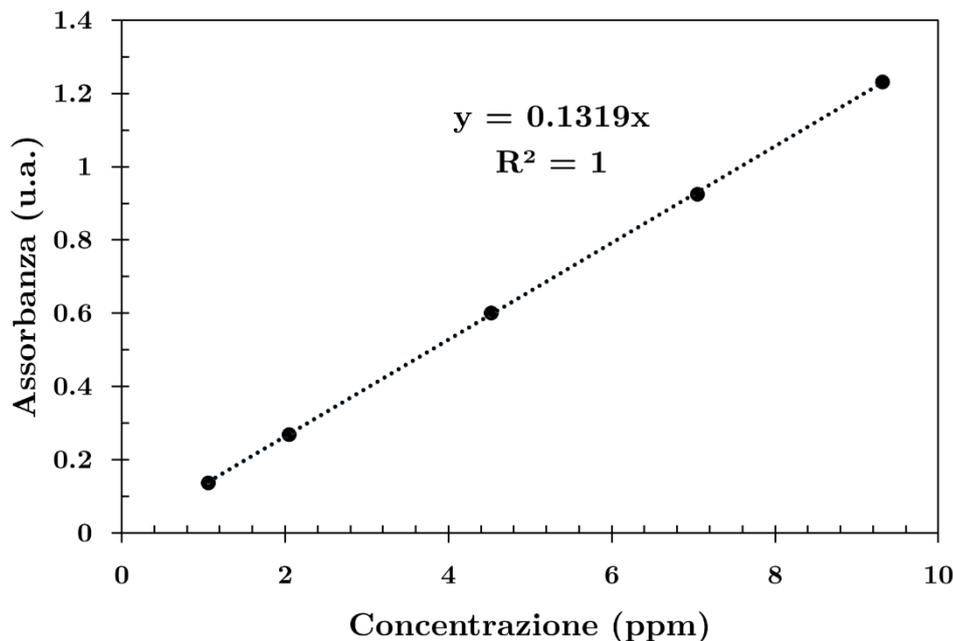


Figura 7.2.11. Retta di taratura della curcumina in etanolo [238].

Nelle equazioni (21), (22), (23) e (24) si riportano i calcoli effettuati per valutare la quantità di curcumina presente nel campione secondo le assunzioni appena descritte.

$$\text{Assorbanza a 425 nm} = 0.155 \text{ (u. a.)}$$

$$\text{Concentrazione} = \frac{0.155}{0.1319} = 1.178 \text{ ppm} \quad (21)$$

$$\text{Massa etanolo} = 0.015 \text{ kg}^{45}$$

$$\text{Quantità nel materiale} = 1.178 \text{ mg/kg} \cdot 0.015 \text{ kg} = 0.018 \text{ mg} \quad (22)$$

$$\text{Peso campione solido} = 2.8 \text{ mg}$$

$$\text{Percentuale in massa w/w} = \frac{0.018 \text{ mg}}{2.8 \text{ mg}} \cdot 100 = 0.64\% \quad (23)$$

$$\begin{aligned} \text{Curc totale in HYBRID_FILTRATE_2} &= 0.64\% \cdot \text{Resa}_{\text{HYBRID_FILTRATE_2}} \\ &= 0.64\% \cdot 261.5 \text{ mg} = 1.674 \text{ mg} \end{aligned} \quad (24)$$

Il basso quantitativo di curcumina contenuto nel campione HYBRID_FILTRATE_2 (0.64% in massa) potrebbe essere la ragione dell'intensità ridotta del picco presente nello spettro FT-IR; è possibile, tuttavia, che l'utilizzo di uno scarto per la sintesi della silice abbia fornito un solido

⁴⁵ Avendo utilizzato la concentrazione in ppm, la quantità di soluzione è fornita in massa anziché in volume.

con struttura differente rispetto alle sintesi da materie prime, dal quale non tutta la curcumina può essere estratta con l'etanolo.

7.2.5. Spettroscopia UV-VIS sul filtrato

Il filtrato ottenuto a seguito della sintesi HYBRID_FILTRATE_2, denominato HYBRID_FILTRATE_2_fil, presenta un colore arancio intenso (Figura 7.2.12) ed è perciò analizzato con Spettroscopia UV-VIS (dopo esser stato diluito 1:6 con NaOH 0.05 M) (Figura 7.2.13).



Figura 7.2.12. Filtrato della sintesi HYBRID_FILTRATE_2.

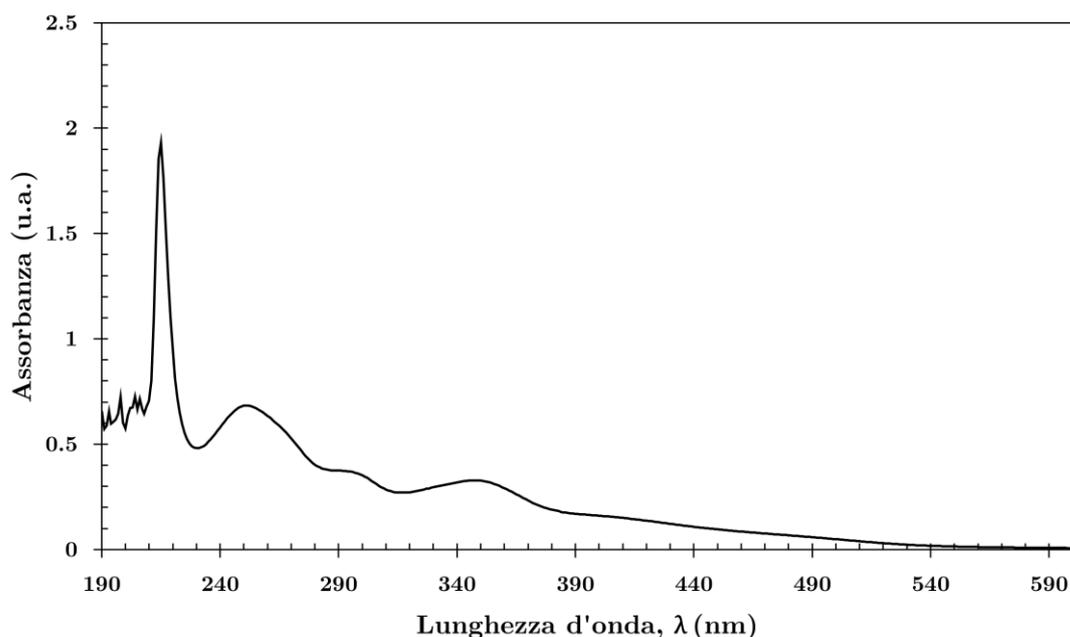


Figura 7.2.13. Spettro UV-VIS del filtrato della sintesi HYBRID_FILTRATE_2 dopo diluizione 1:6.

Rispetto al campione HYBRID_RAW_2_fil_1D, il picco a 460 nm non è più presente; è ragionevole ritenere che, come per la sintesi HYBRID_FILTRATE_1, la curcumina non incorporata nel campione solido HYBRID_FILTRATE_2 si sia degradata e che il colore del filtrato sia dovuto a prodotti di degradazione della curcumina cromofori. La natura e l'eventuale incorporazione nel materiale di tali prodotti di degradazione non sono verificabili, come osservato nel Paragrafo 7.1.1, dal momento che condividono con la curcumina alcuni gruppi funzionali caratteristici. Nello spettro si distinguono i soliti assorbimenti, già discussi, poco sopra 200 nm, a 350 nm, 290-300 nm e 350 nm.

7.2.6. Osservazioni

La sintesi HYBRID_FILTRATE_2 è stata realizzata supponendo che in HYBRID_RAW_2_fil fossero presenti 38.3 mg di curcumina, come era stato stimato per le sintesi da materie prime precedenti. Dopo aver osservato la rapida degradazione della curcumina presente nel filtrato di HYBRID_RAW_1 (Capitolo 6), si è deciso di aggiungere del CTAB prima della conservazione del filtrato durante la notte. Il CTAB aggiunto non ha impedito del tutto la degradazione della curcumina, che si è parzialmente degradata nella notte come visibile dall'abbassamento del picco caratteristico mostrato in Figura 7.1.6.

Una stima della curcumina non degradata presente in HYBRID_RAW_2_fil_1D consentirebbe di valutare, pur con una certa approssimazione, l'efficacia di incorporamento quando si effettuino sintesi a partire da filtrato. Dal momento che non si dispone di una retta di taratura della curcumina in CTAB e NaOH, si decide di procedere in maniera empirica, confrontando l'ampiezza del picco caratteristico della curcumina (460 nm) negli spettri UV-VIS di HYBRID_RAW_2_fil e HYBRID_RAW_2_fil_1D (Equazione (25)). Tale confronto risulta significativo dal momento che gli spettri sono stati ottenuti nelle medesime condizioni di diluizione, a distanza di 15 ore l'uno dall'altro.

$$\frac{A_1(\text{sera})}{A_2(\text{mattina})} = \frac{0.263}{0.138} = 1.9 \quad (25)$$

Assumendo, ancora, che HYBRID_RAW_2_fil contenesse inizialmente 38.3 mg di curcumina non degradata (come il campione REF caratterizzato nel Capitolo 6), si ottiene che circa 20 mg di curcumina non degradata erano presenti in HYBRID_RAW_2_fil_1D (20 mg = 38.3 mg/1.9). L'Equazione (26) consente di valutare l'efficacia di incorporamento della curcumina nel campione HYBRID_FILTRATE_2.

20 mg di curc libera nel filtrato

Curc totale in HYBRID_FILTRATE_2 = 1.674 mg

$$\text{Efficacia di incorporamento (Eff}_{\%}) = \frac{1.674 \text{ mg}}{20 \text{ mg}} \cdot 100 = 8.37\% \quad (26)$$

Dei 20 mg presenti in HYBRID_RAW_2_fil_1D, circa il 92% non è stato incorporato nel materiale ibrido ed è ragionevolmente andato incontro a degradazione, data l'assenza del picco della curcumina deprotonata nello spettro di HYBRID_FILTRATE_2_fil (Figura 7.2.13). Come osservato nel Paragrafo 7.2.4, tuttavia, è possibile che il materiale poco ordinato non abbia rilasciato tutta la curcumina in etanolo, e che dunque ne sia presente effettivamente di più di quanto stimato. In base ai risultati dell'analisi ATG (Paragrafo 7.2), il materiale realizzato può comunque contenere al massimo l'1-2% di curcumina.

Di interesse è inoltre il confronto tra gli spettri UV-VIS ottenuti per HYBRID_RAW_2_fil_1D e per HYBRID_FILTRATE_2_fil (cioè della stessa soluzione prima e dopo la sintesi del materiale HYBRID_FILTRATE_2). In Figura 7.2.14 è mostrato tale confronto⁴⁶.

⁴⁶ Dal momento che i due spettri sono stati ottenuti con diluizioni differenti dei campioni (1:20 per HYBRID_RAW_2_fil_1D e 1:6 per HYBRID_FILTRATE_2_fil), l'assorbanza di HYBRID_RAW_2_fil_1D è stata ridotta di un fattore pari al rapporto tra l'assorbanza a 215 nm di HYBRID_FILTRATE_2_fil e quella di

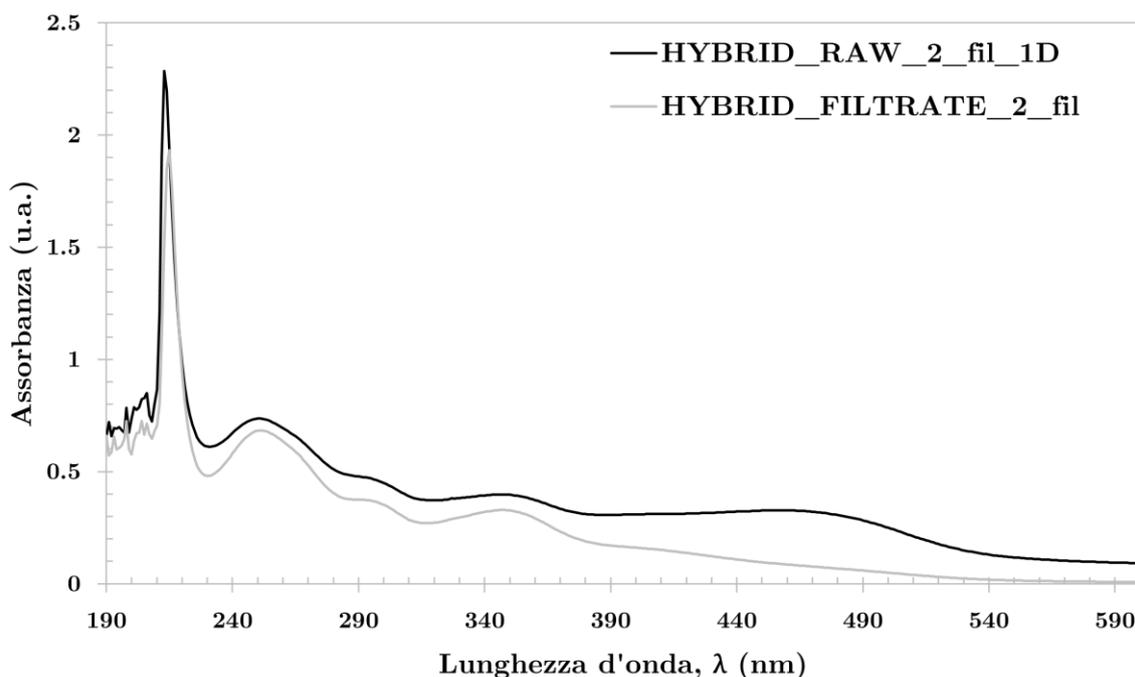


Figura 7.2.14. Confronto tra le assorbance di HYBRID_FILTRATE_2_fil e HYBRID_RAW_2_fil_1D.

I due campioni differiscono per un generale abbassamento dell'assorbanza. La maggior differenza tra i due spettri è riscontrata, come ovvio, per l'assorbanza intorno a 460 nm: questa differenza è presumibilmente indice del corretto incorporamento di curcumina in HYBRID_FILTRATE_2. Insieme a tale riduzione, si riscontra un abbassamento generale dell'assorbanza per lunghezze d'onda inferiori ai 400 nm. Si è ipotizzato che l'assorbanza a tali lunghezze d'onda sia dovuta ai prodotti di degradazione della curcumina: un abbassamento dell'assorbanza a $\lambda < 400$ nm, perciò, potrebbe essere indice dell'incorporamento di prodotti di degradazione della curcumina nel materiale finale. Tale fenomeno non è trascurabile e sarà necessario tenerne conto in futuri sviluppi dell'attività di ricerca: come osservato nel Capitolo 4, il ruolo dei prodotti di degradazione nell'attività terapeutica della curcumina è ancora poco chiaro. L'eventuale incorporazione di prodotti di degradazione della curcumina in un *drug delivery system* potrebbe determinare la riduzione dell'efficacia del farmaco [182].

HYBRID_RAW_2_fil_1D alla medesima lunghezza d'onda. In questa maniera, i due spettri presentano la medesima assorbanza a 215 nm ed è possibile confrontarli.

Capitolo 8

Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro di tesi si è prefissato i seguenti obiettivi:

- Offrire una panoramica dello stato dell'arte riguardo le particelle ibride a base di silice e il loro utilizzo come sistema di rilascio del farmaco, nonché delle tecnologie per la sintesi di silici a partire da scarti di produzione;
- Discutere le principali problematiche di stabilità dei principi attivi, con particolare riguardo per la curcumina;
- Illustrare le principali nanotecnologie impiegate per il rilascio di curcumina;
- Sviluppare un processo per la valorizzazione di un filtrato di scarto ottenuto dalla sintesi di particelle ibride a base di silice contenenti curcumina.

Nel Capitolo 1 si sono discusse le principali proprietà delle particelle ibride a base di silice, con particolare attenzione per le tecniche di sintesi più comuni e l'applicazione in campo biomedico. Tali *carrier* risultano particolarmente vantaggiosi grazie alle seguenti caratteristiche [255]:

- Dimensioni facilmente adattabili ai diversi bersagli farmaceutici;
- Possibilità di captazione per endocitosi da parte delle cellule;
- Possibilità di incorporare principi attivi idrofobici, solubilizzandoli nella fase organica;
- Elevata biocompatibilità, biodegradabilità;
- Produzione in condizioni blande mediante i processi di tipo sol-gel.

Le condizioni blande di produzione e la possibilità di incorporare principi attivi idrofobici rendono le particelle ibride un *carrier* ideale per la curcumina, principio attivo oggetto di questo lavoro.

La curcumina, come illustrato nel Capitolo 4, è un principio attivo di particolare interesse per le sue proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, e molta letteratura è dedicata allo studio *in vitro* delle sue proprietà antitumorali. Essa è tuttavia sensibile a luce e calore ed è soggetta a reazioni di autossidazione a pH basico [256, 257]. I prodotti di autossidazione della curcumina potrebbero possedere attività terapeutica, ma ciò è ancora oggetto di studio [258]. L'utilizzo di sistemi di rilascio di curcumina è dunque auspicabile, per migliorarne la biodisponibilità e incrementarne la stabilità. Vari *drug carrier* quali nanoliposomi, nanoparticelle polimeriche, ciclodestrine e nanoemulsioni sono stati già impiegati con successo per il *delivery* di curcumina; anche i materiali ibridi potrebbero costituire una buona soluzione a questa problematica.

Le particelle di silice mesoporosa e mesostrutturata, che con quelle ibride condividono parte del processo di produzione, possono essere sintetizzate anche a partire da scarti industriali, come illustrato nel Capitolo 2: si tratta di un impiego dei rifiuti che fornisce prodotti ad elevato valore aggiunto, grazie alla possibilità di utilizzare tali silici nei campi della *remediation* e della catalisi. L'estrazione di precursori della silice da scarti di produzione è materia non banale, e determinante è la rimozione delle impurezze presenti, come gli ossidi metallici [259]. Una possibile soluzione alla presenza di impurezze potrebbe essere l'impiego di rifiuti dell'industria elettronica per la produzione di silici mesostrutturati: questi materiali contengono silicio ad

elevata purezza e consentono la sintesi di silici mesostrutturate anche a temperatura ambiente [260].

Sul concetto di “riutilizzo degli scarti” si basa la procedura di sintesi sviluppata nel seguente lavoro, che ambisce al recupero di un filtrato altrimenti inutilizzato. Il filtrato è ottenuto a partire da una sintesi di particelle ibride a base di silice, contenenti micelle di tensioattivo (CTA) con curcumina al loro interno. La sintesi è effettuata a temperatura ambiente e pH basico secondo un processo sol-gel (Capitolo 5). La presenza di materie prime nel filtrato è stata valutata a partire dalla caratterizzazione di campioni ottenuti in sintesi precedenti [261]. Il filtrato utilizzato è un mezzo a pH basico, all’interno del quale la curcumina tende a degradarsi piuttosto rapidamente. Un primo tentativo di sintesi a partire da filtrati ha previsto la conservazione del filtrato per una notte prima di utilizzarlo per ottenere nuove particelle: tale tentativo si è rivelato infruttuoso, avendo fornito un materiale che non ha inglobato curcumina, quanto piuttosto suoi prodotti di degradazione cromofori (Capitolo 6). Come evidenziato in lavori precedenti [230], un maggior contenuto di curcumina nei materiali mesostrutturati determina una struttura con minor ordine a lungo raggio. Il primo materiale ottenuto da filtrato, denominato HYBRID_FILTRATE_1, non ha incorporato curcumina, ed ha perciò una certa struttura mesoscopica, seppur non molto ordinata.

In un secondo tentativo si è tentato di proteggere la curcumina presente nel filtrato aggiungendovi il CTAB necessario non appena ottenuto il filtrato, in maniera da proteggere il principio attivo dalla degradazione all’interno delle micelle: tale scelta è stata dettata dalle evidenze presenti in letteratura [262]. La scelta ha consentito di proteggere parte della curcumina; non è stato possibile, tuttavia, evitare del tutto la degradazione del principio attivo. Come evidenziato nel Capitolo 7, infatti, circa metà della curcumina presente è andata comunque incontro a degradazione, e ciò è evidente dai risultati della spettroscopia UV-VIS su HYBRID_RAW_2_fil e HYBRID_RAW_2_fil_1D. L’estrazione del campione HYBRID_FILTRATE_2 in etanolo e l’analisi degli spettri UV-VIS ottenuti dagli estratti hanno mostrato un contenuto di curcumina dello 0.64% w/w nel campione. Il campione HYBRID_FILTRATE_2 non presenta una struttura ordinata, e potrebbe comunque contenere più curcumina di quanto stimato dagli estratti, inglobata nel materiale con interazioni differenti da quelle ipotizzate.

In conclusione, è stato possibile sintetizzare delle particelle ibride a base di silice contenenti curcumina a partire da un filtrato di scarto. L’efficienza di incorporazione di curcumina è stata piuttosto scarsa, ma il presente lavoro ha mostrato la fattibilità del processo. In futuro sarebbe auspicabile ottimizzare ulteriormente il processo di sintesi da filtrati, adottando ulteriori accortezze per ridurre l’entità della degradazione della curcumina presente. Per chiarire il ruolo del tempo di conservazione del filtrato, sarebbe ad esempio utile realizzare sintesi del tipo “FILTRATE” non appena il filtrato della sintesi “RAW” è stato ottenuto. In questa maniera sarebbe possibile verificare se tale scelta consente di prevenire, anche solo in parte, la degradazione della curcumina durante la notte e permette di incorporare più curcumina nel materiale finale. Ulteriori studi potrebbero inoltre prevedere lo studio della morfologia e del rilascio di curcumina per particelle ottenute da filtrati.

Appendice

Sintesi HYBRID_RAW_3

A.1. Introduzione

Come già accennato nel Capitolo 5, il presente lavoro di tesi ha previsto una sintesi da materie prime aggiuntiva, la quale ha fornito importanti indicazioni circa una futura ottimizzazione del processo. La sintesi è stata realizzata utilizzando i medesimi rapporti molari effettivi della sintesi HYBRID_FILTRATE_2, fatta eccezione per il quantitativo di curcumina iniziale. Il procedimento seguito è stato il medesimo utilizzato per le sintesi da materie prime descritto nel Capitolo 5. Nella Tabella 1 si riportano i rapporti molari utilizzati per maggior chiarezza:

Tabella 1. Rapporti molari effettivi della sintesi HYBRID_RAW_3

TEOS	CTAB	NaOH	H ₂ O	Curcumina
1	0.115	0.774	859	0.011

A.2. Risultati e caratterizzazione

La sintesi HYBRID_RAW_3 ha fornito 483.0 mg di campione solido, di cui si mostra in Figura 1 l'aspetto dopo asciugatura e macinatura.



Figura 1. Campione solido HYBRID_RAW_3 dopo asciugatura e macinatura.

Il campione solido HYBRID_RAW_3 presenta una colorazione rosso intenso, più scuro rispetto alle sintesi HYBRID_RAW_1 e HYBRID_FILTRATE_2 (Capitolo 6 e Capitolo 7) e che tende quasi al violaceo.

A.2.1. Spettroscopia UV-VIS su HYBRID_RAW_3

Il preparato di HYBRID_RAW_3 prima dell'aggiunta di TEOS (PREHYBRID_RAW_3) e il filtrato di HYBRID_RAW_3 (HYBRID_RAW_3_fil) sono stati analizzati con spettroscopia UV-VIS. I risultati sono mostrati in Figura 2.

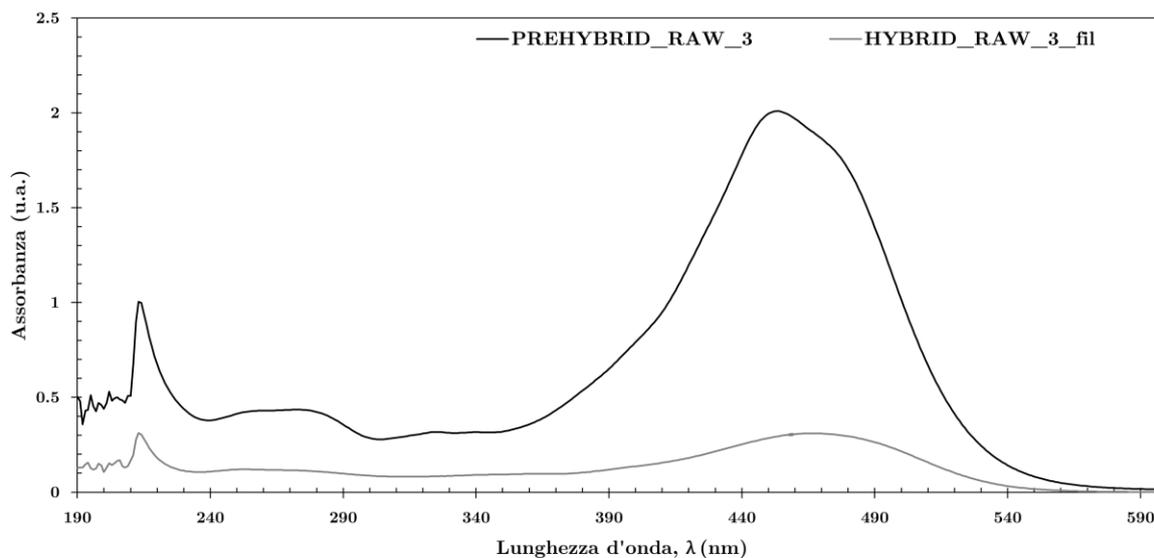


Figura 2. Spettri UV-VIS di PREHYBRID_RAW_3 e HYBRID_RAW_3_fil.

Come prevedibile, il picco caratteristico della curcumina deprotonata in ambiente basico (a 453 nm in questo caso) è quello che maggiormente si riduce con la sintesi: ciò è un primo indice della corretta incorporazione di curcumina nella silice. Lo spettro di PREHYBRID_RAW_3 presenta gli assorbimenti fra 240 e 350 nm dei quali si è già discusso nel Capitolo 6 e nel Capitolo 7: tale preparato contiene CTAB, NaOH e curcumina, ma tali assorbimenti non sono associabili ad alcuna delle tre sostanze. Dal momento che questi sono riscontrati non solo per PREHYBRID_RAW_3, ma in generale in tutti gli spettri di filtrati (si veda, ad esempio, lo spettro ottenuto dal filtrato di HYBRID_FILTRATE_1 in Figura 6.3.13), è possibile che siano dovuti alla presenza di prodotti di degradazione chimica della curcumina. Il confronto tra i due spettri, ottenuti entrambi da preparati diluiti 1:20, mostra inoltre come tali picchi si “abbassino” con il procedere della sintesi: è possibile, dunque, che i prodotti di degradazione siano stati incorporati nel materiale insieme alla curcumina.

A.2.2. Spettroscopia FT-IR su HYBRID_RAW_3

In Figura 3 si riporta lo spettro FT-IR ricavato dalla sintesi HYBRID_RAW_3.

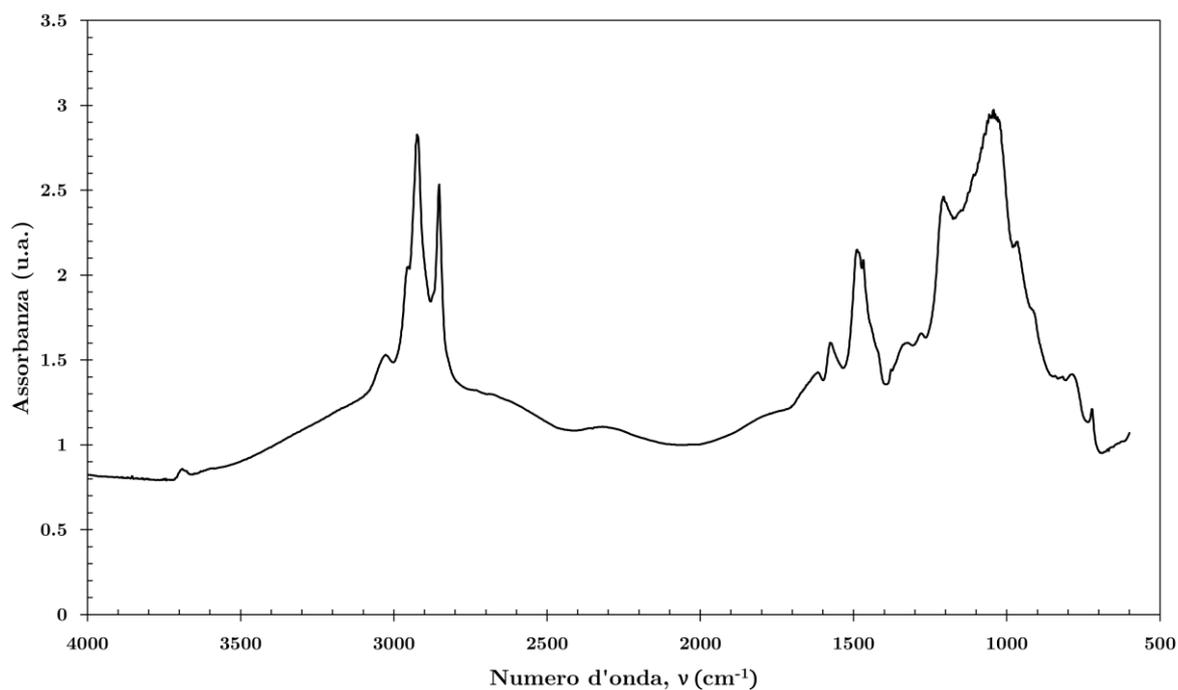


Figura 3. Spettro FT-IR di HYBRID_RAW_3 in vuoto.

La presenza della curcumina nel campione HYBRID_RAW_3 è ulteriormente confermata dal picco ben visibile intorno a 1570 cm^{-1} : dal momento che, come già osservato nel Capitolo 7, tale picco corrisponde alla curcumina, la spettroscopia FT-IR conferma la presenza di principio attivo nel campione. Il quantitativo di curcumina presente dovrà essere verificato mediante estrazione in etanolo.

A.2.3. Estrazione in etanolo di HYBRID_RAW_3

Per l'estrazione in etanolo del campione HYBRID_RAW_3, si disciolgono 3.7 mg di polvere in 19 g di etanolo. In Figura 4 si riporta lo spettro UV-VIS dell'estratto dopo 5 ore di estrazione e il passaggio agli ultrasuoni.

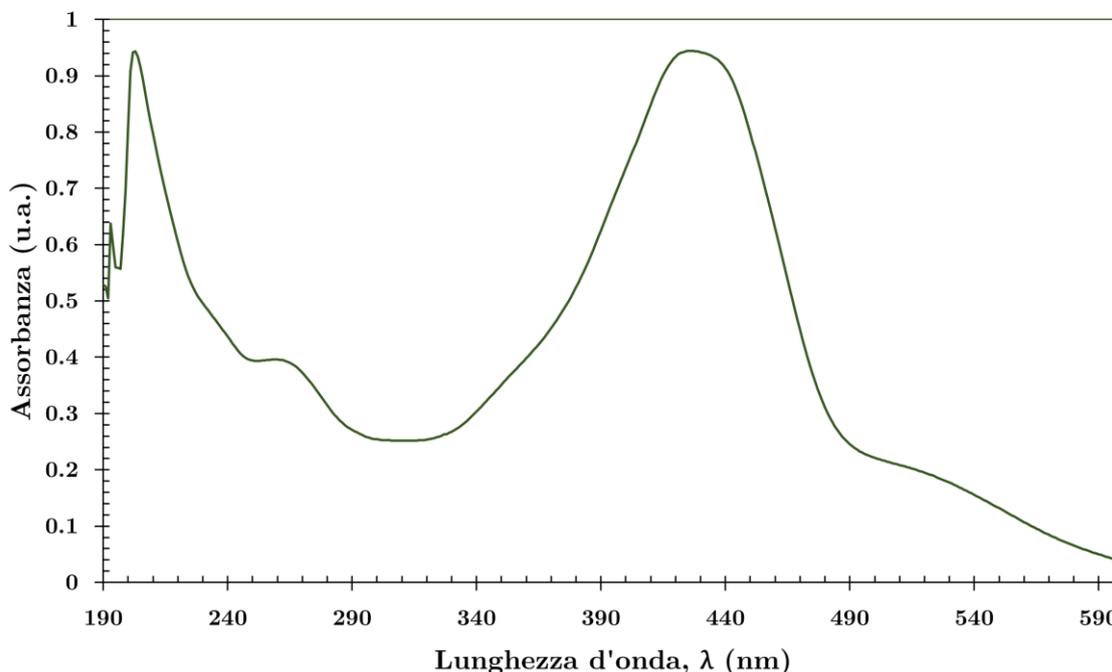


Figura 4. Spettro UV-VIS dell'estratto di HYBRID_RAW_3 dopo 5 ore di estrazione e trattamento agli ultrasuoni.

Le Eq. (27), (28), (29) e (30) consentono di stimare la curcumina incorporata (si utilizza ancora la retta di taratura riportata nel Capitolo 7, Figura 7.2.11).

$$\text{Assorbanza a 425 nm (u. a.)} = 0.944$$

$$\text{Concentrazione} = \frac{0.944}{0.1319} = 7.155 \text{ mg/kg} \quad (27)$$

$$\text{Massa etanolo} = 0.019 \text{ kg}$$

$$\text{Quantità nel materiale} = 7.155 \text{ mg/kg} \cdot 0.019 \text{ kg} = 0.136 \text{ mg} \quad (28)$$

$$\text{Massa campione estratto} = 3.7 \text{ mg}$$

$$\text{Percentuale in massa w/w} = \frac{0.14 \text{ mg}}{483 \text{ mg}} \cdot 100 = 3.7\% \quad (29)$$

$$\text{Resa HYBRID_RAW_3} = 483.0 \text{ mg}$$

$$\text{Curc totale in HYBRID_RAW_3} = 3.7\% \cdot 483.0 \text{ mg} = 17.8 \text{ mg} \quad (30)$$

Osservazioni

Il campione solido HYBRID_RAW_3 è stato realizzato utilizzando 38.1 mg di curcumina e ne ha incorporati 17.8 mg; ciò significa che l'efficienza di incapsulamento nel materiale è stata del 46.7%, superiore a quanto ottenuto nei lavori precedenti (in cui l'efficienza di incapsulamento era circa del 42% [238]). Dal momento che l'unica differenza fra tali sintesi e la sintesi HYBRID_RAW_3 è la maggior diluizione del preparato di sintesi di quest'ultima, si potrebbe

considerare in sperimentazioni successive un aumento del contenuto di acqua per migliorare l'efficienza di incorporamento nel materiale.

Il residuo della sintesi HYBRID_RAW_3 dopo l'estrazione in etanolo è mostrato in Figura 5.

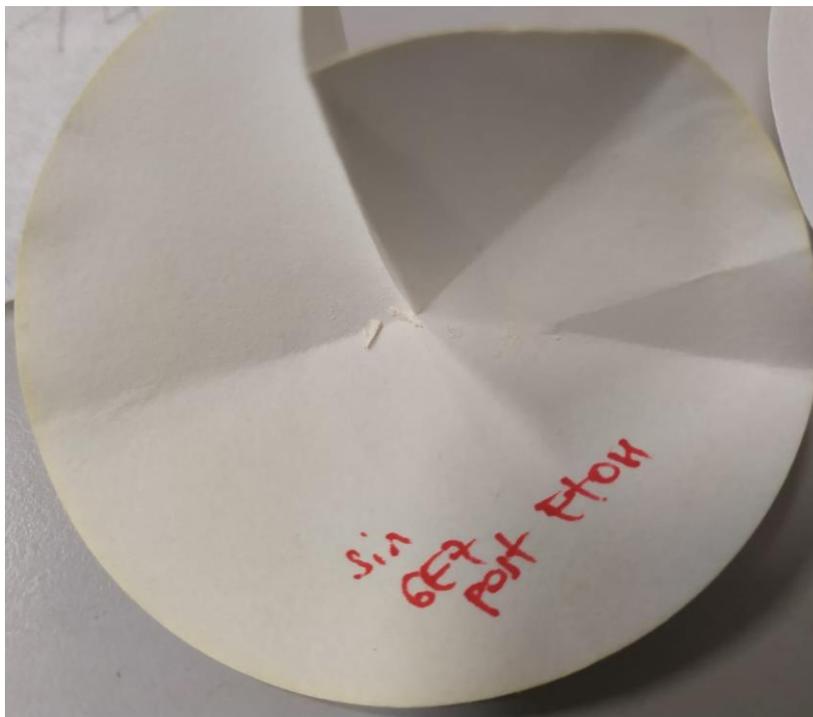


Figura 5. Residuo di HYBRID_RAW_3 dopo l'estrazione in etanolo.

Diversamente da quanto osservato per HYBRID_FILTRATE_2, probabilmente tutta la curcumina presente in HYBRID_RAW_3 è stata estratta in etanolo, come evidente dal colore bianco della polvere dopo estrazione. Questa osservazione supporta l'ipotesi che la struttura dei campioni ottenuti da materie prime sia diversa rispetto a quella dei materiali ottenuti da filtrato, ma l'ipotesi necessita di conferme attraverso altre tecniche di caratterizzazione (quali, ad esempio, l'osservazione al microscopio elettronico delle particelle).

A.2.4. Spettroscopia UV-VIS su PREHYBRID_RAW_3 e HYBRID_RAW_3_fil a 16 giorni dall'ottenimento

Nel presente lavoro di tesi si è tentato di monitorare la degradazione della curcumina nei preparati effettuandone l'analisi spettroscopica a 16 giorni dalla data di ottenimento. In Figura 6 è mostrato tale confronto per PREHYBRID_RAW_3 diluito 1:20 con NaOH 0.05 M. Il preparato, come accennato nel Paragrafo A.2.1, contiene curcumina, CTAB e NaOH; l'inserto mostra un tipico spettro di assorbimento della curcumina in NaOH, ottenuto in lavori precedenti [238]).

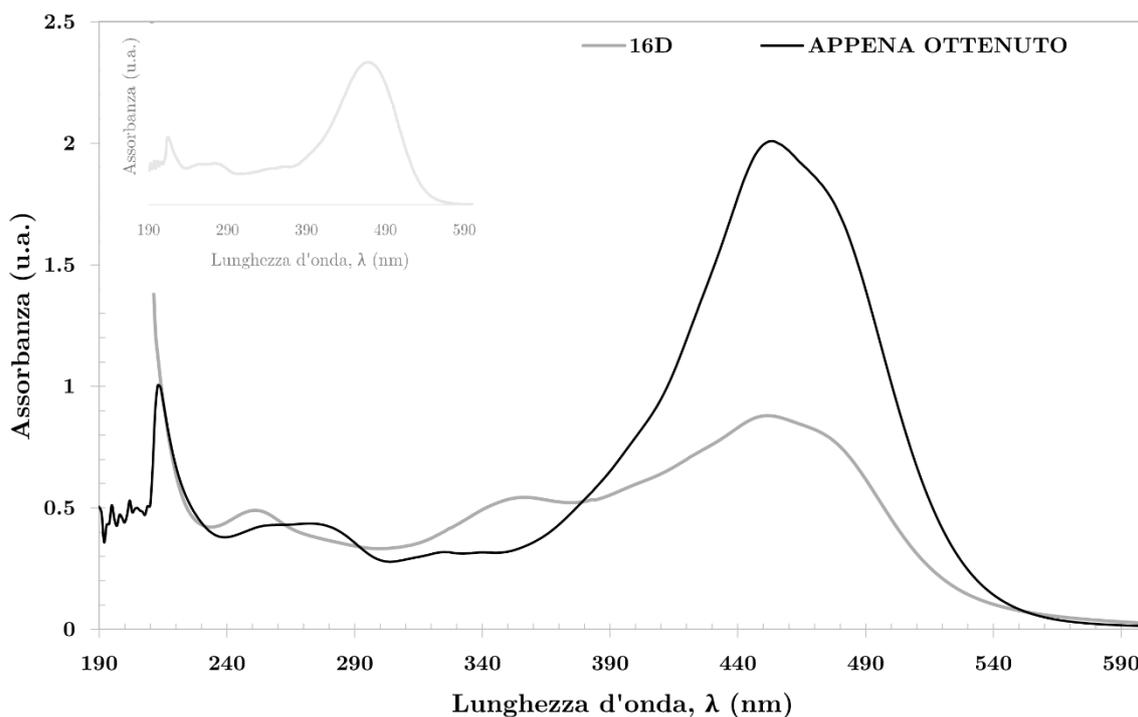


Figura 6. Confronto tra gli spettri di PREHYBRID_RAW_3 diluito 1:20 con NaOH 0.05 M appena ottenuto e dopo 16 giorni. Inserto: spettro di assorbimento della curcumina in NaOH (concentrazione 7 ppm) [238].

L'effetto più evidente della parziale degradazione di curcumina (dovuta al fatto che l'ambiente sia basico) è la riduzione in intensità del picco intorno a 453 nm. Insieme a tale effetto, si evidenziano altre due differenze tra gli spettri:

- L'assorbanza a 350 nm circa è aumentata;
- La "gobbetta" a circa 270 nm si è spostata a lunghezze d'onda minori (circa 250 nm).

Per quanto riguarda l'assorbanza a 350 nm, come già osservato nel Capitolo 7, essa è ampiamente documentata in letteratura ed è probabilmente un effetto secondario della degradazione della curcumina in ambienti basici [263, 264]. Essendo tale assorbanza non nulla anche in soluzioni di sola curcumina in NaOH, come evidente nell'inserto di Figura 6, essa è probabilmente dovuta a funzioni molecolari già presenti nella molecola di curcumina, che si riarrangiano nel processo di degradazione. Nella Tabella 2 è riassunto il confronto tra le assorbanze a 453 nm e a 350 nm.

Tabella 2. Confronto tra le assorbanze a 453 e 350 nm dopo 16 giorni dall'ottenimento di PREHYBRID_RAW_3.

	Appena ottenuto	Dopo 16 giorni	Rapporto post/pre
453	2.01	0.88	0.44
350	0.32	0.53	1.67

Il confronto tra gli spettri UV-VIS di HYBRID_RAW_3_fil diluito 1:20 con NaOH 0.05 M appena ottenuto e dopo 16 giorni è mostrato in Figura 7. Appena ottenuto, il filtrato contiene presumibilmente residui di CTAB, curcumina deprotonata non degradata (è infatti presente il picco causato dalla curcumina deprotonata a 465 nm) e TEOS (come stimato nel Capitolo 6).

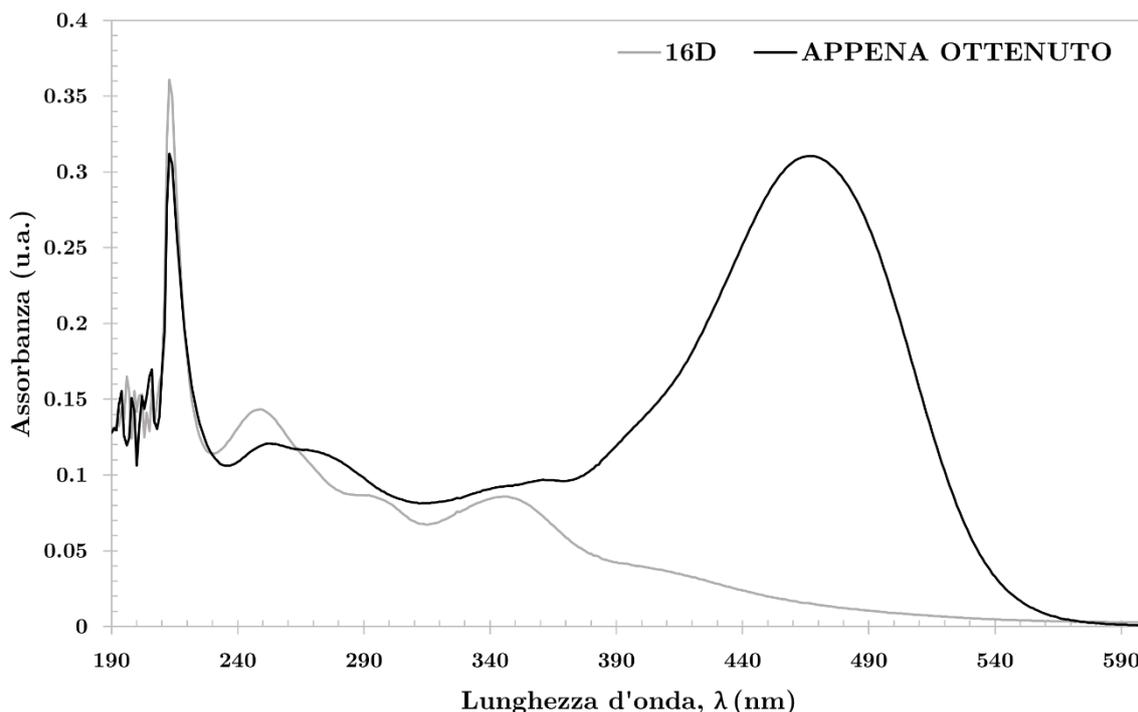


Figura 7. Confronto tra gli spettri di HYBRID_RAW_3_fil appena ottenuto e dopo 16 giorni.

Come già osservato per PREHYBRID_RAW_3, il principale effetto della degradazione della curcumina è la riduzione dell'assorbanza a 460 nm circa. In Figura 8 è mostrato lo spettro UV-VIS di un filtrato di simile composizione, registrato dopo 29 giorni dall'ottenimento di tale filtrato in un lavoro precedente [238].

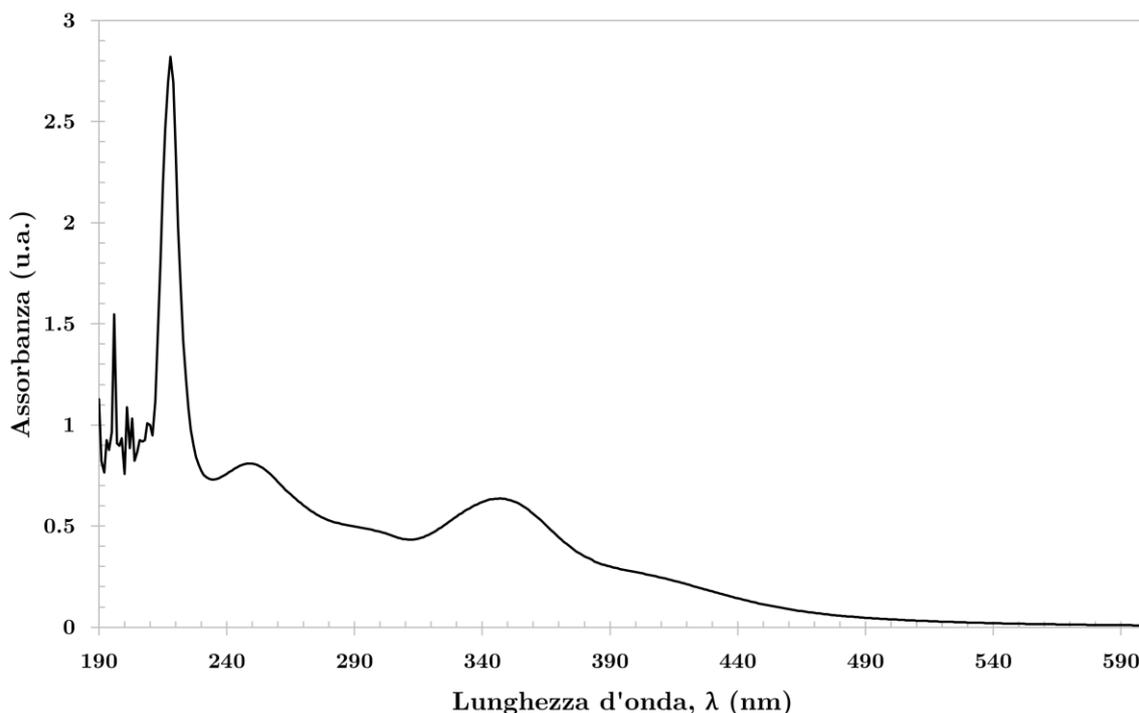


Figura 8. Spettro UV-VIS su filtrato a 29 giorni dall'ottenimento del filtrato, da lavoro precedente [238].

Per entrambi gli spettri a distanza di tempo (Figura 7 e Figura 8) sono presenti:

- Un picco a 216 nm, probabile indice della presenza di CTAB in NaOH come già osservato nel Capitolo 6;
- Un picco a 250 nm;
- Una spalla a 300 nm circa;
- Un picco a 350 nm.

Questa “struttura” dello spettro UV-VIS è stata già riscontrata per i filtrati di HYBRID_FILTRATE_1 e HYBRID_FILTRATE_2, nonché per HYBRID_RAW_2_fil_1D. In HYBRID_FILTRATE_1 non è più presente curcumina ma, presumibilmente, dei suoi prodotti di degradazione cromofori (Capitolo 6); in HYBRID_FILTRATE_2 è presente della curcumina, ma quella non incorporata è andata incontro a degradazione (Capitolo 7).

Volendo generalizzare queste osservazioni, è possibile ipotizzare quanto segue:

- La curcumina, come già noto dalla letteratura, si degrada anche in poche ore quando è inserita in un mezzo basico;
- La degradazione della curcumina è ridotta quando questa si trovi inserita nelle micelle di CTAB, come nel caso di PREHYBRID_RAW_3: l'incorporamento della curcumina nelle micelle la stabilizza, consentendo di mantenere una certa assorbanza a 453 nm anche a distanza di tempo (Figura 6);
- Nei filtrati la concentrazione di CTAB è certamente inferiore rispetto ai preparati pre-sintesi: nel Capitolo 6 si è persino stimato che non rimanga CTAB nel filtrato, perciò è probabile che il filtrato contenga CTAB in concentrazione al di sotto della sua CMC. In questa situazione, la curcumina può trovarsi libera in un ambiente basico, non protetta dalle micelle, e degradarsi più rapidamente.

La soluzione ipotizzata nel Capitolo 7, vale a dire, l'aggiunta di CTAB non appena ottenuto il filtrato, è utile ma non rappresenta una soluzione definitiva al problema; in futuro si dovranno sperimentare soluzioni aggiuntive per proteggere la curcumina presente nel filtrato.

Bibliografia

- [1] J. Rojo, A. Sousa-Herves e A. Mascaraque, «Perspectives of Carbohydrates in Drug Discovery,» in *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, Elsevier, 2017, p. 577–610.
- [2] M. Manzano, V. Aina, C. O. Areán, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M. R. Delgado e M. Vallet-Regí, «Studies on MCM-41 Mesoporous Silica for Drug Delivery: Effect of Particle Morphology and Amine Functionalization,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 137, p. 30–37, 3 2008.
- [3] F. Chen, G. Hableel, E. R. Zhao e J. V. Jokerst, «Multifunctional Nanomedicine with Silica: Role of Silica in Nanoparticles for Theranostic, Imaging, and Drug Monitoring,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 521, p. 261–279, 7 2018.
- [4] P. P. Pednekar, S. C. Godiyal, K. R. Jadhav e V. J. Kadam, «Chapter 23 - Mesoporous Silica Nanoparticles: A Promising Multifunctional Drug Delivery System,» in *Nanostructures for Cancer Therapy*, A. Ficai e A. M. Grumezescu, A cura di, Elsevier, 2017, p. 593–621.
- [5] W. Stöber, A. Fink e E. Bohn, «Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 26, pp. 62-69, 1968.
- [6] C. A. Stewart, Y. Finer e B. D. Hatton, «Drug Self-Assembly for Synthesis of Highly-Loaded Antimicrobial Drug-Silica Particles,» *Scientific Reports*, vol. 8, 1 2018.
- [7] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani e H. Ichikawa, «CURCUMIN: THE INDIAN SOLID GOLD,» in *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Boston, Springer US, 2007, p. 1–75.
- [8] K. Priyadarsini, «The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent,» *Molecules*, vol. 19, p. 20091–20112, 12 2014.
- [9] Z. Rafiee, M. Nejatian, M. Daeihamed e S. M. Jafari, «Application of different nanocarriers for encapsulation of curcumin,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 59, pp. 3468-3497, 2019.
- [10] B. C. Hancock e M. Parks, «What is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals?,» *Pharmaceutical Research*, vol. 17, p. 397–404, 2000.
- [11] H. Hosseinkhani, *Nanomaterials in Advanced Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2019.
- [12] O. W. Flörke, H. A. Graetsch, F. Brunk, L. Benda, S. Paschen, H. E. Bergna, W. O. Roberts, W. A. Welsh, C. Libanati, M. Ettliger, D. Kerner, M. Maier, W. Meon, R. Schmoll, H. Gies e D. Schiffmann, «Silica,» in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, American Cancer Society, 2008.
- [13] P. Innocenzi, *The Sol-to-Gel Transition*, Springer International Publishing, 2019.
- [14] L. L. Hench e J. K. West, «The sol-gel process,» *Chemical Reviews*, vol. 90, pp. 33-72, 1990.
- [15] Z. . A. ALOthman, «A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials,» *Materials*, vol. 5, pp. 2874-2902, 2012.
- [16] J. Wen e G. L. Wilkes, «Organic/inorganic Hybrid Network Materials by the Sol–gel Approach,» *Chemistry of Materials*, vol. 8, pp. 1667-1681, 1996.
- [17] C. Schaschke, *Dictionary of Chemical Engineering*, Oxford University Press, 2014.

- [18] C. J. Brinker, «Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure,» *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 100, pp. 31-50, 1988.
- [19] H. Dong, Z. Zhang, M.-H. Lee, D. W. Mueller e R. F. Reidy, «Sol-Gel Polycondensation of Methyltrimethoxysilane in Ethanol Studied by ²⁹Si NMR Spectroscopy Using a Two-Step Acid/Base Procedure,» *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 41, p. 11–17, 10 2006.
- [20] R. Narayan, U. Nayak, A. Raichur e S. Garg, «Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances,» *Pharmaceutics*, vol. 10, p. 118, 8 2018.
- [21] A. Van Blaaderen, J. Van Geest e A. Vrij, «Monodisperse Colloidal Silica Spheres from Tetraalkoxysilanes: Particle Formation and Growth Mechanism,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 154, pp. 481-501, 1992.
- [22] C. E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau e S. Mann, «Nanoscale Materials with Mesostructured Interiors,» *Advanced Materials*, vol. 13, pp. 649-652, 2001.
- [23] S. Sadasivan, C. E. Fowler, D. Khushalani e S. Mann, «Nucleation of MCM-41 Nanoparticles by Internal Reorganization of Disordered and Nematic-like Silica–surfactant Clusters,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 41, pp. 2151-2153, 2002.
- [24] H. Mehmood, S. Yaqoob, D. Gohar e B. Ahmad, «Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review,» *Journal of Developing Drugs*, vol. 06, 1 2017.
- [25] A. D. Macnaught e A. Wilkinson, *Compendium of Chemical Terminology: Iupac Recommendations*, 2^a Edizione a cura di, Blackwell Science, 1997.
- [26] P. P. Pednekar, S. C. Godiyal, K. R. Jadhav e V. J. Kadam, «Mesoporous Silica Nanoparticles: A Promising Multifunctional Drug Delivery System,» in *Nanostructures for Cancer Therapy*, A. Ficai e A. M. Grumezescu, A cura di, Elsevier, 2017, p. 593–621.
- [27] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen e J. B. e. S. J. L. Higgins, «A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 114, n. 27, pp. 10834-10843, 1992.
- [28] V. Chiola, J. E. Ritsko e C. D. Vanderpool, «Process for Producing Low-bulk Density Silica». Brevetto 3556725, 1971.
- [29] F. Di Renzo, H. Cambon e R. Dutartre, «A 28-year-old Synthesis of Micelle-Templated Mesoporous Silica,» *Microporous Materials*, vol. 10, pp. 283-286, 1997.
- [30] T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda e C. Kato, «The Preparation of Alkyltriethylammonium–Kaneinite Complexes and Their Conversion to Microporous Materials,» *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 63, pp. 988-992, 1990.
- [31] J. Daintith e E. Martin, *Dictionary of Science*, Oxford University Press, 2010.
- [32] P. A.-J. Rangel-Yagui e L. C. Tavares, «Micellar Solubilization of Drugs,» *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 8, p. 147–163, 2005.
- [33] Y. Klichko, M. Liong, E. Choi, S. Angelos, A. E. Nel, J. F. Stoddart, F. Tamanoi and J. I. Zink, "Mesostructured Silica for Optical Functionality, Nanomachines, and Drug Delivery," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 92, p. S2–S10, 1 2009.
- [34] M. Grün, I. Lauer e K. K. Unger, «The Synthesis of Micrometer- and Submicrometer-size Spheres of Ordered Mesoporous Oxide MCM-41,» *Advanced Materials*, vol. 9, pp. 254-257, 1997.

- [35] J. C. P. Broekhoff, «Mesopore Determination from Nitrogen Sorption Isotherms: Fundamentals, Scope, Limitations,» in *Preparation of Catalysts II*, vol. 3, B. Delmon, P. Grange, P. Jacobs e G. Poncelet, A cura di, Elsevier, 1979, pp. 663-684.
- [36] N. S. Elbially, S. F. Aboushoushah, B. F. Sofi e A. Noorwali, «Multifunctional Curcumin-loaded Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Chemoprevention and Therapy,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 291, p. 109540, 1 2020.
- [37] C. G. Bavnhøj, M. M. Knopp, C. M. Madsen e K. Löbmann, «The Role Interplay between Mesoporous Silica Pore Volume and Surface Area and Their Effect on Drug Loading Capacity,» *International Journal of Pharmaceutics: X*, vol. 1, p. 100008, 12 2019.
- [38] Y. Wang, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, L. Hu, Q. Zhang, T. Jiang e S. Wang, «Mesoporous Silica Nanoparticles in Drug Delivery and Biomedical Applications,» *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 11, p. 313–327, 2 2015.
- [39] C. A. McCarthy, R. J. Ahern, R. Dontireddy, K. B. Ryan e A. M. Crean, «Mesoporous Silica Formulation Strategies for Drug Dissolution Enhancement: A Review,» *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 13, p. 93–108, 11 2015.
- [40] V. Meynen, P. Cool e E. F. Vansant, «Verified Syntheses of Mesoporous Materials,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 125, pp. 170-223, 2009.
- [41] C.-Y. Chen, S. L. Burkett, H.-X. Li e M. E. Davis, «Studies on mesoporous materials II. Synthesis mechanism of MCM-41,» *Microporous Materials*, vol. 2, p. 27–34, 12 1993.
- [42] J. L. Blin e M. Impéror-Clerc, «Mechanism of Self-assembly in the Synthesis of Silica Mesoporous Materials: In Situ Studies by X-ray and Neutron Scattering,» *Chemical Society Reviews*, vol. 42, p. 4071–4082, 2013.
- [43] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, D. G. Demuth, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi e B. F. Chmelka, «Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphase Arrays,» *Chemistry of Materials*, vol. 6, pp. 1176-1191, 1994.
- [44] T. Nakamura, M. Mizutani, H. Nozaki, N. Suzuki e K. Yano, «Formation Mechanism for Monodispersed Mesoporous Silica Spheres and Its Application to the Synthesis of Core/Shell Particles,» *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 111, p. 1093–1100, 12 2006.
- [45] Z. Yi, L. F. Dumée, C. J. Garvey, C. Feng, F. She, J. E. Rookes, S. Mudie, D. M. Cahill e L. Kong, «A New Insight into Growth Mechanism and Kinetics of Mesoporous Silica Nanoparticles by in Situ Small Angle X-ray Scattering,» *Langmuir*, vol. 31, pp. 8478-8487, 2015.
- [46] S. Kerkhofs, F. Saïdi, N. Vandervoort, G. V. den Mooter, C. Martineau, F. Taulelle e J. A. Martens, «Silica Capsules Enclosing P123 Triblock Copolymer Micelles for Flurbiprofen Storage and Release,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, p. 3054–3061, 2015.
- [47] V. Morales, M. Gutiérrez-Salmerón, M. Balabasquer, J. Ortiz-Bustos, A. Chocarro-Calvo, C. García-Jiménez e R. A. García-Muñoz, «New Drug-Structure-Directing Agent Concept: Inherent Pharmacological Activity Combined with Templating Solid and Hollow-Shell Mesostructured Silica Nanoparticles,» *Advanced Functional Materials*, vol. 26, p. 7291–7303, 8 2016.
- [48] C. G. Sokolik e J.-P. Lellouche, «Hybrid-Silica Nanoparticles as a Delivery System of the Natural Biocide Carvacrol,» *RSC Advances*, vol. 8, n. 64, p. 36712–36721, 2018.

- [49] M. Pagliaro, *I. Functionalized Silicas: The Principles*, Royal Society of Chemistry, 2009.
- [50] C. Tourne-Peteilh, S. Begu, D. A. Lerner, A. Galarneau, U. Lafont e J.-M. Devoisselle, «Sol-gel One-pot Synthesis in Soft Conditions of Mesoporous Silica Materials Ready for Drug Delivery System,» *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 61, p. 455–462, 12 2011.
- [51] H. Zheng, C. Gao, B. Peng, M. Shu e S. Che, «pH-Responsive Drug Delivery System Based on Coordination Bonding in a Mesoporous Surfactant/Silica Hybrid,» *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, p. 7230–7237, 3 2011.
- [52] M. Manzano e M. Vallet-Regí, «Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery,» *Advanced Functional Materials*, vol. 30, p. 1902634, 9 2019.
- [53] X. Lv, L. Zhang, F. Xing e H. Lin, «Controlled Synthesis of Monodispersed Mesoporous Silica Nanoparticles: Particle Size Tuning and Formation Mechanism Investigation,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 225, p. 238–244, 2016.
- [54] T. Ribeiro, A. S. Rodrigues, S. Calderon, A. Fidalgo, J. L. M. Gonçalves, V. André, M. T. Duarte, P. J. Ferreira, J. P. S. Farinha e C. Baleizão, «Silica Nanocarriers with User-defined Precise Diameters by Controlled Template Self-assembly,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 561, p. 609–619, 3 2020.
- [55] H. Yamada, C. Urata, S. Higashitamori, Y. Aoyama, Y. Yamauchi e K. Kuroda, «Critical Roles of Cationic Surfactants in the Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles: Control of Mesoporous Structure, Particle Size, and Dispersion,» *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 6, p. 3491–3500, 2 2014.
- [56] K. Suzuki, K. Ikari e H. Imai, «Synthesis of Silica Nanoparticles Having a Well-Ordered Mesoporous Structure Using a Double Surfactant System,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, p. 462–463, 1 2004.
- [57] M. Vallet-Regí, F. Balas e D. Arcos, «Mesoporous Materials for Drug Delivery,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, p. 7548–7558, 2007.
- [58] S. F. Soares, T. Trindade e A. L. D. da-Silva, «Carrageenan-Silica Hybrid Nanoparticles Prepared by a Non-Emulsion Method,» *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 2015, p. 4588–4594, 8 2015.
- [59] J. G. Croissant, Y. Fatiev, A. Almalik e N. M. Khashab, «Mesoporous Silica and Organosilica Nanoparticles: Physical Chemistry, Biosafety, Delivery Strategies, and Biomedical Applications,» *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, p. 1700831, 11 2017.
- [60] Q. He, Y. Gao, L. Zhang, W. Bu, H. Chen, Y. Li e J. Shi, «One-Pot Self-Assembly of Mesoporous Silica Nanoparticle-Based pH-Responsive Anti-Cancer Nano Drug Delivery System,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, p. 15190, 2011.
- [61] F. Tingming, G. Liwei, L. Kang, W. Tianyao e L. Jin, «Template Occluded SBA-15: An Effective Dissolution Enhancer for Poorly Water-Soluble Drug,» *Applied Surface Science*, vol. 256, p. 6963–6968, 9 2010.
- [62] S. F. Chin, K. } Iyer, M. Saunders, T. G. St. Pierre, C. Buckley, M. Paskevicius e C. L. Raston, «Encapsulation and Sustained Release of Curcumin using Superparamagnetic Silica Reservoirs,» *Chemistry - A European Journal*, vol. 15, p. 5661–5665, 6 2009.
- [63] M. Sayehi, H. Tounsi, G. Garbarino, P. Riani e G. Busca, «Reutilization of Silicon- and Aluminum- Containing Wastes in the Perspective of the Preparation of SiO₂-Al₂O₃ Based Porous Materials for Adsorbents and Catalysts,» *Waste Management*, vol. 103, p. 146–158, 2 2020.

- [64] R. K. Iler, *2.1.1 Manufacture*, John Wiley & Sons, 1979.
- [65] H. Misran, R. Singh, S. Begum e M. A. Yarmo, «Processing of mesoporous silica materials (MCM-41) from coal fly ash,» *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 186, p. 8–13, 5 2007.
- [66] B. Purnawira, H. Purwaningsih, Y. Ervianto, V. M. Pratiwi, D. Susanti, R. Rochiem e A. Purniawan, «Synthesis and Characterization of Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNp) MCM-41 from Natural Waste Rice Husk,» *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 541, p. 012018, 7 2019.
- [67] L.-Y. Lin e H. Bai, «Efficient Method for Recycling Silica Materials from Waste Powder of the Photonic Industry,» *Environmental Science & Technology*, vol. 47, p. 4636–4643, 4 2013.
- [68] Z.-S. Liu, W.-K. Li e C.-Y. Huang, «Synthesis of Mesoporous Silica Materials from Municipal Solid Waste Incinerator Bottom Ash,» *Waste Management*, vol. 34, p. 893–900, 5 2014.
- [69] M. Bhagiyalakshmi, L. J. Yun, R. Anuradha e H. T. Jang, «Utilization of Rice Husk Ash As Silica Source for the Synthesis of Mesoporous Silicas and Their Application to CO₂ Adsorption through TREN/TEPA Grafting,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 175, p. 928–938, 3 2010.
- [70] P. Anguita, J. M. García-Vargas, F. Gaillard, E. Iojoiu, S. Gil e A. Giroir-Fendler, «Effect of Na, K, Ca and P-impurities on Diesel Oxidation Catalysts (DOCs),» *Chemical Engineering Journal*, vol. 352, p. 333–342, 11 2018.
- [71] C. M. Balonek, A. H. Lillebø, S. Rane, E. Rytter, L. D. Schmidt e A. Holmen, «Effect of Alkali Metal Impurities on Co–Re Catalysts for Fischer–Tropsch Synthesis from Biomass-Derived Syngas,» *Catalysis Letters*, vol. 138, p. 8–13, 5 2010.
- [72] G. B. Alexander, W. M. Heston e R. K. Iler, «The Solubility of Amorphous Silica in Water,» *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 58, p. 453–455, 6 1954.
- [73] K. Okada, N. Arimitsu, Y. Kameshima, A. Nakajima e K. J. D. MacKenzie, «Preparation of Porous Silica from Chlorite by Selective Acid Leaching,» *Applied Clay Science*, vol. 30, p. 116–124, 9 2005.
- [74] P. D. Du, D. Q. Khieu e T. T. Hoa, «Removal of Organic Template from Mesoporous MCM-41,» *Journal of Science*, vol. 69, 2011.
- [75] H.-L. Chang, C.-M. Chun, I. A. Aksay e W.-H. Shih, «Conversion of Fly Ash into Mesoporous Aluminosilicate,» *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 38, p. 973–977, 3 1999.
- [76] A. I. Zaitsev, N. E. Shelkova, N. P. Lyakishev e B. M. Mogutnov, «Thermodynamic Properties and Phase Equilibria in the Na₂O–SiO₂ System,» *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 1, p. 1899–1907, 1999.
- [77] F. Habashi, «Alkali Fusion,» p. 153–159, 12 2017.
- [78] C. L. Carlson e D. C. Adriano, «Environmental Impacts of Coal Combustion Residues,» *Journal of Environmental Quality*, vol. 22, p. 227–247, 4 1993.
- [79] X. Zhang, «Management of Coal Combustion Wastes,» *IEA Clean Coal Centre*, p. 2–68, 2014.
- [80] P. Kumar, N. Mal, Y. Oumi, K. Yamana e T. Sano, «Mesoporous Materials Prepared Using Coal Fly Ash as the Silicon and Aluminium Source,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 11, p. 3285–3290, 10 2001.

- [81] A. Walia e N. K. Mehra, «A Seasonal Assessment of the Impact of Coal Fly Ash Disposal on the River Yamuna, Delhi,» *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 103, p. 277–314, 1998.
- [82] K. S. Hui e C. Y. H. Chao, «Synthesis of MCM-41 from Coal Fly Ash by a Green Approach: Influence of Synthesis pH,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 137, p. 1135–1148, 9 2006.
- [83] H. Kazemian, Z. Naghdali, T. G. Kashani e F. Farhadi, «Conversion of High Silicon Fly Ash to Na-P1 Zeolite: Alkaline Fusion Followed by Hydrothermal Crystallization,» *Advanced Powder Technology*, vol. 21, p. 279–283, 5 2010.
- [84] G. Ferraiolo, M. Zilli e A. Converti, «Fly Ash Disposal and Utilization,» *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 47, p. 281–305, 4 2007.
- [85] Y.-R. Lee, J. T. Soe, S. Zhang, J.-W. Ahn, M. B. Park e W.-S. Ahn, «Synthesis of Nanoporous Materials Via Recycling Coal Fly Ash and Other Solid Wastes: A Mini Review,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 317, p. 821–843, 6 2017.
- [86] A. Yoshida e K. Inoue, «Formation of Faujasite-type Zeolite from Ground Shirasu Volcanic Glass,» *Zeolites*, vol. 6, p. 467–473, 11 1986.
- [87] J. L. LaRosa, S. Kwan e M. W. Grutzeck, «Zeolite Formation in Class F Fly Ash Blended Cement Pastes,» *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 75, p. 1574–1580, 6 1992.
- [88] A. O. Dhokte, S. L. Khillare, M. K. Lande e B. R. Arbad, «Synthesis, Characterization of Mesoporous Silica Materials from Waste Coal Fly Ash for the Classical Mannich Reaction,» *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 17, p. 742–746, 7 2011.
- [89] G. Chandrasekar, K.-S. You, J.-W. Ahn e W.-S. Ahn, «Synthesis of Hexagonal and Cubic Mesoporous Silica Using Power Plant Bottom Ash,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 111, p. 455–462, 4 2008.
- [90] T.-H. Liou, «A Green Route to Preparation of MCM-41 Silicas with Well-ordered Mesostructure Controlled in Acidic and Alkaline Environments,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 171, pp. 1458-1468, 2011.
- [91] J. Chun e J. H. Lee, «Recent Progress on the Development of Engineered Silica Particles Derived from Rice Husk,» *Sustainability*, vol. 12, p. 10683, 12 2020.
- [92] M. R. Abukhadra e M. Shaban, «Recycling of Different Solid Wastes in Synthesis of High-order Mesoporous Silica as Adsorbent for Safranin Dye,» *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 16, p. 7573–7582, 1 2019.
- [93] H. T. Jang, Y. Park, Y. S. Ko, J. Y. Lee e B. Margandan, «Highly Siliceous MCM-48 from Rice Husk Ash for CO₂ Adsorption,» *International Journal of Greenhouse Gas Control*, vol. 3, p. 545–549, 9 2009.
- [94] W. J. Zhu, Y. Zhou, W. H. Ma, M. M. Li, J. Yu e K. Q. Xie, «Recovery of Mesoporous Silica from Waste Rice Husk Ash of Biomass Energy Industry,» *Advanced Materials Research*, Vol. 1 di 2430-432, p. 873–876, 1 2012.
- [95] U. Kalapathy, A. Proctor e J. Shultz, «A Simple Method for Production of Pure Silica from Rice Hull Ash,» *Bioresource Technology*, vol. 73, pp. 257-262, 2000.
- [96] T.-H. Liou e C.-C. Yang, «Synthesis and Surface Characteristics of Nanosilica Produced from Alkali-extracted Rice Husk Ash,» *Materials Science and Engineering: B*, vol. 176, p. 521–529, 4 2011.

- [97] W. K. Setiawan e K.-Y. Chiang, «Crop Residues as Potential Sustainable Precursors for Developing Silica Materials: A Review,» *Waste and Biomass Valorization*, 6 2020.
- [98] Y. Ma, H. Chen, Y. Shi e S. Yuan, «Low Cost Synthesis of Mesoporous Molecular Sieve MCM-41 from Wheat Straw Ash Using CTAB As Surfactant,» *Materials Research Bulletin*, vol. 77, p. 258–264, 5 2016.
- [99] A. Abburi, M. Ali e P. V. Moriya, «Synthesis of mesoporous silica nanoparticles from waste hexafluorosilicic acid of fertilizer industry,» *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 9, p. 8074–8080, 7 2020.
- [100] P. B. Sarawade, J.-K. Kim, A. Hilonga e H. T. Kim, «Recovery of High Surface Area Mesoporous Silica from Waste Hexafluorosilicic Acid (H₂SiF₆) of Fertilizer Industry,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 173, p. 576–580, 1 2010.
- [101] J. Aigueperse, P. Mollard, D. Devilliers, M. Chemla, R. Faron, R. Romano e J. P. Cuer, «Fluorine Compounds, Inorganic,» in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, American Cancer Society, 2000.
- [102] T. Liu, F. Jin, X. Wang, Y. Fan e M. Yuan, «Synthesis of Titanium Containing MCM-41 from Industrial Hexafluorosilicic Acid As Epoxidation Catalyst,» *Catalysis Today*, vol. 297, p. 316–323, 11 2017.
- [103] M. A. Vacca, C. Cara, V. Mameli, M. S. Angotzi, M. A. Scorciapino, M. G. Cutrufello, A. Musinu, V. Tyrpekl, L. Pala e C. Cannas, «Hexafluorosilicic Acid (FSA): from Hazardous Waste to Precious Resource in Obtaining High Value-Added Mesostructured Silica,» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 8, p. 14286–14300, 8 2020.
- [104] J. A. S. Costa e C. M. Paranhos, «Mitigation of Silica-rich Wastes: An Alternative to the Synthesis Eco-friendly Silica-based Mesoporous Materials,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 309, p. 110570, 12 2020.
- [105] A. Borthakur e M. Govind, «Emerging Trends in Consumers' E-waste Disposal Behaviour and Awareness: A Worldwide Overview with Special Focus on India,» *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 117, p. 102–113, 2 2017.
- [106] W. Li e V. Achal, «Environmental and Health Impacts Due to E-waste Disposal in China – A Review,» *Science of The Total Environment*, vol. 737, p. 139745, 10 2020.
- [107] L.-Y. Lin, J.-T. Kuo e H. Bai, «Silica Materials Recovered from Photonic Industrial Waste Powder: Its Extraction, Modification, Characterization and Application,» *Journal of Hazardous Materials*, 5 2011.
- [108] C.-M. Ma e R.-T. Ruan, «Adsorption of Toluene on Mesoporous Materials from Waste Solar Panel as Silica Source,» *Applied Clay Science*, Vol. %1 di %280-81, p. 196–201, 8 2013.
- [109] H. de Vries, G. M. J. B. van Henegouwen e F. A. Huf, «Photochemical Decomposition of Chloramphenicol in a 0.25% Eyedrop and in a Therapeutic Intraocular Concentration,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 20, p. 265–271, 7 1984.
- [110] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Stability Testing of New Drug Substances and Products - Q1A(R2)*, 2003.
- [111] H. H. Tønnesen, «Formulation and Stability Testing of Photolabile Drugs,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 225, p. 1–14, 8 2001.
- [112] H.-K. Rouette, «Encyclopedia of Textile Finishing,» Woodhead Publishing, 2001.
- [113] S. Yoshioka, *Stability of Drugs and Dosage Forms*, New York: Kluwer Academic, 2002.

- [114] K. Y. Janga, T. King, N. Ji, S. Sarabu, G. Shadambikar, S. Sawant, P. Xu, M. A. Repka e S. N. Murthy, «Photostability Issues in Pharmaceutical Dosage Forms and Photostabilization,» *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, p. 48–59, 9 2017.
- [115] S. R. Béchar, O. Quraishi e E. Kwong, «Film Coating: Effect of Titanium Dioxide Concentration and Film Thickness on the Photostability of Nifedipine,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 87, p. 133–139, 11 1992.
- [116] H. Tønnesen e J. Karlsen, «Studies on Curcumin and Curcuminoids. X. The Use of Curcumin as a Formulation Aid to Protect Light-sensitive Drugs in Soft Gelatin Capsules,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 38, p. 247–249, 8 1987.
- [117] H. Kalasz e I. Antal, «Drug Excipients,» *Current Medicinal Chemistry*, vol. 13, p. 2535–2563, 9 2006.
- [118] K. Uekama, F. Hirayama e T. Irie, «Cyclodextrin Drug Carrier Systems,» *Chemical Reviews*, vol. 98, p. 2045–2076, 7 1998.
- [119] International Food Information Service, *Dictionary of Food Science & Technology*, 2^a edizione a cura di, International Food Information Service (IFIS Publishing), 2009.
- [120] B. S. Pattni, V. V. Chupin e V. P. Torchilin, «New Developments in Liposomal Drug Delivery,» *Chemical Reviews*, vol. 115, p. 10938–10966, 5 2015.
- [121] F. Franks, *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, Royal Society of Chemistry, 2007.
- [122] C. Ahlneck e G. Zografi, «The Molecular Basis of Moisture Effects on the Physical and Chemical Stability of Drugs in the Solid State,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 62, p. 87–95, 7 1990.
- [123] S. Yoshioka e Y. Aso, «Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability During Storage of Amorphous Pharmaceuticals,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 96, p. 960–981, 5 2007.
- [124] S. Thakral, R. Govindarajan e R. Suryanarayanan, «Processing-Induced Phase Transformations and Their Implications on Pharmaceutical Product Quality,» in *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2018, pp. 329–380.
- [125] Y. Y. Shen, S. R. Guo, K. P. Ruan, W. L. Chen e D. W. Guo, «Effects of Highly Hygroscopic Excipients on the Hydrolysis of Simvastatin in Tablet at High Relative Humidity,» *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 74, p. 527, 2012.
- [126] K. C. Waterman, R. C. Adami, K. M. Alsante, A. S. Antipas, D. R. Arenson, R. Carrier, J. Hong, M. S. Landis, F. Lombardo, J. C. Shah, E. Shalaev, S. W. Smith e H. Wang, «Hydrolysis in Pharmaceutical Formulations,» *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 7, p. 113–146, 1 2002.
- [127] K. Xiao, «Degradation Chemistry and Product Development,» in *Analytical Scientists in Pharmaceutical Product Development*, K. Xiao, A cura di, John Wiley & Sons, Ltd, 2020, p. 151–191.
- [128] M. F. Powell, «Stability of Lidocaine in Aqueous Solution: Effect of Temperature, pH, Buffer, and Metal Ions on Amide Hydrolysis,» *Pharmaceutical Research*, vol. 4, p. 42–45, 1987.
- [129] S. M. Mitchell, J. L. Ullman, A. L. Teel e R. J. Watts, «pH and Temperature Effects on the Hydrolysis of Three β -lactam Antibiotics: Ampicillin, Cefalotin and Cefoxitin,» *Science of The Total Environment*, Vol. 51 di 2466-467, p. 547–555, 1 2014.

- [130] W. H. Brown, B. L. Iverson, E. V. Anslyn e C. S. Foote, *Chimica organica*, Sixth a cura di, Edises, 2020.
- [131] Y. Hirakura, M. Nakamura, T. Wakasawa, K. Ban, S. Yokota e S. Kitamura, «Excipient Hydrolysis and Ester Formation Increase pH in a Parenteral Solution Over Aging,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 325, p. 26–38, 11 2006.
- [132] S. V. Canevarolo Jr., Hanser Publishers, 2020.
- [133] T. E. Creighton, *11.1.4 Heat Denaturation*, Helvetian Press, 2010.
- [134] K. C. Waterman e R. C. Adami, «Accelerated Aging: Prediction of Chemical Stability of Pharmaceuticals,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 293, n. 1-2, p. 101–125, 4 2005.
- [135] A. Schön, B. R. Clarkson, M. Jaime e E. Freire, «Temperature Stability of Proteins: Analysis of Irreversible Denaturation Using Isothermal Calorimetry,» *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 85, p. 2009–2016, 8 2017.
- [136] J. Jezek, D. Chen, L. Watson, J. Crawford, S. Perkins, A. Tyagi e L. J. Braun, «A Heat-stable Hepatitis B Vaccine Formulation,» *Human Vaccines*, vol. 5, p. 529–535, 8 2009.
- [137] E. S. Dolinina, E. Y. Akimsheva e E. V. Parfenyuk, «Development of Novel Silica-Based Formulation of α -Lipoic Acid: Evaluation of Photo and Thermal Stability of the Encapsulated Drug,» *Pharmaceutics*, vol. 12, p. 228, 3 2020.
- [138] M. B. Gomes e C. A. Negrato, «Alpha-lipoic Acid as a Pleiotropic Compound with Potential Therapeutic Use in Diabetes and Other Chronic Diseases,» *Diabetology & Metabolic Syndrome*, vol. 6, p. 80, 7 2014.
- [139] A. Hawe, R. Poole, S. Romeijn, P. Kasper, R. van der Heijden e W. Jiskoot, «Towards Heat-stable Oxytocin Formulations: Analysis of Degradation Kinetics and Identification of Degradation Products,» *Pharmaceutical Research*, vol. 26, p. 1679–1688, 4 2009.
- [140] A. N. J. A. de Groot, Y. A. Hekster, T. B. Vree e P. W. J. Dongen, «Oxytocin and Desamino-oxytocin Tablets Are Not Stable under Simulated Tropical Conditions,» *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, vol. 20, p. 115–119, 4 1995.
- [141] S. W. Hovorka e C. Schöneich, «Oxidative Degradation of Pharmaceuticals: Theory, Mechanisms and Inhibition,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 90, p. 253–269, 3 2001.
- [142] P. Lienard, J. Gavartin, G. Boccardi e M. Meunier, «Predicting Drug Substances Autoxidation,» *Pharmaceutical Research*, vol. 32, p. 300–310, 8 2014.
- [143] P. Dixon, K. Powell e A. Chauhan, «Novel Approaches for Improving Stability of Cysteamine Formulations,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 549, p. 466–475, 10 2018.
- [144] A. L. Freed, H. E. Strohmeyer, M. Mahjour, V. Sadineni, D. L. Reid e C. A. Kingsmill, «pH Control of Nucleophilic/electrophilic Oxidation,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 357, p. 180–188, 6 2008.
- [145] C. Won, «Photolytic and Oxidative Degradation of an Antiemetic Agent, RG 12915,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 121, p. 95–105, 7 1995.
- [146] National Center for Biotechnology Information, *PubChem Compound Summary for CID 969516, Curcumin*, 2021.
- [147] S. Shishodia, «Curcumin: Getting Back to the Roots,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1056, p. 206–217, 11 2005.

- [148] S. Singh e B. B. Aggarwal, «Activation of Transcription Factor $\{NF\}-\{\upkappa\}B$ Is Suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane),» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, p. 24995–25000, 10 1995.
- [149] A. Goel, A. B. Kunnumakkara e B. B. Aggarwal, «Curcumin as "Curecumin": From Kitchen to Clinic,» *Biochemical Pharmacology*, vol. 75, p. 787–809, 2 2008.
- [150] I. Chattopadhyay, K. Biswas, U. Bandyopadhyay e R. K. Banerjee, «Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications,» *Current Science*, vol. 87, p. 44–53, 2004.
- [151] M. Farazuddin, B. Dua, Q. Zia, A. Khan, B. Joshi e M. Owais, «Chemotherapeutic potential of curcumin-bearing microcells against hepatocellular carcinoma in model animals,» *International journal of nanomedicine*, vol. 9, pp. 1139-52, 3 2014.
- [152] H. Yu e Q. Huang, «Improving the Oral Bioavailability of Curcumin Using Novel Organogel-Based Nanoemulsions,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, pp. 5373-5379, 2012.
- [153] K. I. Priyadarsini, «Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells,» *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 10, pp. 81-95, 2009.
- [154] M. L. Del Prado - Audelo, I. Caballero-Florán, J. Meza-Toledo, N. Mendoza-Muñoz, M. González-Torres, G. Leyva-Gómez, B. Florán e H. Cortés, «Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases,» *Biomolecules*, vol. 9, n. 2, p. 56, 2 2019.
- [155] Y.-J. Wang, M.-H. Pan, A.-L. Cheng, L.-I. Lin, Y.-S. Ho, C.-Y. Hsieh e J.-K. Lin, «Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 15, pp. 1867-1876, 1997.
- [156] S. Mondal, S. Ghosh e S. P. Moulik, «Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study,» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 158, pp. 212-218, 2016.
- [157] H. H. Tønnesen e J. Karlsen, «Studies on curcumin and curcuminoids,» *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, vol. 180, p. 132–134, 2 1985.
- [158] M. Heger, R. F. van Golen, M. Broekgaarden e M. C. Michel, «The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer,» *Pharmacological Reviews*, vol. 66, p. 222–307, 12 2013.
- [159] N. Hoang, L. Xuan Hung, P. Thảng, V. Chinh, L. Vu, P. Dung, T. Trung e P. T. Nga, «Fabrication and vibration characterization of curcumin extracted from turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes of the northern Vietnam,» *SpringerPlus*, vol. 5, 12 2016.
- [160] T. Esatbeyoglu, P. Huebbe, I. M. A. Ernst, D. Chin, A. E. Wagner e G. Rimbach, «Curcumin—From Molecule to Biological Function,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 51, pp. 5308-5332, 2012.
- [161] L. Shen e H.-F. Ji, «Theoretical study on physicochemical properties of curcumin,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 67, pp. 619-623, 2007.
- [162] F. Payton, P. Sandusky e W. L. Alworth, «NMR Study of the Solution Structure of Curcumin,» *Journal of Natural Products*, vol. 70, p. 143–146, 2 2007.
- [163] M. R. Couto, J. L. Rodrigues e L. R. Rodrigues, «Optimization of fermentation conditions for the production of curcumin by engineered *Escherichia coli*,» *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 14, p. 20170470, 8 2017.

- [164] Y. Katsuyama, M. Matsuzawa, N. Funo e S. Horinouchi, «Production of curcuminoids by *Escherichia coli* carrying an artificial biosynthesis pathway,» *Microbiology*, vol. 154, p. 2620–2628, 9 2008.
- [165] D. Machado, L. R. Rodrigues e I. Rocha, «A kinetic model for curcumin production in *Escherichia coli*,» *Biosystems*, vol. 125, pp. 16-21, 2014.
- [166] A. Zielińska, H. Alves, V. Marques, A. Durazzo, M. Lucarini, T. F. Alves, M. Morsink, N. Willemen, P. Eder, M. V. Chaud, P. Severino, A. Santini e E. B. Souto, «Properties, Extraction Methods, and Delivery Systems for Curcumin as a Natural Source of Beneficial Health Effects,» *Medicina*, vol. 56, p. 336, 7 2020.
- [167] V. P. Paulucci, R. O. Couto, C. C. C. Teixeira e L. A. P. Freitas, «Optimization of the Extraction of Curcumin from *Curcuma Longa* Rhizomes,» *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 23, p. 94–100, 1 2013.
- [168] F. Sahne, M. Mohammadi, G. Najafpour e A. Moghadamnia, «Extraction of Bioactive Compound Curcumin from Turmeric (*Curcuma Longa* L.) Via Different Routes: A Comparative Study,» *Pakistan Journal of Biotechnology*, vol. 13, p. 173–180, 1 2016.
- [169] W. Baumann, S. V. Rodrigues e L. M. Viana, «Pigments and Their Solubility in and Extractability by Supercritical CO₂ - I: The Case of Curcumin,» *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 17, p. 323–328, 9 2000.
- [170] J. Dont, «Analytical Techniques in Aquaculture Research,» 2003. [Online]. Available: <https://aquaculture.ugent.be/Education/coursematerial/online/courses/ATA/analysis/crudprot.htm>. [Consultato il giorno 10 01 2021].
- [171] M. E. M. Braga, P. F. Leal, J. E. Carvalho e M. A. A. Meireles, «Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa*L.) Extracts Obtained Using Various Techniques,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, p. 6604–6611, 10 2003.
- [172] S. M. Khopde, K. I. Priyadarsini, P. Venkatesan e M. N. A. Rao, «Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue,» *Biophysical Chemistry*, vol. 80, p. 85–91, 8 1999.
- [173] L. R. C. Barclay, M. R. Vinqvist, K. Mukai, H. Goto, Y. Hashimoto, A. Tokunaga e H. Uno, «On the Antioxidant Mechanism of Curcumin: Classical Methods Are Needed To Determine Antioxidant Mechanism and Activity,» *Organic Letters*, vol. 2, p. 2841–2843, 9 2000.
- [174] K. I. Priyadarsini, D. K. Maity, G. H. Naik, M. S. Kumar, M. K. Unnikrishnan, J. G. Satav e H. Mohan, «Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin,» *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 35, p. 475–484, 9 2003.
- [175] S. V. Jovanovic, C. W. Boone, S. Steenken, M. Trinoga e R. B. Kaskey, «How Curcumin Works Preferentially with Water Soluble Antioxidants,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp. 3064-3068, 2001.
- [176] T. Masuda, K. Hidaka, A. Shinohara, T. Maekawa, Y. Takeda e H. Yamaguchi, «Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Curcuminoid: Analysis of Radical Reaction Products from Curcumin,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, p. 71–77, 1 1999.
- [177] B. Mishra, K. I. Priyadarsini, M. K. Bhide, R. M. Kadam e H. Mohan, «Reactions of Superoxide Radicals with Curcumin: Probable Mechanisms by Optical Spectroscopy and EPR,» *Free Radical Research*, vol. 38, p. 355–362, 4 2004.

- [178] E. Kunchandy e M. N. A. Rao, «Oxygen Radical Scavenging Activity of Curcumin,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 58, p. 237–240, 2 1990.
- [179] S. K. Borra, P. Gurusurthy, J. Mahendra e others, «Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Curcumin Determined by Using Different in Vitro and Ex Vivo Models,» *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7, p. 2680–2690, 2013.
- [180] F. Zsila, Z. Bikádi e M. Simonyi, «Molecular Basis of the Cotton Effects Induced by the Binding of Curcumin to Human Serum Albumin,» *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 14, p. 2433–2444, 8 2003.
- [181] C. Schneider, O. N. Gordon, R. L. Edwards e P. B. Luis, «Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, p. 7606–7614, 4 2015.
- [182] J. Zhu, K. Z. Sanidad, E. Sukamtoh e G. Zhang, «Potential Roles of Chemical Degradation in the Biological Activities of Curcumin,» *Food & Function*, vol. 8, n. 4, p. 907–914, 2017.
- [183] M. Caillaud, Y. A. Myo, B. McKiver, U. O. Warncke, D. Thompson, J. Mann, E. D. Fabbro, A. Desmoulière, F. Billet e M. Damaj, «Key Developments in the Potential of Curcumin for the Treatment of Peripheral Neuropathies,» *Antioxidants*, vol. 9, p. 950, 10 2020.
- [184] C. R. Ireson, D. J. L. Jones, S. Orr, M. W. H. Coughtrie, D. J. Boocock, M. L. Williams, P. B. Farmer, W. P. Steward e A. J. Gescher, «Metabolism of the Cancer Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Intestine,» *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, vol. 11, p. 105–111, 2002.
- [185] H. Ammon e M. Wahl, «Pharmacology of Curcuma longa,» *Planta Medica*, vol. 57, p. 1–7, 2 1991.
- [186] B. Wahlström e G. Blennow, «A Study on the Fate of Curcumin in the Rat,» *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, vol. 43, p. 86–92, 3 2009.
- [187] G. M. Holder, J. L. Plummer e A. J. Ryan, «The Metabolism and Excretion of Curcumin (1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the Rat,» *Xenobiotica*, vol. 8, p. 761–768, 1 1978.
- [188] K. Jakubczyk, A. Drużga, J. Katarzyna e K. Skonieczna-Żydecka, «Antioxidant Potential of Curcumin—A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials,» *Antioxidants*, vol. 9, p. 1092, 11 2020.
- [189] J. W. Daily, M. Yang e S. Park, «Efficacy of Turmeric Extracts and Curcumin for Alleviating the Symptoms of Joint Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials,» *Journal of Medicinal Food*, vol. 19, pp. 717–729, 2016.
- [190] W. Park, A. R. M. R. Amin, Z. G. Chen e D. M. Shin, «New Perspectives of Curcumin in Cancer Prevention,» *Cancer Prevention Research*, vol. 6, p. 387–400, 3 2013.
- [191] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman e B. B. Aggarwal, «Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises,» *Molecular Pharmaceutics*, vol. 4, p. 807–818, 11 2007.
- [192] P. Izquierdo, J. Esquena, T. F. Tadros, C. Dederen, M. J. Garcia, N. Azemar e C. Solans, «Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method,» *Langmuir*, vol. 18, p. 26–30, 1 2002.
- [193] A. Håkansson e M. Rayner, «General Principles of Nanoemulsion Formation by High-Energy Mechanical Methods,» in *Nanoemulsions*, Elsevier, 2018, p. 103–139.

- [194] A. Gupta, H. B. Eral, T. A. Hatton e P. S. Doyle, «Nanoemulsions: formation, properties and applications,» *Soft Matter*, vol. 12, p. 2826–2841, 2016.
- [195] V. Saxena, A. Hasan, S. Sharma e L. M. Pandey, «Edible oil nanoemulsion: An organic nanoantibiotic as a potential biomolecule delivery vehicle,» *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 67, pp. 410-419, 2018.
- [196] L. Salvia-Trujillo, R. Soliva-Fortuny, M. A. Rojas-Graü, D. J. McClements e O. Martín-Belloso, «Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review,» *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 8, p. 439–466, 2 2017.
- [197] V. K. Rai, N. Mishra, K. S. Yadav e N. P. Yadav, «Nanoemulsion As Pharmaceutical Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery: Formulation Development, Stability Issues, Basic Considerations and Applications,» *Journal of Controlled Release*, vol. 270, p. 203–225, 1 2018.
- [198] Z. A. Sadeq, «Review on Nanoemulsion: Preparation and Evaluation,» *International Journal of Drug Delivery Technology*, vol. 10, p. 187–189, 3 2020.
- [199] S. M. Jafari, Y. He e B. Bhandari, «Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques,» *Journal of Food Engineering*, vol. 82, pp. 478-488, 2007.
- [200] S. M. Jafari, Y. He e B. Bhandari, «Optimization of nano-emulsions production by microfluidization,» *European Food Research and Technology*, vol. 225, p. 733–741, 10 2006.
- [201] M. Kharat, Z. Du, G. Zhang e D. J. McClements, «Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, pp. 1525-1532, 2017.
- [202] T. Feng, Y. Wei, R. Lee e L. Zhao, «Liposomal Curcumin and Its Application in Cancer,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 12, p. 6027–6044, 8 2017.
- [203] M. Sala, K. Miladi, G. Agusti, A. Elaissari e H. Fessi, «Preparation of Liposomes: A Comparative Study between the Double Solvent Displacement and the Conventional Ethanol Injection—from Laboratory Scale to Large Scale,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 524, p. 71–78, 7 2017.
- [204] C. G. Shayne, *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, 10^a edizione a cura di, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- [205] Q.-P. Lin, R.-P. Guo, X.-Y. Xu e C.-H. Liu, «Preparation and Quality Evaluation of Curcumin Liposome for Injection,» *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 5, p. 207–210, 5 2007.
- [206] C. Jaafar-Maalej, R. Diab, V. Andrieu, A. Elaissari e H. Fessi, «Ethanol Injection Method for Hydrophilic and Lipophilic Drug-loaded Liposome Preparation,» *Journal of Liposome Research*, vol. 20, p. 228–243, 11 2009.
- [207] G. H. Shin, S. K. Chung, J. T. Kim, H. J. Joung e H. J. Park, «Preparation of Chitosan-Coated Nanoliposomes for Improving the Mucoadhesive Property of Curcumin Using the Ethanol Injection Method,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, p. 11119–11126, 11 2013.
- [208] M. Takahashi, S. Uechi, K. Takara, Y. Asikin e K. Wada, «Evaluation of an Oral Carrier System in Rats: Bioavailability and Antioxidant Properties of Liposome-Encapsulated Curcumin,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, p. 9141–9146, 10 2009.

- [209] E. Pupo, A. Padrón, E. Santana, J. Sotolongo, D. Quintana, S. Dueñas, C. Duarte, M. C. de la Rosa e E. Hardy, «Preparation of Plasmid DNA-Containing Liposomes Using a High-pressure Homogenization–extrusion Technique,» *Journal of Controlled Release*, vol. 104, p. 379–396, 5 2005.
- [210] I. Katouzian, A. F. Esfanjani, S. M. Jafari e S. Akhavan, «Formulation and Application of a New Generation of Lipid Nano-carriers for the Food Bioactive Ingredients,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 68, p. 14–25, 10 2017.
- [211] P. Ganesan e D. Narayanasamy, «Lipid Nanoparticles: Different Preparation Techniques, Characterization, Hurdles, and Strategies for the Production of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Oral Drug Delivery,» *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 6, p. 37–56, 12 2017.
- [212] J. Weiss, E. A. Decker, D. J. McClements, K. Kristbergsson, T. Helgason e T. Awad, «Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components,» *Food Biophysics*, vol. 3, p. 146–154, 3 2008.
- [213] J. Sun, C. Bi, H. M. Chan, S. Sun, Q. Zhang e Y. Zheng, «Curcumin-loaded Solid Lipid Nanoparticles Have Prolonged in Vitro Antitumour Activity, Cellular Uptake and Improved in Vivo Bioavailability,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 111, p. 367–375, 11 2013.
- [214] V. Kakkar, S. Singh, D. Singla e I. P. Kaur, «Exploring Solid Lipid Nanoparticles to Enhance the Oral Bioavailability of Curcumin,» *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 55, p. 495–503, 10 2010.
- [215] C. Ban, M. Jo, Y. H. Park, J. H. Kim, J. Y. Han, K. W. Lee, D.-H. Kweon e Y. J. Choi, «Enhancing the Oral Bioavailability of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles,» *Food Chemistry*, vol. 302, p. 125328, 1 2020.
- [216] A. F. Esfanjani e S. M. Jafari, «Biopolymer Nano-particles and Natural Nano-carriers for Nano-encapsulation of Phenolic Compounds,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 146, p. 532–543, 10 2016.
- [217] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni e W. E. Rudzinski, «Biodegradable Polymeric Nanoparticles As Drug Delivery Devices,» *Journal of Controlled Release*, vol. 70, p. 1–20, 1 2001.
- [218] L. Song, Y. Shen, J. Hou, L. Lei, S. Guo e C. Qian, «Polymeric Micelles for Parenteral Delivery of Curcumin: Preparation, Characterization and in Vitro Evaluation,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 390, p. 25–32, 10 2011.
- [219] Y.-M. Tsai, C.-F. Chien, L.-C. Lin e T.-H. Tsai, «Curcumin and Its Nano-formulation: The Kinetics of Tissue Distribution and Blood–brain Barrier Penetration,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 416, p. 331–338, 9 2011.
- [220] T. Caon, L. Mazzarino, C. M. O. Simões, E. L. Senna e M. A. S. Silva, «Lipid- and Polymer-Based Nanostructures for Cutaneous Delivery of Curcumin,» *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, p. 920–925, 5 2016.
- [221] A. Patel, Y. Hu, J. K. Tiwari e K. P. Velikov, «Synthesis and Characterisation of Zein–curcumin Colloidal Particles,» *Soft Matter*, vol. 6, p. 6192, 2010.
- [222] C. Gong, S. Deng, Q. Wu, M. Xiang, X. Wei, L. Li, X. Gao, B. Wang, L. Sun, Y. Chen, Y. Li, L. Liu, Z. Qian e Y. Wei, «Improving Antiangiogenesis and Anti-tumor Activity of Curcumin by Biodegradable Polymeric Micelles,» *Biomaterials*, vol. 34, p. 1413–1432, 1 2013.

- [223] L. E. van Vlerken, T. K. Vyas e M. M. Amiji, «Poly(ethylene glycol)-modified Nanocarriers for Tumor-targeted and Intracellular Delivery,» *Pharmaceutical Research*, vol. 24, p. 1405–1414, 3 2007.
- [224] S. Su e P. M. Kang, «Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine,» *Nanomaterials*, vol. 10, p. 656, 4 2020.
- [225] S. Jafari, *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, London: Elsevier Ltd. Academic Press, 2017.
- [226] M. M. Yallapu, B. K. Gupta, M. Jaggi e S. C. Chauhan, «Fabrication of Curcumin Encapsulated PLGA Nanoparticles for Improved Therapeutic Effects in Metastatic Cancer Cells,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 351, p. 19–29, 11 2010.
- [227] B. Gidwani e A. Vyas, «A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs,» *BioMed Research International*, vol. 2015, p. 1–15, 2015.
- [228] Q. Cai, W.-Y. Lin, F.-S. Xiao, W.-Q. Pang, X.-H. Chen e B.-S. Zou, «The Preparation of Highly Ordered MCM-41 with Extremely Low Surfactant Concentration,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 32, pp. 1-15, 1999.
- [229] B. Onida, B. Bonelli, L. Flora, F. Geobaldo, C. O. Arean e E. Garrone, «Permeability of micelles in surfactant-containing MCM-41 silica as monitored by embedded dye molecules,» *Chem. Commun.*, n. 21, pp. 2216-2217, 2001.
- [230] M. Gallo, F. Giudice, M. Banchemo, S. Ronchetti, L. Manna e B. Onida, «A Mesostructured Hybrid CTA–Silica Carrier for Curcumin Delivery,» *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 96, p. 236–246, 7 2020.
- [231] Q. Cai, Z.-S. Luo, W.-Q. Pang, Y.-W. Fan, X.-H. Chen e F.-Z. Cui, «Dilute Solution Routes to Various Controllable Morphologies of MCM-41 Silica with a Basic Medium,» *Chemistry of Materials*, vol. 13, p. 258–263, 2 2001.
- [232] A. W. Coats e J. P. Redfern, «Thermogravimetric Analysis. A Review,» *The Analyst*, vol. 88, p. 906, 1963.
- [233] H.-H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*, Springer Berlin Heidelberg, 1992.
- [234] R. C. Dunne, S. K. Kawatra e C. A. Young, *3.1.1 X-ray Powder Diffraction*, Society for Mining, Metallurgy, and Exploration (SME), 2019.
- [235] M. Kutz, *69.2.3 X-ray Scattering and Diffraction*, John Wiley & Sons, 2016.
- [236] A. Chauhan, «Powder XRD Technique and its Applications in Science and Technology,» *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, vol. 5, 2014.
- [237] B. Stuart, «Infrared Spectroscopy,» in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, American Cancer Society, 2015, p. 1–18.
- [238] F. Giudice, «Silici Mesostrutturate per il Rilascio di Curcumina,» 2019.
- [239] N. Clemente, «Mesostructured CTA-Silica Hybrids for the Release of Curcumin,» 2020.
- [240] National Center for Biotechnology Information, *PubChem Compound Summary for CID 24261, Silicon dioxide*, 2021.
- [241] National Center for Biotechnology Information, *PubChem Compound Summary for CID 5974, Cetrimonium bromide*, 2021.
- [242] H. E. Bergna, «Colloid Chemistry of Silica,» in *Advances in Chemistry*, American Chemical Society, 1994, p. 1–47.

- [243] C. S. Mangolim, C. Moriwaki, A. C. Nogueira, F. Sato, M. L. Baesso, A. M. Neto e G. Matioli, «Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application,» *Food Chemistry*, vol. 153, p. 361–370, 6 2014.
- [244] S. Dhakal, W. F. Schmidt, M. Kim, X. Tang, Y. Peng e K. Chao, «Detection of Additives and Chemical Contaminants in Turmeric Powder Using FT-IR Spectroscopy,» *Foods*, vol. 8, p. 143, 4 2019.
- [245] R. Benassi, E. Ferrari, S. Lazzari, F. Spagnolo e M. Saladini, «Theoretical study on Curcumin: A comparison of calculated spectroscopic properties with NMR, UV–vis and IR experimental data,» *Journal of Molecular Structure*, vol. 892, p. 168–176, 12 2008.
- [246] Q. Li, R. P. Antony, L. H. Wong e D. H. L. Ng, «Promotional effects of cetyltrimethylammonium bromide surface modification on a hematite photoanode for photoelectrochemical water splitting,» *RSC Advances*, vol. 5, p. 100142–100146, 2015.
- [247] I. S. John Wiley & Sons, «SpectraBase Spectrum ID=7iRrh0o9NRs,» 2021. [Online]. Available: <https://spectrabase.com/spectrum/7iRrh0o9NRs>. [Consultato il giorno 19 02 2021].
- [248] G. Yang, Y. Deng e J. Wang, «Non-hydrothermal synthesis and characterization of MCM-41 mesoporous materials from iron ore tailing,» *Ceramics International*, vol. 40, p. 7401–7406, 6 2014.
- [249] M. Kruk, M. Jaroniec, J. M. Kim e R. Ryoo, «Characterization of Highly Ordered MCM-41 Silicas Using X-ray Diffraction and Nitrogen Adsorption,» *Langmuir*, vol. 15, p. 5279–5284, 8 1999.
- [250] Y.-D. Chiang, H.-Y. Lian, S.-Y. Leo, S.-G. Wang, Y. Yamauchi e K. C.-W. Wu, «Controlling Particle Size and Structural Properties of Mesoporous Silica Nanoparticles Using the Taguchi Method,» *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, p. 13158–13165, 6 2011.
- [251] O. N. Gordon e C. Schneider, «Vanillin and ferulic acid: not the major degradation products of curcumin,» *Trends in Molecular Medicine*, vol. 18, p. 361–363, 7 2012.
- [252] M. Bernabé-Pineda, M. T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, E. González-Vergara e A. Rojas-Hernández, «Determination of Acidity Constants of Curcumin in Aqueous Solution and Apparent Rate Constant of Its Decomposition,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 60, p. 1091–1097, 4 2004.
- [253] O. N. Gordon, P. B. Luis, H. O. Sintim e C. Schneider, «Unraveling Curcumin Degradation,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, p. 4817–4828, 2 2015.
- [254] R. Sharma e D. Jani, «Interaction of Cationic CTAB Surfactant with Curcumin, an Anticarcinogenic Drug: Spectroscopic Investigation,» *Tenside Surfactants Detergents*, vol. 50, p. 283–288, 7 2013.
- [255] C. G. a. L. J.-P. Sokolik, "Hybrid-Silica Nanoparticles as a Delivery System of the Natural Biocide Carvacrol," *RSC Advances*, vol. 8, no. 64, pp. 36712-36721, 2018.
- [256] O. N. a. L. P. B. a. S. H. O. a. S. C. Gordon, «Unraveling Curcumin Degradation,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, n. 8, pp. 4817-4828, 2015.
- [257] K. Priyadarsini, «The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent,» *Molecules*, vol. 19, n. 12, pp. 20091-20112, 2014.
- [258] J. a. S. K. Z. a. S. E. a. Z. G. Zhu, «Potential Roles of Chemical Degradation in the Biological Activities of Curcumin,» *Food & Function*, vol. 8, n. 3, pp. 907-914, 2017.

- [259] M. a. T. H. a. G. G. a. R. P. a. B. G. Sayehi, «Reutilization of silicon- and aluminum-containing wastes in the perspective of the preparation of SiO₂-Al₂O₃ based porous materials for adsorbents and catalysts,» *Waste Management*, vol. 103, pp. 146-158, 2020.
- [260] Y.-P. a. L. Y.-C. a. L. L.-Y. L. a. G. M.-Y. G. Fang, «Mesoporous silica nanoparticles synthesized from liquid crystal display manufacturing extracts as a potential candidate for a drug delivery carrier: evaluation of their safety and biocompatibility,» *International Journal of Nanomedicine*, p. 3833, 2013.
- [261] N. Clemente, "Mesostructured CTA-Silica Hybrids for the Release of Curcumin," *Tesi di Laurea*, 2020.
- [262] Z. e. a. Wang, «The Role of Charge in the Surfactant-Assisted Stabilization of the Natural Product Curcumin,» *Langmuir*, vol. 26, n. 8, pp. 5520-5526, 2010.
- [263] M. Bernabé-Pineda, M. T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, E. Gonzalez-Vergara and A. Rojas-Hernandez, "Determination of Acidity Constants of Curcumin in Aqueous Solution and Apparent Rate Constant of Its Decomposition," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 60, no. 5, pp. 1091-1097, 2004.
- [264] O. N. Gordon, P. B. Luis, H. O. Sintim e C. Schneider, «Unraveling Curcumin Degradation,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, n. 8, pp. 4817-4828, 2015.
- [265] M. Vallet-Regi, A. Rámila, R. P. del Real e J. Pérez-Pariente, «A New Property of MCM-41: Drug Delivery System,» *Chemistry of Materials*, vol. 13, p. 308–311, 2 2001.
- [266] S. Ueno, *Bioimaging: Imaging by Light and Electromagnetics in Medicine and Biology*, Boca, Raton: CRC Press, 2020.
- [267] J. J. Tucker e L. J. Soslowsky, «Effect of Simvastatin on Rat Supraspinatus Tendon Mechanical and Histological Properties in a Diet-induced Hypercholesterolemia Model,» *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 34, p. 2009–2015, 4 2016.
- [268] K. V. Tarasevich e S. I. Kuchanov, «The Theory of Nonrandom Polycondensation for the Description of Sol–Gel Polymerization of Alkoxisilanes,» *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 45, p. 3093–3116, 2007.
- [269] S. Svenson, *Carrier-based Drug Delivery*, Washington, D.C: American Chemical Society, 2004.
- [270] R. Shukla e M. Cheryan, «Zein: The Industrial Protein from Corn,» *Industrial Crops and Products*, vol. 13, p. 171–192, 5 2001.
- [271] L. Shen, C.-C. Liu, C.-Y. An e H.-F. Ji, «How Does Curcumin Work with Poor Bioavailability? Clues from Experimental and Theoretical Studies,» *Scientific Reports*, vol. 6, 2 2016.
- [272] L. L. Schramm, «The Language of Colloid and Interface Science,» *Environmental Science & Technology*, vol. 28, p. 195A, 4 1994.
- [273] R. Rathna, S. Varjani e E. Nakkeeran, «Recent Developments and Prospects of Dioxins and Furans Remediation,» *Journal of Environmental Management*, vol. 223, p. 797–806, 10 2018.
- [274] S. E. Rankin, C. W. Macosko e A. V. McCormick, «Importance of Cyclization during the Condensation of Hydrolyzed Alkoxysilanes,» *Chemistry of Materials*, vol. 10, p. 2037–2040, 8 1998.
- [275] S. S. Rane e P. Choi, «Polydispersity Index: How Accurately Does It Measure the Breadth of the Molecular Weight Distribution?,» *Chemistry of Materials*, vol. 17, p. 926–926, 2 2005.

- [276] N. A. Rahman, I. Widhiana, S. R. Juliastuti e H. Setyawan, «Synthesis of Mesoporous Silica with Controlled Pore Structure from Bagasse Ash as a Silica Source,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 476, p. 1–7, 7 2015.
- [277] K. I. Priyadarsini, «Free Radical Reactions of Curcumin in Membrane Models,» *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 23, pp. 838-843, 1997.
- [278] M. Owais, D. Bhavyata, Q. Zia, A. Khan, Beenu e F. Mohammad, «Chemotherapeutic potential of curcumin-bearing microcells against hepatocellular carcinoma in model animals,» *International Journal of Nanomedicine*, p. 1139, 3 2014.
- [279] R. D. Norris, *Handbook of Bioremediation* (1993), Taylor & Francis Ltd., 2017.
- [280] Y. Moroi, *Micelles: Theoretical and Applied Aspects*, New York: Plenum Press, 1992.
- [281] S. Liu, P. Cool, O. Collart, P. V. D. Voort, E. F. Vansant, O. I. Lebedev, G. V. Tendeloo e M. Jiang, «The Influence of the Alcohol Concentration on the Structural Ordering of Mesoporous Silica: Cosurfactant versus Cosolvent,» *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, p. 10405–10411, 9 2003.
- [282] R. Li, Z. Jiang, L. Mao e H. Shen, «Adsorbed Resin Phase Spectrophotometric Determination of Vanillin or/and Its Derivatives,» *Talanta*, vol. 47, p. 1121–1127, 12 1998.
- [283] M. H. M. Leung, H. Colangelo e T. W. Kee, «Encapsulation of Curcumin in Cationic Micelles Suppresses Alkaline Hydrolysis,» *Langmuir*, vol. 24, p. 5672–5675, 6 2008.
- [284] R. Kotcherlakota, A. K. Barui, S. Prashar, M. Fajardo, D. Briones, A. Rodríguez-Diéguez, C. R. Patra e S. Gómez-Ruiz, «Curcumin loaded mesoporous silica: an effective drug delivery system for cancer treatment,» *Biomater. Sci.*, vol. 4, n. 3, pp. 448-459, 2016.
- [285] B. Kocaadam e N. Şanlıer, «Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 57, pp. 2889-2895, 2017.
- [286] D. Kapoor, R. Maheshwari, K. Verma, S. Sharma, P. Ghode e R. K. Tekade, «Coating Technologies in Pharmaceutical Product Development,» p. 665–719, 2020.
- [287] P. Judeinstein e C. Sanchez, «Hybrid Organic–Inorganic Materials: A Land of Multidisciplinarity,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 6, p. 511–525, 1996.
- [288] P. C. Hiemenz e R. Rajagopalan, *Principles of Colloid and Surface Chemistry, Revised and Expanded*, CRC Press, 2016.
- [289] R. J. Haynes, «Significance and Role of Si in Crop Production,» in *Advances in Agronomy*, Elsevier, 2017, p. 83–166.
- [290] T. Fontecave, C. Boissiere, N. Baccile, F. J. Plou e C. Sanchez, «Using Evaporation-Induced Self-Assembly for the Direct Drug Templating of Therapeutic Vectors with High Loading Fractions, Tunable Drug Release, and Controlled Degradation,» *Chemistry of Materials*, vol. 25, p. 4671–4678, 11 2013.
- [291] Y.-P. Fang, Y.-C. Lin, L.-Y. L. Lin e M.-Y. G. Gao, «Mesoporous Silica Nanoparticles Synthesized from Liquid Crystal Display Manufacturing Extracts As a Potential Candidate for a Drug Delivery Carrier: Evaluation of Their Safety and Biocompatibility,» *International Journal of Nanomedicine*, p. 3833, 10 2013.
- [292] A. Dyer, «Zeolites,» in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, K. H. J. Buschow, R. W. Cahn, M. C. Flemings, B. Ilschner, E. J. Kramer, S. Mahajan e P. Veyssi re, A cura di, Oxford, Elsevier, 2001, pp. 9859-9863.

- [293] F. Du, J. Li, X. Li e Z. Zhang, «Improvement of Iron Removal from Silica Sand Using Ultrasound-assisted Oxalic Acid,» *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, p. 389–393, 1 2011.
- [294] J. M. Davis, "Basic Techniques and Media, the Maintenance of Cell Lines, and Safety," in *Animal Cell Culture*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011, p. 91–151.
- [295] A. Chambers e S. D. Kerr, PennWell, 1996.
- [296] R. Cammack, T. K. Attwood, P. N. Campbell, J. H. Parish, A. D. Smith, J. L. Stirling e F. Vella, *Reactive Oxygen Species*, Oxford University Press, 2006.
- [297] E. Buncl e R. A. Stairs, *Solvent Effects in Chemistry*, John Wiley & Sons, 2015.
- [298] C. A. Batt, «Escherichia coli,» in *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 2014, p. 688–694.
- [299] P. W. Atkins, *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford New York: Oxford University Press, 2006.
- [300] S. G. Antimisiaris, P. Kallinteri e D. G. Fatouros, «Liposomes and Drug Delivery,» in *Pharmaceutical Manufacturing Handbook*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, pp. 443-533.
- [301] C. F. Poole, *Liquid-Phase Extraction*, Elsevier, 2020.
- [302] J. L. Tomsic, *Dictionary of Materials and Testing*, 2^a edizione a cura di, SAE International, 2000.
- [303] M. Allaby, *Dictionary of Geology and Earth Sciences*, 4^a edizione a cura di, Oxford University Press, 2013.