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

Sistemi ordinati e disordinati a base di silice per il rilascio topico di vitamina D₃

Relatore/i

prof. Barbara Onida dr. Marta Gallo

Candidato

Vittoria Cerbella 288701

Novembre 2022

INDICE

Int	roduzione	I
1.	Sistemi ibridi	- 1 -
	1.1. Cosa sono i sistemi ibridi?	- 1 -
	1.2. Sistemi ibridi in natura	- 2 -
	1.3. Lo sviluppo dei materiali ibridi	- 2 -
	1.4. Vantaggi dei materiali ibridi organici-inorganici	- 5 -
	1.5. Sintesi dei materiali ibridi	- 6 -
	1.5.1. Approceio building block	- 6 -
	1.5.2. Formazione in situ	- 7 -
	1.6. Dai materiali ibridi mesoporosi ai mesostrutturati	10 -
	1.6.1. I materiali ibridi mesoporosi	10 -
	1.6.2. Materiali ibridi mesostrutturati da processo sol-gel e principio di self-assembly	11 -
	1.7. Sistemi ibridi a base di silicio: influenza del tensioattivo	13 -
2.	Sistemi ibridi per il drug delivery	17 -
	2.1. Sistemi self-assembled per il drug delivery	17 -
	2.1.1. Self-assembly per il drug delivery	17 -
	2.1.2. Vantaggi dei sistemi micellari	18 -
	2.1.3. Incorporazione del farmaco	18 -
	2.1.4. Rilascio del farmaco	20 -
	2.2. Dal problema alla soluzione	21 -
	2.2.1. Psoriasi	21 -
	2.2.2. La vitamina D ₃	22 -
	2.3.3. L'idea!	29 -
3.	Materiali e metodi	31 -
	3.1. Materiali	31 -
	3.2. Tecniche di caratterizzazione	31 -
	3.2.1. Analisi termogravimetrica (ATG)	31 -
	3.2.2. Spettroscopia FTIR	32 -
	3.2.3. Diffrattometria raggi-X	33 -
	3.2.4. Spettroscopia UV/visibile	34 -
	3.2.5. Test di rilascio della vitamina D ₃	35 -
	3.2.6. Microscopia FESEM	36 -
4.	Sintesi sistemi ibridi senza vitamina D ₃	37 -

	4.1. Sintesi 'DILUITO': sistema esagonale	37 -
	4.2. Sintesi 'CONCENTRATO' : sistema esagonale	41 -
	4.3. Variazione del rapporto CTAB/TEOS : sintesi dei sistemi disordinati	43 -
	4.3.1. Campioni selezionati	45 -
5.	Sintesi sistemi ibridi con vitamina D3	47 -
	5.1. Stabilità della vitamina D_3 in ambiente basico	47 -
	5.2. Sintesi 'DILUITO'	48 -
	5.3. Sintesi 'CONCENTRATO'	50 -
6.	Caratterizzazione delle sintesi 'DILUITO'	53 -
	6.1. Analisi termogravimetrica	53 -
	6.2. Spettroscopia FTIR	55 -
	6.3. Estrazione in etanolo	56 -
	6.4. Diffrazione di raggi-X	60 -
	6.4.1. Analisi a bassi angoli	60 -
	6.4.2. Analisi XRD ad alti angoli	61 -
	6.5. Microscopia FESEM	64 -
	6.6. Rilascio di vitamina D_3 in sudore artificiale	67 -
7.	Caratterizzazione delle sintesi 'CONCENTRATO'	73 -
	7.1. Analisi termogravimetrica	73 -
	7.2. Spettroscopia FTIR	75 -
	7.3. Estrazione in etanolo	76 -
	7.4. Diffrazione di raggi-X	78 -
	7.4.1. Analisi a bassi angoli	78 -
	7.4.2. Analisi ad alti angoli	80 -
	7.5. Microscopia FESEM	81 -
	7.6. Rilascio in sudore artificiale	84 -
8.	Conclusioni	87 -
	8.1. Discussione dei risultati	87 -
	8.2. Sviluppi futuri	90 -
Bib	oliografia	91 -
Rir	ngraziamenti	99 -

Lista delle figure

Figura 1.1 Un diagramma Ashby relativo a densità e modulo di Young di diverse classi di materiali. Si no	ota
come grandi zone del diagramma siano vuote. (Kickelbick, 2014)	1 -
Figura 1.2 Tipiche interazioni nei materiali ibridi e relativa forza (Kickelbick, 2007).	3 -
Figura 1.3 Diverse classi di materiali ibridi.	4 -
Figura 1.4. (a) formazione di una matrice funzionalizzata; (b) i gruppi organici sono parte integrante della matrice (Kickelbick, 2007).	ι 4 -
Figura 1.5. Strutture a base di silicio utilizzate come componenti inorganici nei materili ibridi (Kickelbick 2014)	:, 6 -
Figura 1.6. Illustrazione della struttura di un gel: il vettore P nasce in un poro, passa perpendicolarmente	
attrverso la fase solida e riemerge in un altro poro; il vettore S passa dal solido al solido (Brinker e Schere	r,
1990)	7 -
Figura 1.7. Influenza del pH durante il processo sol-gel (ALOthman, 2012)	8 -
Figura 1.8. Sintesi materiale ibrido con gruppi organici sulla superficie dei pori (Kickelbick, 2004)	10 -
Figura 1.9. Sintesi materiale ibrido con gruppi organici sulle pareti dei pori (Kickelbick, 2004)	10 -
Figura 1.10 Formazione di micelle (Grzybowski, 2009)	11 -
Figura 1.11. Self-assembly tra tensioattivo e materiale inorganico: formazione di materiale mesoporoso	
(Grzybowski, 2009)	12 -
Figura 1.12 Processo di micellizzazione (Gao et al. 1993).	12 -
Figura 113 Struttura chimica del TEOS (sinistra) e del CTAB (destra)	- 13 -
Figura 114 Schematizzazione del meccanismo di azione 'swelling-shrinking' (Vi et al 2015)	- 14 -
Figura 1.15 Diverse strutture dei precursori della silici appartementi alla famiglia delle MAIS (AI Othma	n 17
2012)	11, - 14 -
Figure 1 16 Packing factor per le diferse mesofasi (Meynen 2000)	_ 1/ _
Figure 1.17 Influenza della concentrazione di tensioattivo sulla struttura della mesofase (Brockhoff 1070)) _ 15 _
Figure 1.19 Diagramma di fasa aggua/CTAP a varia temperatura: dava L à la fasa della saluzione. E. L.	() 15 -
rispattivamente la fasi aristallina asa gona la cubica a lamallara (Wörnheim et al. 1988)	1 50110
Figure 2.1 Vetteri di formazi organizi utilizzati nel drug delivery (Torchilin, 2001)	- 13 - 17
Figura 2.1 ventori di farmacio iganici dal farmacio all'interno dalla micella dinendenti dell'idrefa hisità dal farma	1/ -
rigura 2.2 Possibili posizioni dei farmaco al interno dena micena, dipendenti dall'idrofobicità dei farmaco stasso (Torphilip, 2001)	10
Figure 2.3 In company ficing di forme o i in soluti il mediante dialisi (a) a completione alia, a capa (h) (Ku	19 -
al 1007)	- 20 -
Figure 2 4 Departmento rice a calumentino recorio si	- 20 -
Figura 2.5 Strutture chimica dal calcacterila	- 12
Figura 2.5 Struttura chimica del coleca cherolo.	23 -
Figura 2.6 Dalla forma intattiva della vitamina D_3 a quella attiva. (DeLuca, 2004)	23 -
Figura 2.7 Diversi materiali che sono stati esplorati come agenti di rilascio di vitamina D fino ad oggi (Re	ijinold
Figure 28 Schematizzazione nanoemulsione (Guidotti)	- 26 -
Figura 2.0 Schematizzazione nanoenulisione (Guidotti).	- 20 -
Figura 2.0 Analisi ai raggi X a bassi angoli di campioni ibridi silica tensioattivo Vitamina Da Si passa	da una
rigui a 2.10 Analisi al laggi-A a bassi aligoli ul campioni olidi since-tensioattivo-vitamina D3. Si passa mesostruttura esagonale ad una guasi lamellare, sottolienando l'azione della vitamina D3 come agente co-	ua ulla
template	- 28 -
Figure 3.1 Departmente zione hande di esserbimente ETID	
Figura 3.1 Rappresentazione dai raggi. X schematizzata	- 22
Figure 4.1 Compione sotteneste ed egitezione megnetice e une velecità di 200 mm	- 22 20
Figure 4.1 Campione soluposto au agnazione magnetica a una velocita di 500 rpm	- 38
Figure 4.2 Aggiunta un reos goccia a goccia ar campione	- 56
Figura 4.5 Campione soluposto ad agitazione magnetica a una velocita di 150 rpm	- 39 -
Figura 4.4 Campione dopo le 5 ore di agliazione magnetica	39 -
Figura 4.5 Meccanismo di filtraggio tramite filtro da 16 μ m e pompa da vuoto e campione filtrato	39 -
Figura 4.6 Campione essiccato in stuta e sucessivamente trasformato in polvere.	40 -
Figura 4.7 Campione dopo l'aggiunta di CTAB	41 -
Figura 4.8 Campione dopo le 48 ore di agitazione	42 -

Figura 4.9 Meccanismo di filtraggio	42 -
Figura 4.10 Confronto pattern XRD alti angoli tra la sintesi 1,2 CONC lavata e 1,2 CONC non lavata	44 -
Figura 4.11 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni ord conc e disord conc	46 -
Figura 4.12 Analisi raggi-X a bassi angoli per i campioni ord dil e disord dil	46 -
Figura 5.1 Spettro UV/visibile della soluzione 0.12 CTAB : 1.23 NaOH : 114.84 H ₂ O : 4*10 ⁻³ Vit D ₃	48 -
Figura 5.2 Campione dopo l'aggiunta di TEOS	49 -
Figura 5.3 Campione trascorse le 48 ore	50 -
Figura 5.4 Colorazione gialla del campione durante l'aggiunta di TEOS	51 -
Figura 5.5 Campione trascorse le 48 ore	51 -
Figura 6.1 Analisi termogravimetrica dei campioni ord dil e ord dil VD	53 -
Figura 6.2 Analisi termogravimetrica dei campioni disord dil e disord dil VD	54 -
Figura 6.3 Spettro FTIR dei campioni ord dil e ord dil VD	55 -
Figura 6.4 Spettro FTIR dei campioni disord dil e disord dil VD	55 -
Figura 6.5 Spettro FT-IR colecalciferolo (Giulia Palestrini, 2020)	56 -
Figura 6.6 Spettro UV/visibile del campione ord dil VD in etanolo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni	57 -
Figura 6.7 Spettro UV/visibile del campione disord dil VD in etanolo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni	57 -
Figura 6.8 Retta di taratura a 265 nm della Vitamina D ₃ in EtOH (Daniele Arduino, 2021)	58 -
Figura 6.9 Percentuale in massa di vitamina D ₃ estratta dal campione ord dil VD in etanolo	58 -
Figura 6.10 Percentuale in massa di vitamina D ₃ estratta dal campione disord dil VD in etanolo	59 -
Figura 6.11 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni ord dil e ord dil VD	60 -
Figura 6.12 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni disord dil e disord dil VD	61 -
Figura 6.13 Pattern XRD alti angoli per i campioni ord dil e ord dil VD	62 -
Figura 6.14 Pattern XRD alti angoli per i campioni disord dil e disord dil VD	62 -
Figura 6.15 Pattern XRD ad alti angoli del colecalciferolo (Fei et al, 2011).	63 -
Figura 6.16 Micrografie FESEM della mesostruttura esagonale (ord dil) (Fabio Giudice, 2019)	64 -
Figura 6.17 Micrografie FESEM del campione ord dil VD	64 -
Figura 6.18 Micrografie FESEM del campione disord dil	65 -
Figura 6.19 Micrografie FESEM del campione disord dil VD	66 -
Figura 6.20 Retta di taratura per il rilascio di vitamina D ₃ in sudore artificiale (Giulia Palestrini, 2020)	67 -
Figura 6.21 Spettro UV/visibile dei campioni ord dil VD e disord dil VD al termine del test di rilascio	68 -
Figura 6.22 Profili di rilascio dei campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD	69 -
Figura 6.23 Rappresentazione schematica del meccanismo di rilacio del sistema ordinato; in giallo il princi	pio
attivo, in verde il tensioattivo e in blu la matrice inorganica. (Gallo et al, 2020)	70 -
Figura 6.24 Rappresentazione schematica del meccanismo di rilacio del sistema disordinato; in giallo il	
principio attivo, in verde il tensioattivo e in blu la matrice inorganica	71 -
Figura 6.25 Struttura chimica del colecalciferolo	71 -
Figura 7.1 Analisi termogravimetrica dei campioni ord_conc e ord_conc_VD	73 -
Figura 7.2 Analisi termogravimetrica dei campioni disord_conc e disord_conc_VD	74 -
Figura 7.3 Spettri FTIR dei campioni ord_conc e ord_conc_VD	75 -
Figura 7.4 Spettri FTIR dei campioni disord_conc e disord_conc_VD	75 -
Figura 7.5 Spettro UV/visibile campione ord_conc_VD in etanalo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni	76 -
Figura 7.6 Spettro UV/visibile campione disord_conc_VD in etanalo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni	76 -
Figura 7.7 Percentuale massa di vitamina D3 estratta in etanolo dal campione disord_conc_VD	77 -
Figura 7.8 Percentuale in massa di vitamina D3 estratta in etanolo dal campione ord_conc_VD	77 -
Figura 7.9 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni ord_conc e ord_conc_VD	78 -
Figura 7.10 Pattern XRD a bassi angoli di una fase lamellare MCM-51 (Luan et al, 1998)	79 -
Figura 7.11 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni disord_conc e disord_conc_VD	79 -
Figura 7.12 Pattern XRD ad alti angoli per i campioni ord_conc e ord_conc_VD	80 -
Figura 7.13 Pattern XRD ad alti angoli per i campioni disord_conc e disord_conc_VD	80 -
Figura 7.14 Micrografie FESEM del campione ord_conc	81-
Figura 7.15 Micrografie FESEM del campione ord_conc_VD	81-
Figura 7.16 Micrografie FESEM del campione disord_conc	82 -
Figura 7.17 Micrografie FESEM del campione disord_conc_VD	83 -

Figura 7.18	Spettro UV/visibile dei campioni ord_conc_VD e disord_conc_VD al termine del test di rilascio
84 -	
Figura 7.19	Profili di rilascio dei campioni ord conc VD e disord conc VD

Figure 7.17 From arranges der campion ord_cone_vD cabora_cone_vD	05
Figura 8.1 Percentuale in massa di vitamina D3 rilasciata in sudore artificiale per i campioni ord_dil_VD,	
disord_dil_VD, ord_conc_VD e disord_conc_VD	89 -

Lista delle tabelle

Tabella 1.1 Diverse possibilità di composizione e struttura dei materiali ibridi	2 -
Tabella 1.2. Principali proprietà della porzione organica e di quella inorganica. (Kickelbick, 2007)	5 -
Tabella 2.1 Requisit i necessari per attraversamento della barriera cutanea	24 -
Tabella 3.1 Reagenti e rispettive quantità utilizzate per la preparazione della soluzione di sudore artifici	ale su
600 g di acqua (Shimamura et al, 2004)	35 -
Tabella 3.2 specifiche analisi rilascio in sudore artificiale.	36 -
Tabella 4.1 Quantità sperimentali utilizzate per ottenere il rapporto molare desiderato	37 -
Tabella 4.2 Quantità sperimentali utilizzate per ottenere il rapporto molare desiderato	41 -
Tabella 4.3 Tipologia di filitraggio utilizzata nelle varie sintesi. Si denomina la sintesi con il rapporto n tensioattivo/Si e con DIL/CONC per indicare il metodo usato (DIL=DILUITO, CONC=CONCENTRA	iolare TO) 43
Tabella 4.4 Lavaggio di un'aliquota della polvere ottenuta dalle sintesi con una soluzione di acqua/EtO vol.	H a150% 44 -
Tabella 4.5 Perdita in massa tra 150 e 800 °C misurata tramite ATG dei campioni lavati	45 -
Tabella 5.1 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi	48 -
Tabella 5.2 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi	49 -
Tabella 5.3 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi	50 -
Tabella 5.4 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi disord_conc_VD	51 -
Tabella 6.1 Risultati analisi termogravimetrica dei campioni ord_dil, disord_dil, ord_dil_VD e disord_d evidenziando le perdite in massa dai 150°C	lil_VD 54 -
Tabella 6.2 Massa di campione in soluzione, massa di vitamina D ₃ estratta in etanolo rispetto alla mass campione in soluzione in termini percentuali, ed efficienza di incorporazione della vitamina D ₃	a del 59 -
Tabella 6.3 Massa rilasciata in sudore artificiale (%) dai campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD	69 -
Tabella 7.1 Risultati dell'analisi termica	74 -
Tabella 7.2 Massa di campione in soluzione (valutato in modo da restare nel range di concentrazione de di taratura, come riportato in letteratura (Daniele Arduino, 2021), massa di campione estratta in etanolo alla massa del campione in soluzione in termini percentuali, ed efficienza di incorporazione della vitam 78 -	ella retta rispetto ina D3
Tabella 7.3 Massa rilasciata in sudore artificiale (%) dai campioni ord conc VD e disord conc VD	84 -
Tabella 8.1 Rassunto dei risultati ottenuti	88 -

Introduzione

Questo lavoro di tesi si pone come obiettivo quello di sintetizzare e studiare sistemi ibridi ordinati e disordinati a base di silice-tensioattivo-vitamina D_3 per il rilascio topico di vitamina D_3 in vista di una possibile applicazione per la cura della psoriasi.

Nel primo capitolo vengono fornite informazioni riguardo le caratteristiche principali di sistemi ibridi. Questa tipologia di sistema nasce dalla combinazione di due o più componenti di diversa natura. Al loro interno si individuano due fasi, una organica e una inorganica: in generale la parte organica conferisce al sistema una buona elasticità, tenacità e bassa densità; mentre quella inorganica trasferisce al sistema proprietà quali durezza, rigidezza e stabilità termica. È dunque possibile creare materiali multifunzionali con proprietà ricercate. Tra i metodi di sintesi di materiali ibridi organico-incorganico maggiormente studiati vi è la 'formazione in situ', che sfrutta il processo sol-gel e quindi si serve di reazioni di idrolisi e di condensazione. Uno degli aspetti di maggiore importanza nella formazione di strutture ibride derivanti dal processo solgel è la capacità di self-assembly delle molecole di tensioattivo (porzione organica) come template. Il self-assembly è un processo di associazione di singole unità (building block) in strutture organizzate e ordinate. Nel caso di tensioattivi e precursori di matrici inorganche (come il tetraetilortosilicato) i meccanismi di azione/interazione tra tensioattivo e precursore e il conseguente ordine della struttura finale sono molteplici; in ognuno di questi risulta essere di fondamentale importanza la concentrazione di tensioattivo durante il processo di sintesi. Concentrazioni crescenti di tensioattivo trasformano la fase da esagonale a lamellare, passando per la cubica. Nella presente tesi viene indagato questo aspetto al fine di sintetizzare sia dei sistemi ordinati (esagonali) che disordinati e confrontarli in termini di intrappolamento e successivo rilascio di vitamina D₃ in vista di un'applicazione nel campo del drug delivery.

Nel *secondo capitolo* viene evidenziata la capacità di questi sistemi di sfruttare i vantaggi del *self-assembly* per il drug delivery, che ha come scopo quello di studiare vettori di famaci che riducano la degradazione e la perdita del principio attivo, aumentino la sua biodisponibilità e prevengano gli effetti collaterali. Tra i vettori di farmaci si possono citare carrier organici (a base di lipidi o di polimeri) e carrier inoganici (silice mesoporosa). Nell'ultimo decennio numerose sono state le innovazioni riguardanti i sistemi per il drug delivery che sfruttano il principio del *self-assembly*. Idealmente, tali sistemi dovrebbero essere stabili *in vivo* per un periodo di tempo sufficientemente lungo senza provocare reazioni biologiche; dovrebbero rilasciare il farmaco al contatto con tessuti/cellule bersaglio; i componenti del vettore dovrebbero essere facilmente rimossi dal corpo quando la funzione terapeutica è espletata. Nel presente lavoro di tesi ci si è concentrati sui sistemi *self-assembled* micellari, in quanto sono in grado di solubilizzare farmaci poco solubili in acqua come la Vitamina D₃ e quindi aumentare la loro biodisponibilità, possono restare nel corpo abbastanza a lungo fornendo un apporto graduale del farmaco nel tempo, proteggono il principio attivo grazie alla loro forma micellare

e non provocano effetti collaterali. Il quadro generale in cui si colloca il presente lavoro é quello della somministrazione topica di farmaci. In particolare, lo scopo ultimo é quello di studiare dei sistemi per il rilascio topico di Vitamina D₃ contro la psoriasi. La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica della pelle; non può essere curata, tuttavia può essere ridotta o controllata con somministrazioni orali o topiche generalemente a lungo termine. Le terapie orali sono da evitare, fatta eccezione per casi particolarmente gravi, in quanto presentano un'elevata tossicità. La somministrazione topica, al contrario, risulta essere vantaggiosa in quanto rilascia il principio attivo localmente. Le somministrazioni topiche più comuni, a base di corticosteroidi, mostrano una particolare efficacia nel trattamento della malattia, tuttavia presentano degli effetti collaterali a lungo termine. Una valida alternativa per ridurre questi svantaggi è rappresentatata dalla vitamina D₃, grazie alla sua capacità di inibire l'eccessiva proliferazione delle cellule delle pelle (cheratinociti). La vitamina D_3 è una molecola idrofobica con scarsa solubilità in acqua, la cui degradazione è elevata e per lo più mediata da reazioni ossidative. Per questo motivo risulta essere problematica in termini di stabilità e biodisponibilità. In letteratura, infatti, sono proposti vari sistemi vettori di vitamina D₃ e in tutti si cerca di aumentare la solubilità del principio attivo e di garantirne un rilascio nel tempo. Un aspetto innovativo e di fondamentale importanza del presente studio risiede nello sfruttare la capacità della vitamina D₃ di partecipare al processo di self-assembly come agente co-templante: aumentando la concentrazione di vitamina D₃ nella soluzione è possibile percepire un cambiamento della mesostruttura, proprio come nel caso dell'aggiunta di tensioattivo. L'idea di base è quella di combinare i vantaggi di un sistema ibrido, che sfrutta l'approccio della formazione in situ, e quindi il processo sol-gel per la formazione di micelle, e la capacità di self-assembly della vitamina D₃. Tali ibridi vengono caratterizzati con particolare attenzione alla relazione tra la mesostruttura del sistema ibrido e le sue proprietà di rilascio della vitamina D₃.

Nel terzo capitolo vengono presentate le tecniche di caratterizzazione e i materiali utilizzati.

Nel *quarto capitolo* e nel *quinto capitolo* si indagano due metodi di sintesi diversi, che differiscono principalmente per la quantità di acqua utilizzata e per il tempo di ageing. Vengono presentati i risultati di prove preliminari ottenuti variando il rapporto molare tra tensioattivo e precursore della silice. In seguito, per entrambi i metodi vengono scelte le condizioni che permettono di ottenere un sistema ibrido mesostrutturato ordinato di cella esagonale e uno disordinato con rapporto molare tensioattivo/precursore pari a 0,8. Si prosegue sintetizzando gli stessi con l'aggiunta del principio attivo ottenendo dei sistemi ibridi tensioattivo-silice-vitamina D₃. Tutti i sistemi vengono caratterizzati tramite diffrattometria a raggi X (XRD), spettroscopia infra-rosso a trasformata di Fourier (FTIR), termogravimetria (ATG), microscopia elettronica. Inoltre vengono effettuati dei test di estrazione in etanolo e di rilascio in sudore artificiale.

Nel *sesto capitolo* e nel *settimo capitolo* si riportano i risultati ottenuti. In primo luogo si dimostra attraverso l'analisi termogravimetrica e la spettroscopia a infra-rosso la presenza della vitamina D₃ nei sistemi, successivamente si valuta la sua quantità attraverso l'estrazione in etanolo; vengono poi fatte delle ipotesi sulla posizione del principio attivo all'interno delle strutture micellari tramite diffrattometria a raggi X. Infine, attraverso dei test di rilascio in sudore artificiale, vengono fatte considerazioni su come la mesostruttura del sistema influenzi la quantità di vitamina D₃ rilasciata e il profilo di rilascio.

Nell'ottavo capitolo si effettuano considerazioni di carattere più generale e possibili sviluppi futuri.

Introduzione

Introduzione

1.1. Cosa sono i sistemi ibridi?

I materiali ibridi rappresentano una delle classi di materiali emergenti tra le innovazioni tecnologiche. La possibilità di ottenere nuove proprietà dalla combinazione di due o più materiali, rende i sistemi ibridi di particolare interesse.

Le proprietà dei materiali possono essere rappresentate in delle mappe, i cosiddetti diagrammi Ashby¹ (**Figura 1.1**), mostrando il comportamento meccanico, termico, elettrico e ottico che essi offrono. Queste mappe mostrano chiaramente degli spazi vuoti: alcune aree dello spazio di proprietà sono occupate da materiali, altre no.

Da qui nasce l'esigenza di occupare le aree vuote con ibridi costituiti da due o più materiali. I materiali compositi, le schiume o le strutture mesoporose ne sono un esempio (Ashby e Bréchet, 2003). I materiali ibridi possono quindi avere caratteristiche intermedie tra quelle delle due fasi originarie o talvolta caratteristiche del tutto nuove (Pandey et al, 2011).



Figura 1.1 Un diagramma Ashby relativo a densità e modulo di Young di diverse classi di materiali. Si nota come grandi zone del diagramma siano vuote. (Kickelbick, 2014)

Si individuano due fasi all'interno di un sistema ibrido, una *organica* e una *inorganica*: in generale la parte organica conferisce al sistema una buona elasticità, tenacità e bassa densità; mentre quella inorganica trasferisce al sistema proprietà quali durezza, rigidezza e stabilità termica (Han et al, 2007). È dunque possibile creare materiali multifunzionali (Musat, 2008) attraverso l'ibridazione di componenti organiche e inorganiche con proprietà ricercate (Ouahab, 1997).

¹ I diagrammi Ashby vengono utilizzati per scegliere il materiale per un'applicazione specifica.

1.2. Sistemi ibridi in natura

Molti materiali presenti in natura sono costituiti da blocchi strutturali organici e inorganici distribuiti su scala molecolare o nanometrica. Poiché in natura la dimensione delle unità inorganiche è comparabile a quella dei blocchi organici, i materiali risultanti sono omogenei su scala maroscopica e permettono di migliorare le proprietà del materiale stesso.

Nella maggior parte dei casi il materiale inorganico conferisce forza meccanica e una struttura generale, mentre la parte organica è resposabile dei legami tra i blocchi strutturali inorganici e/o tessuti. Ne sono un esempio le ossa e la madreperla. Le condizioni operative che portano alla formazione di materiali ibridi organici-inorganici biologici, come temperatura ambiente, pH neutro e ambiente acquoso, hanno reso questi materiali interessanti dal punto di vista scientifico (Kickelbick, 2007).

1.3. Lo sviluppo dei materiali ibridi

I materiali ibridi trovano origine soltanto tra la fine del 20esimo secolo e l'inizio del 21esimo secolo (Kickelbick, 2007).

Le variabili in gioco sono numerose e la loro modifica porta alla formazione di materiali ibridi differenti; diverse possibilità di composizione e di struttura possono essere ottenute nel materiale finale. Nella **Tabella 1.1** vengono mostrate varie possibilità di composizione.

Matrice	cristallina ↔ amorfa organica ↔ inorganica		
Blocchi strutturali	molecole \leftrightarrow macromolecole \leftrightarrow particelle \leftrightarrow fibre		
Interazioni tra i componenti	forti ↔ deboli		

Tabella 1.1 Diverse possibilità di composizione e struttura dei materiali ibridi

La prima distinzione può essere data dalla forza di legame tra la fase organica e quella inorganica (Figura 1.2).



Figura 1.2 Tipiche interazioni nei materiali ibridi e relativa forza (Kickelbick, 2007).

Tale distinzione divide i materiali ibridi in due classi principali (Figura 1.3):

- Classe I: Materiali in cui la fase organica è fisicamente incorporata in una matrice inorganica tramite interazioni secondarie (forze di Van der Walls, legami a idrogeno o interazioni elettrostatiche) (Grandi et al, 2006). Questi materiali vengono sintetizzati effettuando l'idrolisi e la condensazione del composto inorganico, in presenza del composto organico oppure polimerizzando monomeri organici in una matrice inorganica porosa (Schottner, 2001).
- Classe II: Materiali in cui le due fasi sono legate da un legame chimico forte (Grandi et al, 2006); questo metodo richiede precursori molecolari che contengano un legame chimico idroliticamente stabile tra l'elemento che costituirà la rete inorganica e la frazione organica (Schottner, 2001).



Figura 1.3 Diverse classi di materiali ibridi.

Anche le proprietà strutturali possono essere utilizzate per classificare i materiali ibridi. Una porzione organica contenente un gruppo funzionale che permette l'attaccamento alla matrice inorganica, può modificare la matrice inorganica, portando alla formazione di una matrice funzionalizzata (**Figura 1.4.a**). La situazione è diversa nel caso in cui due o tre gruppi modificano la porzione organica, portando alla formazione di materiali in cui i gruppi organici sono parte integrante della matrice ibrida (**Figura 1.4.b**) (Kickelbick, 2007).



Figura 1.4. (a) formazione di una matrice funzionalizzata; (b) i gruppi organici sono parte integrante della matrice (Kickelbick, 2007).

1.4. Vantaggi dei materiali ibridi organici-inorganici

Le proprietà principali della porzione organica e di quella inorganica sono riassunte nella **Tabella 1.2**.

PROPRIETA'	Materiali organici	Materiali inorganici
Natura del legame	Covalente (C-C), Van der Waals, legame a idrogeno	Ionico o covalente-ionico (M-O)
Temperatura di transizione vetrosa	Bassa (-120 °C – 200°C)	Alta (>>200°C)
Stabilità termica	Bassa (<350 °C – 450°C)	Alta (>>100°C)
Indice di rifrazione	1.2-1.6	1.15-2.7
Prorietà meccaniche	Elasticità, plasticità	Durezza, forza, fragilità
Processabilità	Alta	Bassa per polveri, alta per rivestimenti sol-gel

Tabella 1.2. Principali proprietà della porzione organica e di quella inorganica. (Kickelbick, 2007).

Grazie alle molteplici combinazioni di componenti che si possono avere, diventa possibile inventare nuovi materiali con una largo spettro di proprietà più o meno conosciute (Kickelbick, 2007).

Tra i vantaggi principali si trova il fatto che, al contrario dei materiali puramente inorganici che per la loro sintesi richiedono trattamenti ad alte temperatura, il processo di sintesi di materiali ibridi può essere paragonato a quello dei polimeri, per il loro contenuto organico o a causa della formazione della matrice inorganica a partire da precursori molecolari come nelle reazioni di polimerizzazione. Un ulteriore vantaggio riguarda la separazione di fase tra i componenti organici e inorganici, che risulta utile per la formazione di materiali porosi. Il materiale ibrido risulta macroscopicamente omogeneo e otticamente chiaro perchè la segregazione di fase interessa la scala molecolare e la nanoscala, dove la composizione appare invece eterogenea (Kickelbick, 2007).

Modificando la composizione si riescono a variare le proprietà come si desidera: se si vuole aumetare l'idrofobicità del materiale, viene aumentata la quantità di componenti molecolari idrofobici; se invece si vogliono aumentare le proprietà meccaniche, come tenacità e resistenza ai graffi, vengono inserite nella matrice nonoparticelle inorganiche dure (Kickelbick, 2007).

Un aspetto predominante riguarda l'elevata superficie dell'interfaccia, dovuta alla elevata porosità, che i materiali ibridi possiedono. Come precedentemente detto, la natura dell'interfaccia è utile per dividere i materiali ibridi in due classi dipendenti dalla forza delle interazioni tra la porzione organica e quella inorganica.

1.5. Sintesi dei materiali ibridi

In principio si distinguono due approcci che possono essere usati per la formazione di materiali ibridi: approccio *building block* e formazione *in situ*.

1.5.1. Approccio building block

I blocchi strutturali mantengono parzialmente la loro integrità molecolare durante la formazione del materiale, dunque unità strutturali presenti nelle fasi originarie possono essere trovate nel materiale finale (Kickelbick, 2007).

Nel caso di strutture a base di silicio (**Figura 1.5**), questi sistemi possono essere preparati in un primo step e poi mescolati ad un componente organico per ottenere un materiale ibrido. Questo è possibile a causa dell'alta stabilità del legame Si-O presente nella struttura inoganica (Kickelbick, 2014).



Figura 1.5. Strutture a base di silicio utilizzate come componenti inorganici nei materili ibridi (Kickelbick, 2014).

Questo metodo ha un grande vantaggio: almeno un'unità struttuale è ben definita e di solito non viene sottoposta a importanti cambiamenti strutturali durante la formazione della matrice.

1.5.2. Formazione in situ

Questo approccio si basa sulla trasformazione chimica dei precursori usati durante la preparazione del materiale. In questo caso le molecole vengono trasformate in strutture multidimensionali che mostrano proprietà diverse dalle proprietà dei precursori (Kickelbick, 2007).

La struttura finale del materiale è determinata dalla composizione dei precursori e dalle condizioni operative. Cambiando un parametro si ottiene un diverso materiale. Se, per esempio, la fase inorganica è una struttura in silice derivante dal processo *sol-gel*, il cambiamento dalle condizioni di sintesi da basiche ad acide porta alla formazione di prodotti diversi.

1.5.2.1. Processo sol-gel

In un processo *sol-gel* una soluzione acquosa di un alcossido metallico² [$Mn(OR)_n$], o talvolta non metallico (per esempio alcossisilano³), viene convertita in una matrice inorganica; questo processo rende possibile la sintesi di silici amorfe in varie forme e materiali porosi per numerose applicazioni (Innocenzi, 2019).

Un 'sol' è una sospensione colloidale⁴ di piccole particelle solide in un liquido, mentre un 'gel' è costituito da fasi solide e fluide continue di dimensione colloidale (Brinker e Scherer, 1990); in **Figura 1.6** viene presentata un'illustrazione schematica della struttura del gel evidenziando come al suo interno si possa viaggiare attraverso la fase solida da un lato all'altro del campione senza dover attraversare la fase fluida e viceversa.



Figura 1.6. Illustrazione della struttura di un gel: il vettore P nasce in un poro, passa perpendicolarmente attrverso la fase solida e riemerge in un altro poro; il vettore S passa dal solido al solido (Brinker e Scherer, 1990).

Entrando nel dettaglio delle reazioni chimiche coinvolte durante il processo si può evidenziare come le reazioni consistano in una serie di idrolisi e condensazioni attraverso cui i monomeri di alcossido inorganici formano particelle colloidali (sol) per essere poi convertite in una matrice (gel) (Innocenzi, 2019).

Gli alcossidi metallici sono ottimi precursori del processo *sol-gel* perchè reagiscono direttamente con l'acqua tramite la reazione di idrolisi (Brinker e Scherer, 1990), in condizioni acide, basiche o neutre, talvolta in presenza di un catalizzatore che permette un miglior controllo sulla cinetica della reazione (Innocenzi, 2019).

 $^{^{2}}$ Gli alcossidi metallici sono composti con formula generale M(OR)_n dove R è un radicale alchilico o arilico e n è la valenza del metallo. Mostrano proprietà diverse a seconda del tipo di metallo e del gruppo alchilico ad esso legato.

³ Gli alcossisilani sono composti di formula generale Si(OR)₄

 $^{^{4}}$ Le dispersioni colloidali sono miscele di due fasi: una fase costituita da una sostanza di dimensioni nanometriche (diametro compreso tra 1 nm e 1 μ m) e una fase continua disperdente.

Di seguito la reazione di idrolisi per un alcossido a base di silicio:

0

$$Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow HO - Si(OR)_3 + ROH$$

Due molecole parzialmente idrolizzate possono reagire insieme in una reazione di condesazione (Brinker et al, 1990):

 $Si(OR)_3 - OH + HO - Si(OR)_3 \rightarrow (OR)_3Si - O - Si(OR)_3 + H_2O$ $Si(OR)_3 - OR + HO - Si(OR)_3 \rightarrow (OR)_3Si - O - Si(OR)_3 + ROH$

Generalmente le reazioni di idrolisi e condensazione avvengono contemporaneamente, una volta che la prima reazione di idrolisi è avvenuta.

Le reazioni nel caso di alcossidi metallici non necessitano della presenza di un catalizzatore perchè sono altamente reattivi; per gli alcossidi a base di silicio le reazioni di idrolisi e condensazione procedono, invece, grazie alla presenza di un catalizzatore acido o basico (Wen et al, 1996). La struttura e la morfologia della matrice che ne deriva dipende fortemente dalla natura del catalizzatore. In caso di catalisi acida sono favorite le reazioni di idrolisi (il gruppo -Si-OR diviene nucleofilo e attrae i protoni, diventando più 'positivo', attrae così gli elettroni del silicio, che assume una parziale carica positiva); mentre in caso di catalisi basica sono favorite le reazioni di condensazione (gli ioni OH- attaccano direttamente il silicio, che possiede una parziale carica positiva per la vicinanza con l'ossigeno) (Innocenzi, 2019).

L'effetto del pH sul processo viene riportato in Figura 1.7.



Figura 1.7. Influenza del pH durante il processo sol-gel (ALOthman, 2012)

Dunque nel caso di catalisi acida si ha un gel con una struttura più densa, poiché il silicio elettrofilo predilige strutture lineari, mentre nel caso di catalisi basica la struttura é più porosa, essendo favorita la formazione di strutture più ramificate (Brinker, 1988). Tra gli alcossidi a base di silicio maggiormente utilizzati c'è il tetraetil ortosilicato (TEOS, Si(OC₂H₅)₄), utilizzato in questo lavoro di tesi.

1.5.2.2. Processo sol-gel per i materiali ibridi

Il processo *sol-gel* si basa dunque su reazioni di polimerizzazione inorganica, viene eseguito a bassa temperatura e può avvenire in un solvente organico; per questi motivi è ampiamente utilizzato per la realizzazione di materiali ibridi organici-inorganici con composizione ben controllata attraverso l'incorporazione di molecole organiche nella matrice inorganica (Wen et al, 1996). Nel materiale formato la porzione organica presenta una maggiore stabilità rispetto ai componenti liberi (Pagliaro et al, 2007).

I gruppi organici nei materiali derivati da sintesi di tipo *sol-gel* possono avere scopi diversi:

- Possono controllare la velocità di reazione dei reagenti, le reologia del *sol* o l'omogeneità e la microstruttura dei *gel* derivati, per poi essere degradati durante il processo di calcinazione al fine di ottenere un materiale puramente inorganico;
- Possono essere trattenuti per modificare o funzionalizzare il materiale inorganico; si ottiene dunque un materiale composto da strutture inorganiche reticolate funzionalizzate da gruppi organici (Pandey et al, 2011).

Durante la sintesi dei materiali appartenenti alla classe I (in cui le interazioni tra fase organica e inorganica sono deboli, vedere paragrafo 1.3.) le molecole organiche vengono disciolte fisicamente insieme ai precursori della fase inorganica (come ad esempio il tetraetossisilano TEOS o il tretrametossisilano TMOS) oppure vengono introdotte allo stato *sol* e rimangono intrappolate nel *gel* risultante dalla condesazione e dall'essicazione della miscela dopo il processo di formazione. Nella sintesi della classe II (dove le interazioni tra la fase organica e inorganica sono di tipo covalente, vedere 1.3.) dei materiali, invece, le molecole organiche vengono modificate chimicamente per fissarle in modo covalente alla rete inorganica (Schottner, 2001).

Dunque le molecole organiche vengono aggiunte al *sol* e sono fisicamente intrappolate nelle cavità della matrice formata; a tal proposito devono resistere alle condizioni operative del processo *sol-gel*.

L'intrappolamento fisico ha lo svantaggio di portare alla formazione di materiali in cui è presente una segregazione di fase. Tuttavia ci sono casi in cui una controllata separazione di fase tra le molecole organiche e la matrice inorganica derivante dal prcesso *sol-gel* è vantaggiosa, come nel caso di materiali mesoporosi (Kickelbick, 2007). Le proprietà del materiale ibrido finale non solo dipendono dalle proprietà dei componenti organici e inorganici, ma anche dalla morfologia della fase e dalla regione di interfaccia tra i due componenti.

In particolare, il processo *sol-gel* partendo da precursori contenenti silicio è uno dei più utilizzati per la formazione di materiali ibridi; questo grazie alla forte stabilità del legame che il Si può formare con la porzione organica (Schottner, 2001).

1.6. Dai materiali ibridi mesoporosi ai mesostrutturati

Dal processo *sol-gel* si ottengono materiali ibridi mesostrutturati⁵, che possono diventare materiali mesoporosi⁶ puramente inorganici se sottoposti al processo di calcinazione; tuttavia è possibile sintetizzare anche materiali ibridi mesoporosi.

1.6.1. I materiali ibridi mesoporosi

I materiali ibridi mesoporosi sono caratterizzati da pori ordinati con diametri da 2 a 10 nm (Kickelbick, 2014), con una forma che dipende dalle caratteristiche dell'agente strutturante (*template*). Tre metodi principali possono portare alla formazione di materiali ibridi mesoporosi:

- Inserimento post-sintesi di agenti di accoppiamento silano sulla superficie di materiali porosi puramente inorganici (Doadrio et al, 2006) (Figura 1.8, sinistra); tuttavia questo metodo può portare a una distribuzione non omogenea dei gruppi funzionali e a una diminuizione del volume dei pori (Kickelbick, 2004).
- Co-condensazione dei tetraalcossisilani durante il processo di sintesi; questo consente un *loading* maggiore dei gruppi funzionali (Kickelbick, 2004) (**Figura 1.8**, destra).
- Uso di precursori alcossisilani per formare organosilici mesoporose periodiche, che contengono i gruppi organici all'interno delle pareti dei pori (Asefa et al, 1999) (Figura 1.9.); la porzione organica e quella inorganica sono covalentemente legate. In questo modo la porzione organica è omogeneamente dispersa nel materiale, inoltre i gruppi organici non diminuiscono il volume dei pori (Kickelbick, 2004).



Figura 1.8. Sintesi materiale ibrido con gruppi organici sulla superficie dei pori (Kickelbick, 2004)



Figura 1.9. Sintesi materiale ibrido con gruppi organici sulle pareti dei pori (Kickelbick, 2004)

⁵ Un materiale mesostrutturato è un materiale ibrido formato da una struttura inorganica mesoporosa i cui pori contengono la porzione organica.
⁶ Un materiale mesoporoso ha aperture all'interno della sua struttura che hanno un diametro compreso tra 2 e 50 nm. In

⁶ Un materiale mesoporoso ha aperture all'interno della sua struttura che hanno un diametro compreso tra 2 e 50 nm. In termini di porosità, è tra un materiale microporoso, che ha aperture inferiori a 2 nm, e un materiale macroporoso, che ha aperture maggiori di 50 nm.

1.6.2. Materiali ibridi mesostrutturati da processo *sol-gel* e principio di *self-assembly*

Alla fine degli anni '90 emerge la possibilità di sintetizzare materiali ibridi mesostrutturati dall'utilizzo di precursori (porzione inorganica) e tensioattivi (porzione organica), che fungono da *template*.

Uno degli aspetti di maggiore importanza nella formazione di strutture ibride derivanti dal processo *sol-gel* è la capacità di *self-assembly* delle molecole di tensioattivo come *template*, che viene usata per la formazione controllata di materiali porosi (Beck et al, 1992). Il *self-assembly* è un processo di associazione di singole unità di un materiale in strutture altamente organizzate e ordinate (Yadav et al, 2020); l'aggregato finale in condizione di equilibrio termodinamico minimizza l'energia libera di Gibbs a temperatura e pressione costanti (Grzybowski et al, 2009).

Il tensioattivo si autoassembla in presenza dei precursori del processo *sol-gel*, i quali formano la matrice inorganica intorno a queste strutture autoassemblate; le molecole di tensioattivo (**Figura 1.10**) si organizzano in micelle quando la concentrazione della soluzione supera il valore critico micellare (CMC) (Rangel-Yagui et al, 2005). Le micelle sono strutture sferiche che si orientano in modo da esporre la testa idrofila all'esterno e la coda idrofobica all'interno della struttura. Generalmente, per questo motivo, vengono utilizzate molecole anfifiliche⁷ (Pagliaro et al, 2007).



Figura 1.10 Formazione di micelle (Grzybowski, 2009)

Ha luogo, dunque, un meccanismo secondo cui il tensioattivo e il precursore agiscono simultaneamente per formare il materiale ibrido organico-inorganico. La matrice inorganica si forma grazie alla presenza del *template* organico; si ottiene un materiale mesostrutturato in caso di struttura ordinata, ibrido nel caso più generale.

Quest'ultimo, se sottoposto a processi di calcinazione ad alte temperature (500-550°C), può perdere la porzione organica con funzione di *template* e diventare un materiale mesoporoso. In **Figura 1.11** viene raffigurato il processo descritto.

⁷ Una molecola si dice anfifilica (o anfipatica o anche amfifilica) se presenta sia un gruppo idrofilo che un gruppo idrofobo



Figura 1.11. Self-assembly tra tensioattivo e materiale inorganico: formazione di materiale mesoporoso (Grzybowski, 2009)

Le interazioni formate durate il processo di *self-assembly* sono interazoni deboli (elettrostatiche, idrofobiche, legami a idrogeno e interazioni di Van der Walls). Queste interazioni, prese singolarmente, sono deboli se paragonate ai legami covalenti; tuttavia, in un numero sufficiente, possono generare un aggregato estrememante stabile (Mendes et al, 2013). Il *self-assembly* procede tenendo conto di una certa specificità nelle interazioni; inoltre la specificità è spesso collegata alla direzionalità delle interazioni stesse. La direzione delle interazioni a livello locale influenza la macrostruttura finale ottenuta (Grzybowski et al, 2009).

La principale forza trainante del *self-assembly* è la diminuzione dell'energia libera del sistema, dovuta alla rimozione di frammenti idrofobici dall'ambiente acquoso con la formazione di un nucleo micellare stabilizzato con blocchi idrofili esposti all'acqua (Jones et al, 1999). La concentrazione di micellazione critica (CMC) è il parametro chiave che caratterizza la formazione delle micelle: alla concentrazione critica micellare e leggermente al di sopra, le micelle non sono ancora stabili e contengono acqua nel nucleo (Gao et al, 1993). Con l'ulteriore aumento della concentrazione di anfifili nel mezzo, ci si sposta verso la formazione di micelle, le quali diventano più strette e stabili, perdono il solvente residuo dal nucleo e diminuiscono le loro dimensioni. Minore è il valore CMC di un polimero anfifilico, più stabili sono le micelle, anche a bassa concentrazione di anfifilo. Il processo di micellizzazione viene raffigurato in **Figura 1.12**.



Figura 1.12 Processo di micellizzazione (Gao et al, 1993)

1.7. Sistemi ibridi a base di silicio: influenza del tensioattivo

Un'importante famiglia di silici a mesoporisità ordinata sono le MCM-41. Il materiale ancora contenente la porzione organica può essere definito "mesostrutturato": solo a seguito della rimozione del tensioattivo diventa una silice mesoporosa, ovvero una MCM-41.

Di seguito viene analizzato più nel dettaglio il processo che porta alla formazione del precursore ibrido (ancora contenente il tensioattivo) della MCM-41. In particolare viene riportato il caso (analogo a quello del presente lavoro di tesi) in cui l'agente templante è il tensioattivo cationico bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB) (**Figura 1.13**, destra) e il precurosore é il TEOS (**Figura 1.13**, sinistra), scelto per la sua stabilità chimica, disponibilità e prezzo.



Figura 1.13 Struttura chimica del TEOS (sinistra) e del CTAB (destra)

La sintesi si basa dunque sulla polimerizzazione idrolitica di un precursore di SiO_2 su una fase micellare CTAB, responsabile del meso-ordine finale. Il TEOS viene idrolizzato in condizioni basiche per produrre gruppi silanolici in grado di auto-condensare (Castillo et al, 2020)

Nell'interazione tra tensioattivo e precursore sono stati individuati diversi possibili meccanismi di azione:

1. *Templating*:

Nelle prime fasi di idrolisi il precursore tende ad adsorbirsi sulla superficie esterna delle micelle, diminuendo così la carica superficiale e la repulsione tra le micelle stesse. In questo modo l'aggregazione tra la porzione inorganica e il tensioattivo viene resa possibile; la scelta del tensioattivo determina la forma finale della mesostruttura (Narayan et al, 2018).

2. Cooperative self-assembly:

Non si prevede una struttura organica precedentemente formata, in quanto viene presentata una sorta di co-ordinazione tra la fase organica e quella inorganica; il precursore ha un ruolo fondamentale e influenza, insieme al tensioattivo, la mesostuttura finale (Huo et al, 1994).

3. Swelling-shrinking:

Il tensioattivo si coordina in micelle, con un *core* costituito da code idrofobiche; quando il precursore viene aggiunto raggiunge l'interno delle micelle dove viene solubilizzato, causaundo un allargamento delle micelle stesse. Non appena il precursore idrolizza in condizioni basiche, esce dal *core* verso l'ambiente acquoso; esso si adsorbe sulla superficie esterna delle micelle, avendo le micelle carica positiva e i monomeri idrofili carica negativa. Il precursore viene consumato e le micelle si restringono (**Figura 1.14**) (Yi et al, 2015).



Figura 1.14 Schematizzazione del meccanismo di azione 'swelling-shrinking' (Yi et al, 2015).

Variando la composizione dell'idrogel, il tipo e la lunghezza del tensioattivo, l'alcalinità, la temperatura e il tempo di sintesi (Meynen, 2009) è possibile ottenere silici mesoporose con diverse strutture, come riportato nella **Figura 1.15**.



Figura 1.15 Diverse strutture dei precursori della silici appartenentialla famiglia delle M41S (ALOthman, 2012).

Il tipo di mesofase può essere predetta dal 'packing factor' (g), che è una misura dell'effettivo impaccamento locale del tensioattivo (Ciesla, 1999):

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

dove V rappresena il volume totale delle catene del tensioattivo, a_0 l'area effettiva delle teste polari sulla superficie delle micelle ed l la lunghezza effettiva delle catene di tensioattivo (Meynen, 2009). Nella **Figura 1.16** viene descritto il *'packing factor'* per le diverse mesofasi.



Figura 1.16 Packing factor per le diferse mesofasi (Meynen, 2009)

Le molecole di tensioattivo sono componenti molti attivi, che si aggregano in strutture diverse al variare della concentrazione (**Figura 1.17**). A basse concentrazioni i tensioattivi esistono come monomolecole; con l'aumentare della concentrazione, le molecole di tensioattivo di combinano per formare micelle al fine di diminuire l'entropia del sistema (Broekhoff, 1979).



Figura 1.17 Influenza della concentrazione di tensioattivo sulla struttura della mesofase (Broekhoff, 1979)

Aumentando la concentrazione, al di sopra della concentrazione critica micellare, la struttura inizia ad avere una simmetria esagonale; lo step successivo è la coalescenza di cilindri adiacenti e paralleli che porta alla fase lamellare. In qualche caso la fase cubica può essere ottenuta prima della fase lamellare (Myers, 2020).

Questo concetto si evince anche osservando il diagramma di fase acqua/CTAB (**Figura 1.18**): variando la concentrazione di tensioattivo ci si sposta da una mesofase all'altra.



Figura 1.18 Diagramma di fase acqua/CTAB a varie temperature: dove L è la fase della soluzione, E, I, L sono rispettivamente la fasi cristalline esagonale, cubica e lamellare (Wärnheim et al, 1988)

Nel seguente lavoro di tesi si presenta un incremento della concentrazione di tensioattivo rispetto alla concentrazione che porta alla formazione della mesofase esagonale, al fine di ottenere un sistema ibrido disordinato. Lo scopo é quello di confrontare quest'ultimo sistema con la mesostruttura esagonale in termini di performance nel campo del drug delivery⁸.

⁸ Per drug delivery si intende la veicolazione di una sostanza, in maniera precisa verso la zona, tessuto o cellula dove il suo conseguente rilascio controllato garantirà la maggiore efficienza.

2. Sistemi ibridi per il drug delivery

2.1. Sistemi self-assembled per il drug delivery

2.1.1. Self-assembly per il drug delivery

Per ridurre al minimo la degradazione e la perdita di farmaci, prevenire effetti collaterali dannosi e aumentare la biodisponibilità⁹ del farmaco e la frazione del farmaco accumulata nella zona richiesta, sono attualmente in fase di sviluppo vari sistemi di somministrazione e targeting dei farmaci (Torchilin, 2001). Tra i vettori di farmaci si possono citare carrier organici (a base di lipidi o di polimeri, **Figura 2.1**) e carrier inoganici (silice mesoporosa). Ciascuno di questi tipi di vettore ha i suoi vantaggi e i suoi difetti, quindi la scelta di un determinato vettore viene fatta tenendo conto di una serie di considerazioni.



Figura 2.1 Vettori di farmaci organici utilizzati nel drug delivery (Torchilin, 2001).

Nell'ultimo decennio numerose sono state le innovazioni attorno ai sistemi per il drug delivery che sfruttano il principio del *self-assembly* (Drummond et al, 1999).

Un processo ideale di *self-assembly* consiste nell'incorporare il principio attivo nel sistema attraverso delle interazioni con il *template* organico. La dimensione di tale sistema è di qualche nanometro, così da poter penetrare in vari tessuti e persino nelle cellule; esso dovrebbe essere stabile *in vivo* per un periodo di tempo sufficientemente lungo senza provocare reazioni biologiche; dovrebbe rilasciare il farmaco al contatto con tessuti/cellule bersaglio; i componenti del vettore dovrebbero essere facilmente rimossi dal corpo quando la funzione terapeutica è espletata (Kabanov et al, 1992).

⁹ La biodisponibilità indica il grado e la velocità in cui la forma attiva di un farmaco raggiunge la circolazione sistemica, acquisendo così la capacità di accedere al suo sito d'azione.

Nel presente lavoro di tesi ci si è concentrati sui sistemi micellari, in virtù di alcune loro caratteristiche riportate nel paragrafo seguente.

2.1.2. Vantaggi dei sistemi micellari

Tra i sistemi *self-assembled*, quelli micellari presentano alcuni vantaggi rispetto ad altri vettori di farmaci (Torchilin, 2001):

- Le micelle sono ottenute in modo facile e riproducibile su larga scala;
- Ligandi specifici possono essere attaccati alla loro superficie esterna per ottimizzare il rilascio controllato e la specificità dell'effetto farmacologico;
- Essi possono solubilizzare farmaci poco solubili e quindi aumentare la loro biodisponibilità;
- Essi possono rimanere nel corpo abbastanza a lungo fornendo un apporto graduale nel tempo;
- Il farmaco, essendo in forma micellare, è ben protetto da possibile inattivazione da parte dell'ambiente biologico;
- Le micelle hanno una dimensione normalmente compresa tra 5 e 100 nm, colmando il divario tra vettori di farmaci come singole macromolecole, con dimensioni inferiori a 5 nm, e particelle come liposomi e microcapsule con dimensioni da 50 nm in su;
- Essi non provocano effetti collaterali: la micella è strutturata in modo tale che la superficie esterna della micella esposta nell'ambiente acquoso sia costituita da componenti difficilmente reattivi nei confronti di componenti del sangue o dei tessuti, garantendo una particolare longevità.

2.1.3. Incorporazione del farmaco

È noto che le micelle fatte di tensioattivi non ionici (le micelle farmaceutiche più utilizzate) hanno una distribuzione anisotropa¹⁰ dell'acqua all'interno della loro struttura: la concentrazione dell'acqua diminuisce dalla superficie verso il *core* della micella. A causa di questa anisotropia, tali micelle possiedono un gradiente di polarità dalla superficie altamente idratata al *core* idrofobico. Di conseguenza, la posizione spaziale di una certa sostanza solubilizzata (farmaco) all'interno di una micella dipenderà dalla sua polarità (Torchilin, 2001). Nei sistemi acquosi, le molecole non polari saranno solubilizzate all'interno del nucleo della micella, le molecole polari saranno distribuite lungo le molecole di tensioattivo in determinate posizioni intermedie (**Figura 2.2**).

¹⁰ L'anisotropia è condizione caratteristica delle sostanze allo stato cristallino nelle quali la distribuzione della materia nello spazio varia a seconda della direzione e di conseguenza possono variare i valori delle proprietà vettoriali.

2. Sistemi ibridi per il drug delivery



Figura 2.2 Possibili posizioni del farmaco all'interno della micella, dipendenti dall'idrofobicità del farmaco stesso (Torchilin, 2001).

La capacità dei tensioattivi di incorporare farmaci dipende da fattori quali la struttura chimica del farmaco e del tensioattivo, la polarità del farmaco, la posizione del farmaco all'interno delle micelle, la temperatura, il pH, ecc. Pertanto, un aumento della lunghezza di una regione idrofobica del tensioattivo facilita la solubilizzazione di farmaci idrofobici all'interno del nucleo micellare (Torchilin, 2001).

I farmaci *insolubili* possono essere incorporati nelle micelle per coniugazione chimica o per intrappolamento fisico mediante tecniche di dialisi o emulsione, dato che il semplice equilibrio del farmaco e delle micelle in acqua potrebbe non portare a livelli elevati di farmaco incorporato (Kwon et al, 1997).

- 1. La coniugazione chimica implica la formazione di un legame covalente, come un legame ammidico, tra gruppi specifici sul farmaco e il polimero idrofobico del nucleo. Tali legami sono resistenti alla scissione enzimatica principalmente a causa dell'impedimento sterico e non possono essere facilmente idrolizzati a meno che non vengano introdotti gruppi spaziatori (Ulbrich et al, 1987).
- 2. L'intrappolamento fisico dei farmaci viene generalmente eseguito mediante la *dialisi* (Figura 2.3.a) o la procedura di *emulsione olio-acqua* (Figura 2.3.b). Il metodo della dialisi consiste nel portare il farmaco e il copolimero da un solvente in cui sono entrambi solubili ad un solvente selettivo solo per la parte idrofila del polimero. Poiché il primo solvente viene sostituito da quello selettivo, la porzione idrofobica del polimero si associa per formare il nucleo micellare che incorpora il farmaco insolubile durante il processo. L'applicazione della dialisi per diversi giorni può garantire la completa rimozione del solvente volatile insolubile in acqua in modo da formare un'emulsione olio in acqua. Il coniugato micellare-farmaco si forma quando il solvente evapora (Jones et al, 1999).



Figura 2.3 Incorporazione fisica di farmaci insolubili mediante dialisi (a) e emulsione olio-acqua (b). (Kwon et al, 1997)

2.1.4. Rilascio del farmaco

I farmaci incorporati nelle micelle possono essere rilasciati lentamente da una micella intatta, soprattutto se tali farmaci non sono troppo idrofobici (Yokoyama et al, 1998). Quando il farmaco è legato in modo covalente a un blocco idrofobico, il legame farmaco-polimero deve essere scisso per il successivo rilascio del farmaco. La velocità di rilascio del farmaco dalla micella può essere controllata da un'intera varietà di parametri come la struttura della micella, la dimensione di un blocco idrofobico, lo stato di fase del nucleo della micella, il valore del pH del mezzo esterno e la temperatura (Torchilin, 2001).

È stato riconosciuto per diversi decenni che le fasi cristalline liquide liotropiche formate da sistemi tensioattivi acquosi possono fornire matrici per il rilascio prolungato di farmaci. Il profilo di rilascio del farmaco dalla matrice è influenzato da (Drummond et al, 1999):

- fattori correlati al farmaco come la costante di diffusione, solubilità e coefficiente di partizione;
- fattori correlati alla matrice come geometria, porosità e tortuosità dei pori.

Quando le dimensioni molecolari del farmaco sono paragonabili alla dimensione dei pori (canale), la costante di diffusione è il fattore più importante per determinare la velocità di rilascio. Forti interazioni farmaco-tensioattivo cambiano questa situazione.

2.2. Dal problema alla soluzione

Nei paragrafi precedenti sono stati presentati i vantaggi dei sistemi ibridi e delle micelle per il drug delivery. L'idea alla base del presente lavoro di tesi è quella di coniugare i vantaggi di uno e dell'altro sintetizzando dei sistemi ibridi basati sul *self-assembly* di micelle. Lo scopo finale è quello di utilizzare tali sistemi (ibridi silice-micelle) per il rilascio topico di uno specifico principio attivo, la Vitamina D₃, contro la psoriasi, una diffusa patologia della pelle. Psoriasi e Vitamina D₃ vengono presentate in dettaglio nei successivi paragrafi.

2.2.1. Psoriasi

2.2.1.1. Cos'è la psoriasi

La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica della pelle con una forte predisposizione genetica e tratti patogeni autoimmuni (Rendon et al, 2019). Circa il 2-3% della popolazione mondiale ne è affetto (Napolitano et al, 2016).

Il tipo più comune di psoriasi è la psoriasi a placche, che rappresenta circa l'80-90% dei casi. Le lesioni psoriasiche si trovano solitamente sul cuoio capelluto, sulle pieghe della pelle, sulle mani, sui piedi, sulle unghie e sui genitali (Damiani et al, 2021).

La psoriasi di solito si manifesta con sintomi cutanei come pelle arrossata e secca con chiazze in rilievo e infiammate, squame o placche argentate, prurito, unghie spesse e bucherellate e gonfiore (Damiani et al, 2021); una schematizzazione viene rappresentanta in **Figura 2.4**. Le placche psoriasiche si formano per effetto dell'iperplasia¹¹ epidermica risultante da una maggiore proliferazione e da un'alterata differenziazione dei cheratinociti¹² (Benhadou et al, 2019).



Figura 2.4 Rappresentazione schematica psoriasi.

¹¹ L'iperplasia è il processo biologico progressivo, che porta alla crescita del volume di un organo o di un tessuto per aumento del numero delle cellule che lo costituiscono.

¹²I cheratinociti sono il tipo cellulare più abbondante nell'epidermide. Sono presenti in tutti i suoi strati che rappresentano le tappe del ciclo vitale del cheratinocita.

2.2.1.2. Quali sono le cause

Le cause della psoriasi non sono del tutte note. La psoriasi è una malattia immunomediata conseguente a una disfunzione del sistema immunitario (Benhadou et al, 2019): le cellule del sistema immunitario attaccano le cellule sane per errore. Diversi fattori contribuiscono al suo sviluppo, come problemi autoimmunologici, genetici, ormonali e psicosomatici.

2.2.1.3. Possibili trattamenti

La psoriasi non può essere curata, tuttavia può essere ridotta o controllata attraverso somministrazioni orali o topiche generalemente a lungo termine.

Le somministrazioni orali sono in genere da evitare, fatto eccezioni di casi particolarmente gravi, in quanto mostrano un'elevata tossicità nei trattamenti a lungo termine.

Le somministrazioni topiche riguardano agenti attivi che hanno una particolare efficacia nel trattamento della malattia, come corticosteroidi¹³ topici o l'antralina¹⁴. Il metodo di somministrazione topica tra lozioni, creme o gel dipende dal tipo di psoriasi, dalla localizzazione corporea e dalle preferenze del paziente. Tuttavia anche questi trattamenti presentano degli effetti indesiderati: ad esempio i corticosteroidi tipici possono causare disturbi come atrofia e secchezza cutanea, lividi, alterazione del pigmento.

Un sistema di somministrazione del farmaco ideale per il trattamento della psoriasi dovrebbe penetrare negli strati cutanei più profondi entrare nel compartimento sistemico e mostrare un profilo di rilascio del farmaco prolungato (Pukale et al, 2020).

Si sono quindi studiati trattamenti alternativi al fine di ridurre gli svantaggi in una somministrazione a lungo termine e di aumentare l'efficienza della terapia. Tra le alternative ci sono i derivati della vitamina D, che vengono utilizzati a causa della loro capacità di inibire l'eccessiva proliferazionde dei cheratinociti (Barrea et al, 2017).

2.2.2. La vitamina D₃

La vitamina D può apparire in cinque forme diverse: vitamina D_1, D_2, D_3, D_4, D_5 ; ogni forma è un pro-ormone liposolubile¹⁵. Le fonti principali di assunzione della vitamina D per l'uomo sono l'esposizione alla radiazione solare e la dieta (fonte minore); tuttavia essa deve subire delle reazioni di idrossilazione per essere trasformata in una forma attiva. La carenza di vitamina D è una condizione molto diffusa che colpisce circa un miliardo di persone in tutto il mondo.

Le due forme più importanti sono la vitamina D_2 (ergocalciferolo) e la vitamina D_3 (colecalciferolo, **Figura 2.5**). In particolare, la vitamina D_3 è un pro-ormone prodotto nella pelle attraverso l'irradiazione ultravioletta. Pertanto le persone che non sono soggette a sufficiente luce solare o radiazione solare a causa delle loro abitudini di abbigliamento o della regione geografica di vita possono essere esposte a carenza di vitamina D.

¹³ Gli antinfiammatori steroidei (cortisonici o corticosteroidi) derivano dal cortisone e agiscono bloccando il processo infiammatorio.

¹⁴ L'antralina è il principio attivo di indicazione specifica contro alcune malattie dermatologiche.

¹⁵ La liposolubilità è la solubilità di una sostanza chimica nei lipidi.

2. Sistemi ibridi per il drug delivery



Figura 2.5 Struttura chimica del colecalciferolo.

La vitamina D₃ è metabolicamente inattiva e deve essere trasformata nella sua forma ormonale prima di poter essere utilizzata (DeLuca, 2004); il processo di trasfomazione, con due idrossilazioni, che porta alla formazione della 1α ,25-diidrossivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] è raffigurato in **Figura 2.6**.



Figura 2.6 Dalla forma intattiva della vitamina D₃ a quella attiva. (DeLuca, 2004)

La forma attiva del colecalciferolo svolge un ruolo importante nel mantenimento dei livelli di calcio e fosforo nel sangue e nella mineralizzazione delle ossa (Goltzman, 2018). Negli ultimi anni molti studi hanno prestato attenzione ad azioni non classiche della vitamina D₃, come la soppressione della crescita cellulare, la regolazione dell'apoptosi¹⁶, la modulazione delle risposte immunitarie, il controllo del sistema nervoso, la secrezione di insulina e la funzione muscolare (Goltzman, 2018; Abdo et al, 2017; Smolders et al, 2008; Barrea et al, 2017). Il numero di tali pubblicazioni è notevolmente aumentato a causa del COVID-19, dato il ruolo positivo della vitamina D₃ sulla risposta immunitaria.

¹⁶ L'apoptosi indica una forma di morte cellulare programmata.

2.2.2.1. Proprietà chimiche

Il colecalciferolo ha un peso molecolare di 384.6 g/mol, la sua formula chimica è $C_{27}H_{44}O$ e la sua temperatura di fusione è 83°C.

La vitamina D_3 è una grande molecola idrofobica con scarsa solubilità in acqua (Pedersen et al, 2016), la cui degradazione è per lo più mediata da reazioni ossidative (Mahmoodani et al, 2018). Fattori che potrebbero indurre e influenzare l'ossidazione sono la luce, l'ossigeno e gli ioni metallici. Per questo motivo risulta essere problematica in termini di stabilità (Temova e Roškar, 2017).

La vitamina D₃ può essere considerata un acido debole secondo la teoria di Bronsted. Inoltre risulta essere instabile in ambienti acidi e più stabile a valori di pH superiori a 5 (Temova Rakuša et al, 2021).

2.3.2.2. Somministrazione

Il farmaco può seguire diverse vie prima di raggiungere il sito d'azione a cui è destinato; la diversa via di somministrazione può variare gli effetti del farmaco stesso: si passa da un effetto locale a un effetto sistemico.

La somministrazione topica, oltre ad essere locale, mostra il vantaggio di garantire un rilascio continuo del farmaco (Alsaqr et al, 2015); inoltre, tramite l'applicazione topica, si può localizzare un'elevata concentrazione di principio attivo negli strati cutanei superiori e anche ridurre al minimo l'esposizione sistemica al farmaco (Ramezanli et al, 2017). Questo tpo di somministrazione è possibile in quanto sulla superficie dei carotenoidi ci sono dei recettori che riconoscono la vitamina D₃, la quale viene convertita nella sua forma attiva dai carotenoidi stessi (Lehmann, 2005).

Tuttavia, restano delle difficoltà dovute alla selettività della pelle umana. In **Tabella 2.1** vengono riportati i requisiti che una molecola deve possedere per attraversare la barriera cutanea (Chandrashekar e Rani, 2008; Kangarlou et al, 2006; Raska Jr e Toropov, 2006) e, in confronto, le caratteristiche della vitamina D_3 .

REQUISITO		VITAMINA D ₃
Peso molecolare	<600 Da	384,64 Da
Coefficiente di ripartizione ¹⁷	$-1 < \log P < 4$	10.2
Solubilità	Adeguata solubilità nei lipidi e in acqua	Solubile in etanolo, acetone, etere e cloroformio, insolubile in acqua

Tabella 2.1 Requisiti necessari per attraversamento della barriera cutanea.

¹⁷ Il coefficiente di ripartizione indica il grado di liposolubilità delle molecole. Esso viene calcolato come il rapporto tra la concentrazione del farmaco nella fase lipidica e quella nella fase acquosa di una miscela. Un valore alto di coefficiente di ripartizione lipidi/acqua indica che la molecola è liposolubile, poiché la sua concentrazione è maggiore nella fase lipidica.
Dalla **Tabella 2.1** si deduce che la Vitamina D_3 è un ottimo candidato per la somministrazione topica a causa delle dimensioni della molecola, ma pessimo se si considera la sua scarsa solubilità in acqua. E' proprio per questo che è necessario trovare un carrier che ne aumenti la solubilità e conferisca stabilità. A tal proposito, la formulazione di vitamine all'interno di una matrice garantisce maggiore permeabilità, stabilità o biodisponibilità del composto nativo, inoltre migliora l'efficacia dell'integrazione vitaminica (Rejinold et al, 2019). Diversi studi si sono posti come obiettivo quello di migliorare la biodisponibilità, consentire il rilascio prolungato, ridurre la decomposizione di composti instabili e consentire un rilascio efficace di molecole grandi o lipofile. In particolare, la **Figura 2.7.** illustra diversi materiali che sono stati proposti come agenti di rilascio di vitamina D fino ad oggi.



Figura 2.7 Diversi materiali che sono stati esplorati come agenti di rilascio di vitamina D fino ad oggi (Rejinold et al, 2019)

Analizzando in dettaglio i vari sistemi, si descrivono prima formulazioni strutturate sulla microscala, poi si passa alla nanoscala.

Microparticelle e microsfere

Le microparticelle hanno una dimensione nell'intorno dei μ m; esse possono essere utilizzate nella somministrazione topica previa dispersione in microgel, micro emulsioni e creme (Rejinold et al, 2019) grazie alla loro multifunzionalità e la capacità di mirare cellule specifiche. Sono state proposte anche come carrier di vitamina D₃.

Le microsfere, invece, hanno una forma sferica regolare; esse presentano il vantaggio di ridurre la frequenza di dosaggio del farmaco in quanto garantiscono un rilascio costante e prolungato del prinicipio attivo attraverso vari meccanismi (Pradhan et al, 2013).

Un *esempio* viene presentato nello studio di Wang et al (2013): gli autori indagano un sistema per migliorare il rilascio della vitamina D_3 per la cura della parodontite¹⁸ da complicanza diabetica. Incroporando il principio attivo in microsfere di acido polilattico (PLA) si dimostra una riduzione dei segni della parodontite sui ratti con un rilascio di 10 settimane, riuscendo ad ottenere così un sistema che prolunghi l'effetto terapeutico.

Nanoemulsioni

Le nanoemulsioni possono essere definite come emulsioni di una fase oleosa in una fase acquosa o viceversa (**Figura 2.8**); facilitano la penetrazione nella pelle dei principi attivi, talvolta lipofilici grazie al loro nucleo lipofilo. Un tensioattivo solubilizza le fasi immiscibili creando una repulsione fisica tra le gocce, evitando la coalescenza delle stesse (Simonazzi et al, 2018); le interazioni tensioattivo-principio attivo regolano il rilascio del farmaco (Pradhan et al, 2013).



Figura 2.8 Schematizzazione nanoemulsione (Guidotti).

Le nanoemulsioni sono di facile sintetizzazione, sterilizzazione e hanno delle dimensioni che vanno dai 100 ai 500 nm; inoltre presentano un'elevata area superficiale e non sono tossiche.

Un *esempio* è stato presentato nello studio di Wei-hong et al. (2013) per la cura dell'asma¹⁹. Gli autuori hanno incorporato la vitamina D_3 in nanoemulsioni; dai risultati risulta evidente come le nanoemulsioni aumentino l'assorbimento orale della vitamina D_3 rispetto alla somministrazione della vitamina pura. Questo aumento della biodisponibilità ha portato a un miglioramento dell'attività farmacologica.

¹⁸ La parodontite è una malattia dentale ad eziologia batterica e a patogenesi infiammatoria.

¹⁹ L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, caratterizzata dall'ostruzione, generalmente reversibile, dei bronchi.

2. Sistemi ibridi per il drug delivery

Nanomicelle

Questi sistemi nascono quando molecole anfifiliche si aggregano in micelle in una situazione in cui la loro concentrazione è al di sopra della concentrazione critica micellare; hanno delle dimensioni nanometrice (Pradhan et al, 2013). Come detto in precedenza (vedere paragrafo 2.1.) presentano il vantaggio di aumentare la solubilità di molecole non solubili in acqua attraverso l'incorporazione delle stesse tra le code idrofobiche.

Hanham et al. (2012) hanno riportato nel loro studio un *esempio*: nanomicelle di caseina naturale di dimensioni di circa 91 nm sono state utilizzate come nanoveicoli per la vitamina D_3 . Le micelle di caseina realizzate sono state processate con una fase di omogeneizzazione ad altissima pressione per migliorare la farmacocinetica. La perdita di vitamina D_3 è stata minima, con una buona stabilità termica.

Nanoparticelle polimeriche

Con il termine nanoparticella si identificano normalmente delle particelle formate da aggregati atomici o molecolari con un diametro compreso indicativamente fra 10 e 1000 nm. Le nanoparticelle polimeriche nascono dall'aggregazione di polimeri biocompatibili e biodegradabili e si presentano sotto forma di nanosfere, nanocapsule o in micelle; il farmaco può essere adsorbito sulla superficie della particella oppure può essere incapsulato al suo interno (nanocapsule) o uniformente disperso nella matrice polimerica (nanosfere), come riportato in **Figura 2.9** (Pradhan et al, 2013).



Figura 2.9 Nanosfere e nanocapule utilizzate per il drug delivery (Lai, Nanoparticelle Polimeriche).

Il rilascio del farmaco è gestito dalla membrana polimerica, dunque fattori di rilevata importanza sono la solubilità e la diffusibilità del farmaco nella membrana stesa.

Tra i principali vantaggi (Simonazzi et al, 2018), questi sistemi sono caratterizzati da un rilascio controllato e prolungato del farmaco, consentono un *loading* del principio attivo elevato se confrontato con gli altri sistemi di trasporto, permetteno un'incorporazione del farmaco preservando la sua bioattività e riducono gli effetti collaterali.

Un *esempio* è dato dal lavoro di Ramezanli et al (2017). Nel loro studio gli autori hanno incorporato la Vitamina D_3 in particelle (chiamate TyroSpheres) formate da un copolimero a blocchi che presenta due unità idrofile e una idrofoba. Tale sistema, formando uno strato protettivo intorno al principio attivo, è risultato in grado di ridurre la degradazione della Vitamina D_3 . Inoltre, queste nanosfere sono risultate più efficaci nel rilasciare la Vitamina D_3 rispetto ad alcuni agenti comunemente usati per migliorare la penetrazione transcutanea (es. Transcutol®).

Nanoparticelle inorganiche

Le proprietà chimico-fisiche delle nanostrutture inorganiche possono essere utilizzate per accelerare o promuovere il rilascio di farmaci/molecole biologicamente attive. Tra i sistemi di maggiore interesse si trovano i quantum dots (DQs), nanoparticelle di argento, titanio, ossido di zinco e silici.

In particolar modo è interessante evidenziare come la progettazione di nanoparticelle di silice mesoporosa evidenzi numerosi vantaggi rispetto ai carrier sopra citati (Mai et al, 2017):

- presentano un'elevata porosità e dunque un'elevata area superficiale;
- resistono maggiormaente a variazioni di pH e calore;
- presentano ottime proprietà meccaniche;
- garantiscono una modifca della superficie con gruppi funzionali adeguati, incorporando il farmaco, ottimizzando gli effetti terapeutici e riducendo gli effetti collaterali.

2.3.2.3. Capacità di self-assembly della vitamina D₃

Nell'ottica di progettare un sistema per il rilascio di vitamina D₃ basato sul selfassembly è necessario tenere in considerazione i risultati precedentemente ottenuti in un recente lavoro di tesi (Daniele Arduino, 2021). In tale lavoro è stata evidenziata la capacità della vitamina D₃ di partecipare al processo di *self-assembly* come agente cotemplante. Aumentando la concentrazione di vitamina D₃ nella soluzione è possibile osservare un cambiamento della mesostruttura, proprio come nel caso dell'aggiunta di tensioattivo (vedere paragrafo 1.7.). Questa evidenza viene descritta in dettaglio nella **Figura 2.10**, dove si riportano dei pattern di diffrazione di raggi X di campioni ibridi silice-tensioattivo-Vitamina D₃ con contenuto crescente di Vitamina D₃: la variazione dei pattern suggerisce il passaggio da una fase esagonale a un sistema bifasico esagonale e lamellare man mano che la quantità di Vitamina D₃ aumenta.



Figura 2.10 Analisi ai raggi-X a bassi angoli di campioni ibridi silice-tensioattivo-Vitamina D₃. Si passa da una mesostruttura esagonale ad una quasi lamellare, sottolienando l'azione della vitamina D₃ come agente co-templante.

2.3.3. L'idea!

L'obiettivo generale di questa ricerca è quello di studiare un sistema per la somministrazione topica di vitamina D_3 per ovviare ai problemi di scarsa solubilità e alta degradabilità del principio attivo, migliorarne la biodisponibilità e garantire un rilascio continuo e duraturo nel tempo.

L'idea è quella di combinare i vantaggi di un sistema ibrido, che sfrutta l'approccio della formazione in *situ*, e quindi il processo *sol-gel* per la formazione di micelle, e la capacità di self-assembly della vitamina D₃. Ad oggi non esistono in letteratura studi di sistemi ibridi per il rilascio di vitamina D₃, se non quello riportato nel lavoro di Arduino (Daniele Arduino, 2021). In tale studio, come anticipato nel paragrafo precedente, si sottolinea l'influenza della vitamina D₃ sulla mesostruttura dell'ibrido e, inoltre, si accenna ad una possibile influenza sul comportamento di rilascio. Il presente lavoro di tesi ha come scopo proprio quello di indagare quest'ultimo punto. In particolar modo si vuole valutare la relazione tra la mesostruttura del sistema ibrido e le sue proprietà di rilascio della vitamina D₃, essendo questo un aspetto fondamentale nello studio di un drug carrier. A tale scopo verranno sintetizzati materiali ibridi con diverso grado di ordine nella mesostruttura (ottenuti variando la concentrazione di tensioattivo) e verrà valutato il loro comportamento al rilascio di vitamina D₃.

2. Sistemi ibridi per il drug delivery

3.1. Materiali

In questo lavoro di tesi i reagenti utilizzati per le varie sintesi e per l'analisi spettroscopica sono:

- Idrossido di sodio (NaOH), BioXtra, ≥98%, Sigma-Aldrich ®
- Bromuro di esadecilmetilammonio (CTAB, C₁₉H₄₂BrN), BioXtra, \geq 99%, Sigma-Aldrich ®
- Tetraetossisilano (TEOS, SiC₈H₂₀O₄), \geq 99.995%, Sigma-Aldrich ®
- Vitamina D₃ (colecalciferolo, C₂₇H₄₄O), Merck®
- Etanolo (CH₃CH₂OH), Merck®

Per la preparazione della soluzione di sudore artificiale i materiali utilizzati sono:

- Cloruro di sodio (NaCl), \geq 99.9%, Sigma-Aldrich \mathbb{R}
- Cloruro di calcio (CaCl), \geq 99.9%, Merck®
- Solfato di magnesio (MgSO4), Redi-Dri[™], ReagentPlus®, ≥99.5%, Sigma-Aldrich®
- Idrogenofosfato di potassio (K₂HPO₄)
- Idrossido di sodio (NaOH), BioXtra, ≥98%, Sigma-Aldrich ®

3.2. Tecniche di caratterizzazione

3.2.1. Analisi termogravimetrica (ATG)

L'analisi termogravimetrica è un'analisi termica che consiste nella misura della massa di un campione in funzione del tempo e della temperatura (Bottom, 2008).

Il risultato di un'analisi termogravimetrica è visibile in una curva in cui la massa del campione è in funzione del tempo o della temperatura (TGA), oppure nella derivata prima della TGA rispetto al tempo o alla temperatura (DSC).

Cambiamenti di massa si verificano quando il materiale contenuto nel campione viene perso o reagisce con l'atmosfera circostante (Bottom, 2008). Numerose possono essere la cause che portano alla perdita della massa del campione: evaporazione di componenti volatili, decomposizione ossidativa di sostanze organiche in aria, adsorbimento o desorbimento di gas ecc (Bottom, 2008).

Note delle temperature caratteristiche di questi fenomeni, analizzando le perdite di massa, è possibile recepire informazioni rispetto ai componenti presenti. In questo lavoro di tesi l'analisi termica risulta utile per stimare la quantità di componente organica presente nelle mesostrutture analizzate.

Strumentazione e procedura

Viene utilizzato lo strumento DSC/TGA 92-16.18 Setaram.

La misura viene effettuata su circa 10 mg di campione e viene effettuata in aria.

L'analisi consiste in una rampa di temperatura da 30°C a 800°C con una velocità di 10°C/min.

3.2.2. Spettroscopia FTIR

La spettroscopia a *infrarossi* (IR) o la *Fourier trasform infrared* (FTIR) è una tecnica molto utilizzata per la caratterizzazione dei legami chimici presenti nei campioni. La spettroscopia FTIR fornisce informazioni su cambiamenti strutturali (in maniera complementare alla diffrazione a raggi-X), sui legami a idrogeno presenti e sulle reazioni di trasferimento dei protoni (Berthomieu et al, 2009).

La spettroscopia FTIR esplora le vibrazioni molecolari: i gruppi funzionali possono essere associati a caratteristiche bande di assorbimento infrarosso, che corrisponsono alle vibrazioni fondamentali dei gruppi funzionali (Colthup, 2012).

Lo spettro che si ottiene associa ogni numero d'onda (cm⁻¹) al valore di assorbanza. Ogni legame chimico, che assorbe nell'IR, possiede una sua caratteristica vibrazionale; inoltre l'intensità di un certo legame è legata all'assorbanza a quella lunghezza d'onda, perciò è possibile ricavare informazioni di tipo quantitativo sulla quantità di specie presenti nel campione.

Le vibrazioni simmetriche (quando una molecola ha un centro di simmetria) sono inattive all'infrarosso; al contrario vengono esplorate le vibrazioni non simmetriche (Berthomieu et al, 2009). Esistono due tipi di vibrazioni molecolari riconosciute da questa tecnica di caratterizzazione: *stretching* (vibrazioni lungo il legame chimico) e *bending* (deformazione dell'angolo di legame).

La regione dello spettro IR in cui si osservano le bande vibrazionali è riportata in **Figura 3.1**: la sezione blu si riferisce alle vibrazioni dovute allo *stretching*, quella verde alle vibrazioni dovute al *bending*.



Figura 3.1 Rappresentazione bande di assorbimento FTIR

Le bande di assorbimento con una lunghezza d'onda compresa tra i 4000 e il 1450 cm⁻¹, sono legate di solito a vibrazioni di tipo stretching di unità diatomiche. La regione da 1450 a 600 cm⁻¹ invece sperimenta bande che sono tipiche per ogni molecola.

Strumentazione e procedura

Lo strumento utilizzato è il *Bruker Equinox 55 Spectrophotometer*. Lo strumento fornisce uno spettro che descrive l'assorbanza in funzione del numero d'onda.

Il campione viene in un primo step macinato, a seguito dell'aggiunta di qualche granello di KBr; la povere viene successivamente sottoposta a una pressione di circa 3 bar al fine di ottenenere una pastiglia.

Il KBr è trasparente ai raggi IR e permette di diminuire l'assorbanza, evitando di ottenere segnali saturi, senza modificare la posizione dei picchi.

Viene effettuata una misura in aria; successivamente il campione viene degasato (fino a una pressione di 0,1 Pa) per rimuovre le molecole di acqua adsorbite sulla superficie del campione e analizzato nuovamente.

3.2.3. Diffrattometria raggi-X

L'analisi ai raggi-X è generalmente usata per studiare la struttura del bulk del campione. Essa permette di identificare le strutture cristalline nel campione, la frazione cristallina di materiali micro/poli crtistallini, la dimensione media e l'orientazione dei cristalli.

La tecnica viene usata per studiare le fasi cristalline presenti nel campione, In questo modo si possono trarre delle considerazioni riguardo la composizione chimica del campione.

L'analisi si basa sul fatto che i raggi-X (onde con alta energia e lunghezza d'onda tra 0.1-10 nm) vengono diffratti dalla struttura cristallina. La diffrazione, rappresentata in **Figura 3.2**, avviene qunado un'onda elettromagnetica con una lunghezza d'onda paragonabile alla distanza interatomica interagisce con le serie periodiche di molecole in un cristallo (Waseda et al, 2011).



Figura 3.2 Diffrazione dei raggi-X schematizzata.

La posizione del raggio diffratto rispetto al raggio incidente è determinata dalla posizione degli atomi nella cella unitaria del cristallo, che è la più piccola unità strutturale che viene ripetuta per formare l'intero cristallo. La dimensione della cella unitaria è descritta con le lunghezze a, b, c e gli angoli tra gli assi con α , β , γ (Waseda et al, 2011). Quando la cella unitaria nel campione ha una perfetta periodicità tridimensionale, la diffrazione avviene attraverso una serie di raggi rifratti che obbediscono alla *legge di Bragg*:

$$n\lambda = 2d * \operatorname{sen}(\theta)$$

Dove θ è l'angolo di incidenza, λ la lunghezza d'onda per la radiazione dei raggi-X, d è la distanza tra i piani cristallini e n è l'ordine di diffrazione. La *legge di Bragg* permette inoltre di identificare la natura del legame chimico perchè ogni materiale ha un unico e specifico insieme di valori di d.

In genere, in un sistema esagonale cristallino, la distanza tra piani paralleli è data dalla realzione seguente:

$$a_0 = \frac{2d_{100}}{\sqrt{3}}$$

Dove d_{100} è la distanza tra piani paralleli in 100 direzioni, a_0 è la somma dei diametri dei pori interni e lo spessore della parete.

Procedura e strumentazione

Lo strumento utilizzato è il diffrattometro X'PERT3 Panalytical.

Per analizzare la mesostruttura sono necessarie due scansioni in due range angolari diversi: l'analisi a bassi angoli percmette di evidenziare l'ordine strutturale a lungo raggio (mesostruttura) dovuto alle micelle, quella ad alti angoli permette di distinguere una matrice amorfa da una cristallina. Applicando la scansione ad alti angoli sui campioni contenenti vitamina D₃ si può verificare che il principio attivo non sia cristallino; applicando quella a bassi angoli si possono fare delle considerazioni sul parametro di cella e sulla mesostruttura.

3.2.4. Spettroscopia UV/visibile

Questa tecnica di caratterizzazione fornisce informazioni qualitative e quantitative. Ogni materiale mostra picchi tipici di assorbimento a certe lunghezze d'onda: in particolare la spettroscopia UV/visibile analizza lunghezze d'onde appartenenti all'ultravioletto (180-400 nm) e al visibile (400-780 nm).

Questa radiazione elettromagnetica ha un energia sufficiente per eccitare gli elettroni verso orbitali molecolari con energia superiore, dando origine a uno stato eccitato (Perkampus, 2013).

Il fenomeno di assorbimento viene utilizzato per determinare la concentrazione delle specie dentro una soluzione diluita attraverso la *legge di Lambert-Beer*:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

Dove *A* è l'assorbanza che viene misurata, I_0 è l'intensità della luce incidente a una certa lunghezza d'onda, *I* è l'intensità trasmessa, ε il coefficiente di absorbimento (L mol⁻¹ cm⁻¹), *c* la concentrazione della soluzione (mol L⁻¹) e *l* e il cammino ottico (cm).

Procedura e strumentazione

Lo strumento utilizzato è il *Lambda 25 Perkin Elmer*; i portacampioni (couvettes) utilizzati sono fatti di quarzo e hanno un cammino ottico di 1 cm.

Ogni misura viene ripetuta tre volte: nelle prime due analisi viene analizzato lo stesso campione per veniricare che non ci siano anomalie nella misura dovute allo strumento, nella terza viene analizzata un'aliquota diversa del campione per verificare l'omogenità della soluzione. La media di queste tre misure viene rappresentata in un grafico dove la lunghezza d'onda è lungo l'asse x, l'assorbanza lungo l'asse y.

3.2.5. Test di rilascio della vitamina D₃

Questa tecnica permette di verificare il rilascio di un principio attivo. Generalmente viene ricreato l'ambiente fisiologico tipico dell'applicazione desiderata. In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una soluzione che simuli il sudore della pelle umana, chiamata sudore artificiale.

Viene utilizzata una retta di calibrazione con lo scopo di associare il valore dell'assorbanza UV/visibile a varie concentrazioni del principio attivo. La retta di calibrazione utilizzata è stata calcolata in lavori di tesi precedenti (Giulia Palestrini, 2020).

Sudore artificiale

La soluzione di sudore artificiale viene preparata seguendo la letteratura (Shimamura et al, 2004), i reagenti usati e le rispettive quantità si riportano in **Tabella 3.1** Il valore del pH viene reso il più possibile simile al pH del sudore umano (circa 5,4) aggiungendo NaOH alla soluzione (Shimamura et al, 2004).

Tabella 3.1 Reagenti e rispettive quantità utilizzate per la preparazione della soluzione di sudore artificiale su600 g di acqua (Shimamura et al, 2004)

NaCl (g)	CaCl ₂ (g)	MgSO ₄ (g)	KH ₂ PO ₄ (g)	
1,7520	0,0996	0,0720	0,6120	

Procedura e strumentazione

L'apparato utilizzato è costituito da uno spettrofotometro e una vasca in cui si trovano un agitatore meccanico, un sistema di riscaldamento e un termometro.

La vasca contenente il sudore artificiale è mantenuta a una temperatura costante da un bagno termostatico. Lo spettrofotometro UV/visibile è connesso alla vasca del sudore artificiale attraverso un circuito chiuso fatto di un tubicino di plastica. Il sistema necessita di una pompa peristaltica che permette alla soluzione di raggiungere lo spettrofotometro per poi tornare nella vasca.

Ad intervalli regolari viene eseguita l'analisi spettrofotometrica a 290 nm, lunghezza d'onda alla quale lo spettro di assorbanza della vitamina D_3 in sudore artificiale presenta il picco più alto.

Le specifiche dell'analisi sono riportate in Tabella 3.2:

Tabella 3.2 specifiche analisi rilascio in sudore artificiale.				
temperatura	32 °C			
velocità dell'agitatore meccanico	100 rpm			
velocità della pompa peristaltica	30 rpm			
intervallo di acquisizione dati	10 s			
durata	20 h			

Alla fine il risultato è un profilo di rilascio espresso in termini di assorbanza, che, tramite l'utilizzo della retta di taratura, può essere trasformato in un profilo che descrive la quantità di vitamina D₃ rilasciata nel tempo.

3.2.6. Microscopia FESEM

La microscopia FESEM (Field emission scanning electron microscopy) è una tecnica microscopica che viene utilizzata per valutare la morfologia del materiale.

Procedura e strumentazione

Lo strumento utilizzato è il ZEISS MERLIN. I campioni devono essere preventivamente metallizzati con uno strato di platino dello spessore di circa 5 nm. L'analisi viene condotta impostando lo strumento per lavorare ad una tensione di 3 kV.

4. Sintesi sistemi ibridi senza vitamina D₃

In questo lavoro di tesi vengono esplorate due diverse metodologie di sintesi (indicate come 'DILUITO' e 'CONCENTRATO'), che differiscono per la quantità di acqua utilizzata e il tempo di ageing. Partendo dalle due sintesi di tipo 'DILUITO' e 'CONCENTRATO' che permettono di produrre una mesostruttura esagonale, si varia il rapporto tensioattivo/precursore al fine di ottenere un sistema sufficientemente disordinato/con un diverso grado di ordine al fine di valutare come l'ordine della mesostruttura influisca sul rilascio del principio attivo.

Di seguito si riportano i due metodi utilizzati per la sintesi della mesostruttura esagonale. Per chiarezza viene denominata con '**DILUITO**' la sintesi in cui si utilizza più acqua, con '**CONCENTRATO**' quella in cui se ne utilizza una quantità minore.

4.1. Sintesi 'DILUITO' : sistema esagonale

La sintesi esagonale di tipo '*DILUITO*' trae ispirazione dal lavoro di Cai et al. (Cai et al, 1999). In tale studio, Cai e collaboratori presentano un processo di sintesi diretta e sperimentano due diverse sintesi con due diversi catalizzatori, NH₄OH e NaOH rispettivamente. Nella presente tesi viene riprodotta la sintesi con NaOH, essendo la soluzione che garantisce la formazione di una struttura più ordinata.

I rapporti molari utilizzati, riportati in **Tabella 4.1**, sono stati presi in letteratura (Fabio Giudice, 2019; Gallo et al, 2020).

	TEOS	СТАВ	NaOH	H ₂ O
rapporto molare	1	0.122	0.536	589
MM [g mol ⁻¹]	208.33	364.46	39.99	18.02
quantità sperimentali massa/volume	2 mL	401 mg	193 mg	95.790g

 ${\bf Tabella~4.1} \ {\bf Quantità} \ {\bf sperimentali} \ {\bf utilizzate} \ {\bf per ottenere} \ {\bf il} \ {\bf rapporto} \ {\bf molare} \ {\bf desiderato}$

Il primo step di sintesi consiste nella preparazione della soluzione 0,05 M di NaOH; viene poi prelevata la quantità di soluzione necessaria in linea con i rapporti molari.

Successivamente viene aggiunto alla soluzione il CTAB (401 mg), il tensioattivo utilizzato; la soluzione viene agitata con un agitatore magnetico a una velocità di circa 300 rpm per 20 minuti (**Figura 4.1**).



Figura 4.1 Campione sottoposto ad agitazione magnetica a una velocità di 300 rpm

Vengono infine aggiunti 2 mL di TEOS goccia a goccia alla soluzione sottoposta ad agitazione (**Figura 4.2**). La lenta aggiunta di TEOS goccia a goccia avorisce la formazione di particelle a sezione esagonale di dimensioni maggiori (Cai et al, 1999).



Figura 4.2 Aggiunta di TEOS goccia a goccia al campione

Si lascia la soluzione a temperatura abiente e sotto agitazione magnetica per 3 ore a una velocità di 150 rpm (**Figura 4.3**).



Figura 4.3 Campione sottoposto ad agitazione magnetica a una velocità di 150 rpm

Trascorse le 3 ore (**Figura 4.4**), il campione viene filtrato con l'ausilio di una pompa a vuoto con un filtro con maglia da 16 μ m (**Figura 4.5**), poi lavato con 50 mL di acqua.



Figura 4.4 Campione dopo le 3 ore di agitazione magnetica



Figura 4.5 Meccanismo di filtraggio tramite filtro da 16 µm e pompa da vuoto e campione filtrato.

Il campione viene poi messo in stufa a 40 °C per raggiungere le condizioni di massa costante. Si ottengono circa 640 mg di precipitato solido, il quale viene poi trasformato in polvere con l'ausilio di un mortaio (**Figura 4.6**).



Figura 4.6 Campione essiccato in stufa e sucessivamente trasformato in polvere.

4.2. Sintesi 'CONCENTRATO' : sistema esagonale

Il metodo di sintesi proposto viene presentato nello studio di Zhang et al. (1997); le differenze principali rispetto al primo metodo presentato risiedono nella quantità di acqua e nel tempo di ageing. In particolare, la sintesi 'CONCENTRATO' presenta un rapporto H₂O:TEOS inferiore (114.87:1 contro 589:1 per la sintesi 'DILUITO') e un tempo di ageing superiore (48 ore contro 3 ore per la sintesi 'DILUITO').

I reagenti utilizzati e le rispettive quantità vengono riportati in Tabella 4.2.

	TEOS	СТАВ	NaOH	H ₂ O
rapporto molare	1	0.12	0.52	114.87
MM [g mol ⁻¹]	208.33	364.46	39.99	18.02
quantità sperimentali massa/volume	2 mL	395 mg	188 mg	18.662 g

Tabella 4.2 Quantità	sperimenta li utilizzat	e per ottenere il	rapporto molare	e desiderato
	1	1	11	

Il primo step di sintesi consiste nell'aggiunta del CTAB all'acqua; la soluzione viene sottoposta ad agitazione magnetica alla velocità di circa 200 rpm per 15 minuti, tempo sufficiente affinché il CTAB si disciolga completamente (**Figura 4.7**).



Figura 4.7 Campione dopo l'aggiunta di CTAB

Dopo aver aggiunto l'NaOH, si lascia il campione sotto agitazione magnetica per altri 10 minuti, infine si aggiungono i 2 mL di TEOS goccia a goccia.

Si lascia in agitazione il campione per 48 ore ad una velocità di circa 150 rpm (**Figura 4.8**) e a temperatura ambiente, dopo di che lo si filtra risciaquandolo con 50 mL di acqua (**Figura 4.9**). Il precipitato viene messo in stufa a 40 °C fino a raggiungere le condizioni di massa costante; la massa della polvere ottenuta è di 594 mg.



Figura 4.8 Campione dopo le 48 ore di agitazione



Figura 4.9 Meccanismo di filtraggio

4.3. Variazione del rapporto CTAB/TEOS : sintesi dei sistemi disordinati

Variando il rapporto molare tensioattivo/Si si può passare da una fase all'altra della mesostruttura; in letturatura (Vartuli et al, 1994) si trovano rapporti di circa 0.1-0.2 per la fase esagonale, 1-1.2 per la lamellare.

Si procede dunque con la sintesi di nuovi materiali sperimentando rapporti molari di tensioattivo via via maggiori a partire dal rapporto che porta alla formazione di una mesostruttura esagonale. Le quantità degli altri reagenti, invece, vengono mantenute costanti (e pari ai valori riportati nelle **Tabelle 4.1 e 4.2**). Nella **Tabella 4.3** si riportano le tipologie di filtrazione utilizzate per le varie tipologie di sintesi:

Sintesi	Filtrazione	Lavaggio 1 (50mL di acqua)	Lavaggio 2 (50mL di acqua)	Lavaggio 3 su metà aliquota con 50 mL di EtOH al 50% wt.	Massa ottenuta (g)
0,6 DIL	F	F	F	F	0.5051 (lavato)
					0.5284 (non) 0.6324 (layato)
0,6 CONC	F	F	F	F	0.4703 (non)
0,8 DIL	C15	C10	F		1,310
0,8 CONC	C15	C10	C10		1,953
1 DIL	C15	C10	C10		0,796
1 CONC	C15	C10	C10		3,119
1,2 DIL	F	C5	C5		2,323
1,2 CONC	C10	C5	C5		3,815

Tabella 4.3 Tipologia di filitraggio utilizzata nelle varie sintesi. Si denomina la sintesi con il rapporto molare tensioattivo/Si e con DIL/CONC per indicare il metodo usato (DIL=DILUITO, CONC=CONCENTRATO).

 $F = filtrazione per caduta con filtro da 16 \mu m$

Cx = centrifuga per x min a 4000 rpm

Si evidenzia quindi il metodo di filtraggio che si è utilizzato in ogni sintesi: aumentando il rapporto tensioattivo/precursore si riscontrano difficoltà durante il processo di filtraggio per il fatto che il metodo tradizionale con la pompa a vuoto e il successivo risciacquo con acqua non risultano essere di facile riuscita. Si assiste alla formazione di bolle dovute all'elevata quantità di tensioattivo nella soluzione; inoltre l'operazione richiede numerose ore.

Perciò i campioni che riscontrano questo problema si centrifugano (campioni da 0.8 a 1.2); tuttavia i pattern XRD ad alti angoli di quest'ultimi mostrano la presenza di CTA²⁰ in fase cristallina, dovuta all'eccesso di tensioattivo che non è stato né incorporato nell'ibrido né rimosso per via della bassa efficienza di lavaggio. Al fine di rimuovere il CTA in eccesso, si procede dunque ad un ulteriore lavaggio (e filtraggio) sulla polvere ottenuta con una soluzione di acqua/EtOH al 50%vol., prima con 20 mL di soluzione, poi con 50 mL. Nella **Tabella 4.4** si riportano i risultati ottenuti in termini di variazione di massa.

Sintesi	massa pre lavaggio (mg)	massa post lavaggio (mg)	variazione di massa (%)
0,8 DIL	534,7	331,5	-38,00
0,8 CONC	712,6	252,2	-64,61
1 DIL	338,6	164,1	-51,54
1 CONC	742,5	219,5	-70,44
1,2 DIL	737,4	116,4	-84,21
1,2 CONC	560,3	178,7	-68,11

Tabella 4.4 Lavaggio di un'aliquota della polvere ottenuta dalle sintesi con una soluzione di acqua/EtOH al50% vol.

Nella **Figura 4.10** si riportano a titolo di esempio i pattern XRD ad alti angoli della sintesi **1,2 CONC** lavata (in rosso) e quella non lavata (in verde), evidenziando come i picchi cristallini presenti nel campione non lavato spariscano con il lavaggio, ottenendo il materiale amorfo desiderato.



Figura 4.10 Confronto pattern XRD alti angoli tra la sintesi 1,2 CONC lavata e 1,2 CONC non lavata

²⁰ Una volta in soluzione il CTAB dissocia in CTA+ e iono bromuro, quest'ultimo viene lavato via con la soluzione di sintesi.

Si esegue inoltre l'analisi termica ai campioni lavati con la soluzione di $H_2O/EtOH$ al 50% vol: si evidenzia una significativa perdita di peso, a giustificare il fatto che il CTA è ancora presente all'interno della mesostruttura e quindi non è stato completamente rimosso con il lavaggio. I risultati si riportano in **Tabella 4.5**.

Sintesi	Perdita di massa tra 150 e 800 °C (%)
0,8 DIL	58,79
0,8 CONC	53,82
1 DIL	58,03
1 CONC	60,83
1,2 DIL	45,83
1,2 CONC	58,75

Tabella 4.5 Perdita in massa tra 150 e 800 °C misurata tramite ATG dei campioni lavati

Un diverso discorso viene fatto per la sintesi con un rapporto molare CTAB/Si di 0,6: il metodo di filtraggio con pompa da vuoto risulta essere efficace, dunque non si ricorre alla centrifuga. Viene eseguito il lavaggio con la soluzione acqua/EtOH al 50% vol su un'aliquota del campione non ancora asciugato.

La soluzione acqua/EtOH al 50% vol risulta essere efficace per la rimozione del CTA in eccesso; tuttavia si pensa possa essere fin troppo aggressiva per la mesostruttura stessa, soprattutto per eventuali campioni contenenti vitamina D_3 . Si lavano quindi i *campioni selezionati* con una soluzione EtOH/acqua al 10% vol; la stessa suluzione viene usata nelle sintesi contenenti la vitamina D_3 .

4.3.1. Campioni selezionati

Si esaminano nel dettaglio le due strutture esagonali ottenute con i due diversi metodi di sintesi, le quali vengono denominate 'ORDINATO DILUITO' (ord_dil) ed 'ORDINATO CONCENTRATO' (ord_conc). Inoltre, tutti gli altri campioni sintetizzati vengono analizzati tramite diffrattometria a raggi-X a bassi angoli al fine di selezionare i sistemi con l'ordine più interessante. Si scelgono i campioni descritti da un rapporto molare tensioattivo/precursore di 0,8 (denominati 'DISORDINATO DILUITO' (disord_dil) e 'DISORDINATO CONCENTRATO' (disord_conc)):

Il campione disord_conc si presenta come un sistema molto disordinato se confrontato con la mesostruttura esagonale ottenuta con lo stesso metodo di sintesi (campione ord_conc). Dai pattern XRD a bassi angoli riportati in Figura 4.11 si nota come i picchi caratteristici della mesofase esagonale intorno a 3.8° e 4.4° vengano persi nel campione disord_conc. Inoltre, il picco principale (intorno a 2°) nel campione disor_conc si presenta meno intenso e più largo, ad indicare un minore grado di ordine.



Figura 4.11 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni ord_conc e disord_conc

Avendo scelto di studiare i sistemi ord_conc e disor_conc, si decide di analizzare i loro corrispettivi nella sintesi 'DILUITO', cioè i campioni ord_dil e disord_dil.

 Il campione disord_dil non mostra un elevato grado di disordine se confrontata con il rispettivo esagonale ord_dil; tuttavia è interessante valutare come una leggera differenza nel grado di ordine possa modificare le prestazioni del sistema durante il rilascio del principio attivo.

Nella Figura 4.12 si riportano i pattern XRD a bassi angoli per le due sintesi.



Figura 4.12 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni ord_dil e disord_dil

Dunque, scelti i quattro sistemi **ord_dil**, **disord_dil**, **ord_conc** e **disord_conc**, essi vengono caratterizzati, eseguendo analisi termica, analisi XRD e spettroscopia FTIR. Successivamente si ripetono le stesse sintesi con l'aggiunta della vitamina D₃, per poi valutarne il rilascio. I due metodi di sintesi vengono analizzati separatamente nei capitoli seguenti.

5. Sintesi sistemi ibridi con vitamina D₃

Le sintesi dei quattro campioni scelti vengono ripetute con l'aggiunta del principio attivo, sfruttando la capacità di *self-assembly* della vitamina D₃ osservata in studi precedenti (Daniele Arduino, 2021). Viene aggiunta la stessa quantità di vitamina D₃ in ogni sintesi, mantenendo dunque costante il rapporto molare Vitamina D₃/TEOS e pari a 0,02.

Di seguito si riportano le sintesi delle due mesostrutture esagonali con l'aggiunta di vitamina D_3 per entrambe le metodologie. I campioni vengono denominati aggiungengo il prefisso '**_VD**'.

5.1. Stabilità della vitamina D₃ in ambiente basico

Prima di procedere, è necessaria una conferma della stabilità della vitamina nelle condizioni di pH a cui si svolgono le sintesi. Dalla letteratura si evince che la molecola di colecaldiferolo è stabile nelle condizioni operative della sintesi 'DILUITO', dove si ha un pH di circa 10 (Daniele Arduino, 2021). Viene dunque indagata la stabilità della vitamina D₃ nelle condizioni in cui opera la sintesi 'CONCENTRATO', condizioni più basiche rispetto alla sintesi 'DILUITO' restando invariata la quantità di NaOH e diminuendo invece la quantità di acqua.

Si prepara una soluzione con i seguenti rapporti molari (gli stessi utilizzati nella sintesi con cui si ottiene il campione ord_conc): 0.12 CTAB: 1.23 NaOH: $114.84 \text{ H}_2\text{O}$. Si ottiene un primo campione da analizzare aggiungendo a questa soluzione della vitamina D₃ secondo un rapporto molare vit D₃/TEOS pari a 0,02. Tale soluzione, tuttavia, supera il limite di misura dello spettrofotometro, donando un segnale saturato. Si procede, dunque, con una diluizione della soluzione portando il rapporto molare vit D₃/TEOS a 4*10⁻³.

In **Figura 5.1** viene riportato lo spettro UV/visibile della soluzione diluita dopo un'ora dall'aggiunta del principio attivo: il segnale appare non ben definito e ancora saturo, tuttavia è possibile confermare la presenza della vitamina D_3 nella soluzione per via dell'aumento d'assorbanza nell'intorno di valori di lunghezza d'onda di 200-300 nm (la vitamina D_3 assorbe intorno a 290 nm in soluzioni acquose (Giulia Palestrini, 2020)). La vitamina D_3 è dunque stabile in queste condizioni di pH.



Figura 5.1 Spettro UV/visibile della soluzione 0.12 CTAB : 1.23 NaOH : 114.84 H₂O : 4*10⁻³ Vit D₃

5.2. Sintesi 'DILUITO'

- Sistema ordinato

I reagenti e le rispettive quantità utilizzati nella sintesi vengono riportati in Tabella 5.1.

	TEOS	СТАВ	NaOH	H ₂ O	Vit D ₃
rapporto molare	1	0.122	0.536	589	0.02
MM [g mol ⁻¹]	208.33	364.46	39.99	18.02	384.64
quantità sperimentali massa/volume	2 mL	401 mg	193 mg	95.790g	69.4 mg

Tabella 5.1 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi

Il primo step di sintesi consiste nella preparazione della soluzione 0,05 M; viene prelevata la quantità necessaria in linea con i rapporti molari.

Successivamente viene aggiunto alla soluzione il CTAB; la soluzione viene agitata con un agitatore magnetico a una velocità di circa 300 rpm per 20 minuti.

Viene aggiunta la vitamina D_3 ; trascorsi circa 5 minuti si aggiunge goccia a goccia il TEOS (**Figura 5.2**). Si lascia la soluzione a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 3 ore a una velocità di 150 rpm.



Figura 5.2 Campione dopo l'aggiunta di TEOS

Trascorse le 3 ore, il campione viene filtrato con l'ausilio di una pompa a vuoto con un filtro con maglia da 16 μ m, poi lavato con 50 mL di acqua e messo in stufa a 40 °C per raggiungere le condizioni di massa costante. Si ottengono 726,1 mg di precipitato. Il campione così ottenuto viene indicato nel resto della tesi con il nome '**ord_dil_VD**'.

Sistema disordinato

I rapporti molari e le rispettive quantità dei reagenti usati nella sintesi sono riportatati in **Tabella 5.2**.

	TEOS	СТАВ	NaOH	H ₂ O	Vit D ₃
rapporto molare	1	0.8	0.536	589	0.02
MM [g mol ⁻¹]	208.33	364.46	39.99	18.02	384.64
quantità sperimentali massa/volume	2 mL	401 mg	193 mg	95.790g	69.4 mg

Tabella 5.2 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi

Il processo di sintesi differisce da quello del campione 'ord_dil_VD' soltanto per il metodo di filtraggio/lavaggio: si centrifuga il campione per 15 minuti a 4000 rpm, si esegue un primo lavaggio con 50 mL di acqua e si centrifuga di nuovo per 10 min a 4000 rpm; si lava poi con 30 mL di acqua filtrando, per poi lavarlo con soluzione di EtOH/acqua al 10% vol. Si ottengono 1,1497 g di precipitato. Il campione viene indicato con il nome 'disord_dil_VD'.

5.3. Sintesi 'CONCENTRATO'

- Sistema ordinato

I reagenti e le rispettive quantità utilizzati nella sintesi vengono riportati in Tabella 5.3.

	TEOS	СТАВ	NaOH	H ₂ O	Vit D ₃
rapporto molare	1	0.12	0.536	114.87	0.02
MM [g mol ⁻¹]	208.33	364.46	39.99	18.02	384.64
quantità sperimentali massa/volume	2 mL	395 mg	193 mg	18.662g	69.4mg

Tabella 5.3 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi

Si prepara la soluzione di CTAB e H_2O , lasciandola in agitazione a circa 300 rpm per circa 40 min. Successivamente viene aggiunta la quantità di NaOH necessaria e si agita il sistema per altri 10 min.

Viene aggiunta la vitamina D_3 ; trascorsi circa 5 minuti si aggiunge goccia a goccia il TEOS. Si lascia la soluzione a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 48 ore a una velocità di 150 rpm.

Trascorse le 48 ore (**Figura 5.3**), il campione viene filtrato con l'ausilio di una pompa a vuoto con un filtro con maglia da 16 μ m, poi lavato con 50 mL di acqua e messo in stufa a 40 °C per raggiungere le condizioni di massa costante. Si ottengono 641,9 mg di precipitato. Tale campione viene denominato '**ord_conc_VD**'.



Figura 5.3 Campione trascorse le 48 ore

- Sistema disordinato

I reagenti e le rispettive quantità utilizzati nella la sintesi vengono riportati in **Tabella 5.4**.

	1	8		_	_
	TEOS	СТАВ	NaOH	H ₂ O	Vit D ₃
rapporto molare	1	0.12	0.536	114.87	0.02
MM [g mol ⁻¹]	208.33	364.46	39.99	18.02	384.64
quantità sperimentali massa/volume	2 mL	395 mg	193 mg	18.662g	69.4mg

Tabella 5.4 Quantità sperimentali dei reagenti utilizzati nella sintesi disord_conc_VD

La sintesi del campione presenta alcune caratteristiche, raffigurate nella Figura 5.4 e Figura 5.5:



Figura 5.4 Colorazione gialla del campione durante l'aggiunta di TEOS



Figura 5.5 Campione trascorse le 48 ore

Inoltre, il campione si centrifuga per 15 minuti a 4000 rpm, si lava con 50 mL di acqua e si centrifuga per 10 min a 4000 rpm. Il campione viene poi lavato poi con 30 mL di acqua filtrando; essendo l'operazione di filtraggio troppo lenta si decide di centrifugare per 10 min a 4000 rpm con 30 mL di EtOH/acqua al 10% wt. Si ottengono 947 mg di polvere, che vengono lavati ulteriormente per filtrazione con 50 mL di EtOH/H₂O al 10% vol poiché il lavaggio con la centrifuga non risulta efficace. Si ottengono così 294,2 mg di polvere lavata. Tale campione viene denominato 'disord_conc_VD'.

6. Caratterizzazione delle sintesi 'DILUITO'

Si riportano le caratterizzazioni dei due campioni di tipo 'DILUITO' con e senza vitamina D₃ e i relativi commenti e confronti.

6.1. Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica è utile per determinare la percentuale in massa della porzione organica all'interno nel campione.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti dall'analisi termica per i campioni ord_dil e disord_dil (**Figura 6.1** e **Figura 6.2**). In entrambi i campioni con la vitamina D_3 la perdita in massa viene accentuata rispetto ai campioni senza principio attivo in prossimità dei 350°C (temperatura alla quale la perdita in massa della vitamina D_3 pura è maggiore, come si deduce dalla pendenza della sua curva ATG), maggiormente nel caso del sistema ordinato.



Figura 6.1 Analisi termogravimetrica dei campioni ord_dil e ord_dil_VD



Figura 6.2 Analisi termogravimetrica dei campioni disord_dil e disord_dil_VD

In **Tabella 6.1** si riportano le perdite in massa dai 150 °C in su. Si trascura la perdita di massa al di sotto dei 150 °C, in quanto questa è dovuta all'evaporazione dell'acqua fisicamente adsorbita sulla superficie del campione.

Sintesi	Massa campione (mg)	Perdita di massa tra 150 e 800°C (%)	
ord_dil	7,2	57,25	
ord_dil_VD	3,8	72,50	
disord_dil	8,1	60,46	
disord_dil_VD	8,4	66,67	

Tabella 6.1 Risultati analisi termogravimetrica dei campioni ord_dil, disord_dil, ord_dil_VD e disord_dil_VD evidenziando le perdite in massa dai 150°C.

I risultati mostrano la presenza di una porzione organica, tuttavia non è possibile distinguere le quantità di CTA e di vitamina D_3 presenti nel campione in quanto essi degradano ad una temperatura simile.

6.2. Spettroscopia FTIR

Nella Figura 6.3 e nella Figura 6.4 si riportano le analisi FTIR dei quattro campioni.



Figura 6.3 Spettro FTIR dei campioni ord_dil e ord_dil_VD



Figura 6.4 Spettro FTIR dei campioni disord dil e disord dil VD

Analizzando le curve dei campioni ord_dil e disord_dil si evidenziano i picchi a:

- circa 1500 cm⁻¹ imputabili al CTA (Fabio Giudice, 2019);
- 2800-2900 cm⁻¹ attribuibili alla presenza di gruppi –CH₂- e –CH₃ e riconducibili alla componente organica del sistema (CTA);

Quanto detto sopra conferma che il CTA è presente nei sistemi ibridi senza vitamina D_3 , in particolare viene a formarsi un'interfaccia CTA^+ - SiO⁻.

Dallo spettro del colecaciferolo presente in letteratura e riporato in **Figura 6.5** (Giulia Palestrini, 2020), è importante mettere in evidenza la presenza del picco caratteristico a circa 1650 cm⁻¹, associato allo stretching del legame C=C. Analizzando i campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD:

- viene convalidata la presenza del picco caratteristico a circa 1650 cm⁻¹ (con maggiore evidenza nel sistema disord_dil_VD), confermando quindi la presenza di vitamina D₃ nei campioni;
- continuano a essere presenti i picchi a 1500 cm⁻¹ e a 2800-2900 cm⁻¹ come nei campioni senza vitamina D₃; in questo caso tali picchi sono riconducibili ad entrambe le componenti organiche (CTA e vitamina D₃)



Figura 6.5 Spettro FT-IR colecalciferolo (Giulia Palestrini, 2020)

6.3. Estrazione in etanolo

L'analisi termogravimetrica (vedere paragrafo 6.1.) fornisce un'informazione sulla quantità di porzione organica presente nel campione, ma non può distinguere il contributo del CTAB da quello della vitamina D₃, dato che entrambi degradano in intervalli di temperatura sovrapponibili. Per questo motivo viene eseguita l'estrazione in etanolo con successiva analisi allo spettrofotometro UV/visibile. Questa tecnica sfrutta l'elevata solubilità del principio attivo (vitamina D₃) nel solvente (EtOH), responsabile dell'estrazione della vitamina D₃ dalla mesostruttura. Il campione viene messo nel solvente e si ottengono successivamente gli spettri UV/visibile delle soluzioni dopo 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e dopo averle sottoposte ad un bagno ad ultrasuoni al fine di estrarre tutta la vitamina D₃. A titolo d'esempio vengono riportati gli spettri dei campioni dopo 3 ore di immersione e trattamento con ultrasuoni (Figura 6.6 e Figura 6.7). Come riportato in letteratura (Daniele Arduinio,2021), lo spettro di assorbanza della vitamina D₃ in etanolo presenta un picco a 265 nm. L'assorbanza degli spettri di assorbimento dei campioni viene convertita in valori di percentuali in massa tramite l'utilizzo di una retta di taratura (calcolata a 265 nm). Tale retta di taratura (Figura 6.8), le procedure per il calcolo della massa di campione estratta e per la valutazione dell'efficienza di incorporazione sono state trovate in letteratura in un precedente studio condotto alle medesime condizioni operative (Daniele Arduino, 2021). Infine, nella Figura 6.9 e nella Figura 6.10 si riporta la percentuale di vitamina D₃ estratta rispetto alla massa del campione.

6. Caratterizzazione delle sintesi 'DILUITO'



Figura 6.6 Spettro UV/visibile del campione ord_dil_VD in etanolo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni



Figura 6.7 Spettro UV/visibile del campione disord_dil_VD in etanolo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni



Figura 6.8 Retta di taratura a 265 nm della Vitamina D3 in EtOH (Daniele Arduino, 2021).



Figura 6.9 Percentuale in massa di vitamina D3 estratta dal campione ord_dil_VD in etanolo



 $Figura~6.10~Percentua \ le~in~massa~di~vitamina~D_3~estratta~da \ l campione~disord_dil_VD~in~etanolo$

L'efficienza di incorporazione della vitamina D_3 è stata calcolata dividendo la massa di vitamina introdotta nel bagno di sintesi per la vitamina effettivamente presente nel campione (secondo quanto ottenuto con il test di estrazione). Per tali calcoli si considera che tutta la massa estratta dai campione sia vitamina D_3 , (come confermato dall'aspetto degli spettri di assorbanza riportati in **Figura 6.6** e **Figura 6.7**). Contenuto in massa di vitamina D_3 e efficienza di incorporazione sono riportati in **Tabella 6.2**. La mesostruttura esagonale garantisce un'efficienza di incorporazione di circa il 90%, il sistema disordinato soltanto del 68% circa.

Tabella 6.2 Massa di campione in soluzione, massa di vitamina D3 estratta in etanolo rispetto alla massa d	lel
campione in soluzione in termini percentuali, ed efficienza di incorporazione della vitamina D3.	

Sintesi	Massa campione in soluzione (mg)	Massa campione estratta (%)	Efficienza di incorporazione (%)
ord_dil_VD	6,2	8,6	90,38
disord_dil_VD	7,4	4,1	68,35

6.4. Diffrazione di raggi-X

6.4.1. Analisi a bassi angoli

L'analisi a bassi angoli²¹ ($2\theta < 10^{\circ}$) permette di studiare la presenza di una mesostruttura nel campione, analizzando l'ordine a lungo raggio.

Nella **Figura 6.11** e nella **Figura 6.12** si riportano i pattern XRD a bassi angoli dei quattro campioni analizzati.



Figura 6.11 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni ord_dil e ord_dil_VD

Guardando lo spettro del campione contenente vitamina D_3 (in rosso) si nota come il picco a $2\theta=2,1^{\circ}$ sia traslato verso angoli più alti rispetto al picco dello spettro del campione senza vitamina D_3 (in blu). Questo indica che la cella esagonale unitaria è più piccola nel campione con il colecalciferolo, dunque aggiungendo la vitamina D_3 si ha una contrazione delle micelle.

Questo spostamento del picco fornisce informazioni riguardo la posizione della molecola di vitamina D_3 nella micella, che sembrerebbe essere posta tra le teste polari e non tra le code lipofile. Guardando alla formula presentata nel paragrafo 1.7:

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

È possibile intuire che, se il parametro di cella dimininuisce, l (lunghezza delle catene di tensioattivo) sarà minore; dunque, mantenendo pressoché costante il volume V (l'aggiunta di alcune molecole di farmaco è trascurabile), è necessario che a_0 (l'area effettiva) aumenti per mantenere costante e pari a $\frac{1}{2}$ (valore tipico di una disposizione esagonale) il *packing factor* 'g'. Ciò suggerisce un posizionoamento della vitamina D₃ tra le teste polari.

Risulta anche evidente il fatto che la vitamina D_3 si interpone tra le teste, modifica il parametro di cella e dunque agisce come agente co-templante.


Figura 6.12 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni disord_dil e disord_dil_VD

Analizzando invece gli spettri del sistema disordinato è evidente una situazione opposta: il picco a $2\theta=2,1^{\circ}$ del campione disord_dil_VD si sposta verso angoli più bassi rispetto al picco del campione disord_dil. Da questo si può dedurre come il colecalciferolo si collochi tra le code lipofile della micella, causando un aumento del parametro di cella e quindi una dilatazione delle micelle stesse (il parametro a_0 sarà minore, essendo l maggiore).

6.4.2. Analisi XRD ad alti angoli

Le analisi XRD eseguite ad alti angoli $(2\theta > 10^\circ)$ permettono di evidenziare se il materiale è cristallino o amorfo. In particolare, ciò permette di verificare se le molecole di farmaco sono state incorporate nel materiale ibrido oppure se sono segregate in una fase cristallina.

Si riportano nella Figura 6.13 e nella Figura 6.14 le analisi ad alti angoli dei quattro campioni.

6. Caratterizzazione delle sintesi 'DILUITO'



Figura 6.13 Pattern XRD alti angoli per i campioni ord_dil e ord_dil_VD



Figura 6.14 Pattern XRD alti angoli per i campioni disord_dil e disord_dil_VD

Confrontando gli spettri dei sistemi ibridi con vitamina D₃ (in rosso) con gli spettri dei sistemi senza vitamina D₃ (in blu), essi appaiono molto simili, presentando soltanto un segnale largo e poco definito tra 2θ =15° e 2θ =35° tipico dei pattern di diffrazione osservati per le silici amorfe (Fabio Giudice, 2019).

Il colecalciferolo puro ha una struttura cristallina (**Figura 6.15**); il fatto che i due sistemi ibridi con la vitamina D_3 siano amorfi evidenzia che la vitamina D_3 non ha formato una fase cristallina segregata e suggerisce che le molecole di colecalciferolo si siano disperse all'interno del sistema ibrido amorfo.



Figura 6.15 Pattern XRD ad alti angoli del colecalciferolo (Fei et al, 2011).

6.5. Microscopia FESEM

ord_dil e ord_dil_VD

Nella **Figura 6.16** e nella **Figura 6.17** vengono riportati rispettivamente il campione ord_dil (immagini tratte da un precedente lavoro presente in letteratura (Fabio Giudice, 2019)) ed il campione ord_dil_VD.



Figura 6.16 Micrografie FESEM della mesostruttura esagonale (ord_dil) (Fabio Giudice, 2019)



Figura 6.17 Micrografie FESEM del campione ord_dil_VD

Come osservato anche in un predente lavoro (Daniele Arduino, 2021), la morfologia del sistema cambia passando dal campione senza a quello con la vitamina D₃, tuttavia viene mantenuta una forma particellare che può essere in parte ricondotta alla simmetria esagonale, sebbene piuttosto arrotondata.

disord_dil e disord_dil_VD

Nella **Figura 6.18** e nella **Figura 6.19** vengono riportati rispettivamente il campione disord_dil ed il campione disord_dil_VD.



Figura 6.18 Micrografie FESEM del campione disord_dil



Figura 6.19 Micrografie FESEM del campione disord_dil_VD

Una prima considerazione può essere fatta relativamente al fatto che aumentando la quantità di tensioattivo la morfologia cambia (**Figura 6.16** e **Figura 6.18**) diventando eterogenea e irregolare.

In tutti e due i campioni (ord_dil_VD disord_dil_VD) l'inserimento della vitamina D₃ nelle sintesi induce un cambiamento morfologico, in accordo con l'evidenza che il principio attivo viene disperso all'interno del materiale ibrido possa prendere parte al processo di *self-assembly*.

6.6. Rilascio di vitamina D₃ in sudore artificiale

Per valutare l'efficienza del sistema ibrido come drug carrier, fondamentale è lo studio della cinetica di rilascio della vitamina D_3 dalle particelle di silice in sudore artificiale, al fine di fare delle previsioni riguardo il comportamento del materiale sintetizzato nell'ambiente dell'applicazione topica.

Anche in questo caso la retta di taratura (**Figura 6.20**) è stata ricava da un precedente lavoro trovato in letteratura (Giulia Palestrini, 2020).



Figura 6.20 Retta di taratura per il rilascio di vitamina D₃ in sudore artificiale (Giulia Palestrini, 2020).

La soluzione di sudore artificiale è stata preparata in linea con quanto trovato in letteratura (Shimamura et al, 2004), come riportato nel paragrafo 3.2.5., mentre le quantità di campione da mettere in 450 g di soluzione (sudore artificiale) sono state valutate in modo da ricadere nel range di concentrazione della retta di taratura (Giulia Palestrini, 2020).

La soluzione ottenuta viene analizzata con lo spettrofotometro UV/visibile per 20 ore; l'evoluzione nel tempo dello spettro di assorbimento UV viene studiata soltanto ad una specifica lunghezza d'onda (290 nm). Lo spettrofotometro viene impostato in modo da misurare l'intensità di assorbanza in continuo a una fissata lunghezza d'onda per studiare la cinetica di rilascio. In **Figura 6.21** si riportano i due spettri UV dei campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD al termine del test di rilascio, evidenziando la presenza dei picchi a circa 290 nm.



Figura 6.21 Spettro UV/visibile dei campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD al termine del test di rilascio

Lo spostamento del picco da 290 nm a circa 275 nm è stato osservato in un precedente lavoro presente in letteratura svolto in condizioni simili (Daniele Arduino, 2021); ciò può derivare dall'interazione tra la vitamina D₃ e le micelle di tensioattivo attraverso le quali viene rilasciata. In letturatura sono riportati esempi di altre molecole (come la curcumina) che presentano spettri differenti a seconda che si trovino in soluzione da sole o in interazione con micelle (Fabio Giudice, 2019; Sharma et al, 2013). Poichè il picco nella soluzione di rilascio non è esattamente alla lunghezza d'onda a cui è stata calcolata la retta di taratura, i calcoli effettuati per quantificare la quantità di vitamina D₃ rilasciata sono affetti da errore (si sottostima il valore reale), per cui i valori calcolati sono solo indicativi e da considerarsi per confrontare fra loro i vari sistemi più che in termini assoluti.

Oltre alla vitamina D₃ in sudore artificiale viene rilasciato anche il CTA; testimonianza di ciò è rappresentata dai picchi nello spettro UV/visibile (**Figura 6.21**) dei campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD in soluzione a circa λ =205 nm. Tale picco è dovuto all'assorbimento del CTA rilasciato nel sudore artificiale, come mostrato in lavori precedenti (Elena Zuena, 2021). Questa evidenza è fondamentale: il rilascio in ambiente acquoso della vitamina D3 è reso possibile dal fatto che questa venga rilasciata dall'ibrido all'interno di micelle di CTA.

In **Tabella 6.3** si riportano i risultati ottenuti dal test di rilascio.

6. Caratterizzazione delle sintesi 'DILUITO'

Sintesi	Massa campione messa in soluzione per il test di rilascio (mg)	Massa di Vit D ₃ rilasciata in sudore artificiale rispetto alla massa di campione in soluzione (%)	Massa di Vit D ₃ estratta in etanolo rispetto alla massa di campione in soluzione (%)
ord_dil_VD	36,6	3,6	8,6
disord_dil_VD	63,3	3,7	4,1

Le percentuali in massa di vitamina D₃ rilasciata (rispetto alla massa di campione immerso in soluzione) dei due sistemi sono confrontabili. Bisogna ricordare, tuttavia, che il contenuto in massa di vitamina D₃ del campione ord_dil_VD è circa il doppio (8.64%wt) di quello del campione disord_dil_VD (4.13%wt), come detto nel paragrafo 6.3. Questo significa che gran parte della vitamina D₃ (circa 90%) presente nel sistema disordinato viene rilasciata; invece soltanto il 41% (circa) della vitamina D₃ presente nel sistema ordinato viene rilasciata. Tale risultato conferma l'ipotesi di partenza e quanto osservato nel precedente lavoro di tesi (Daniele Arduino, 2019): differenze nella mesostruttura (come quelle tra i campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD) possono modificare in maniera rilevante il rilascio di vitamina D₃.

I due profili di rilascio che mostrano la massa di vitamina D_3 rilasciata in percentuale (rispetto alla massa del campione in soluzione) vengono mostrati in **Figura 6.22**.



Figura 6.22 Profili di rilascio dei campioni ord_dil_VD e disord_dil_VD

Nel sistema ordinato il rilascio del principio attivo inizia dopo un tempo di ritardo di circa 2 ore, poi aumenta e, infine, raggiunge un plateau. La presenza di un tempo di latenza iniziale e l'assenza di polvere residua alla fine del test, possono indurre a pensare che il meccanismo di rilascio di vitamina D₃ da parte del sistema ordinato avvenga soltanto dopo che la matrice della silice amorfa si sia degradata: la matrice inorganica deve dissolversi affinchè le micelle vengano rilasciate. In un recente studio (Gallo et al, 2020) sistemi ibridi ottentuti con uguali condizioni di sintesi, ma contenenti curcumina al posto della vitamina D₃, mostrano un comportamento al rilascio analogo (tempo di latenza, dissoluzione del sistema). Questa analogia permette di ipotizzare che il rilascio dopo un tempo di latenza dovuto alla degradazione della silice amorfa sia una caratteristica del sistema ordinato così ottenuto come drug currier ibrido. Nella Figura 6.23 viene rappresentato il meccanismo di rilascio della micella a seguito della degradazione della matrice inorganica che avviene nel caso del sistema ordinato (Gallo et al, 2020). Ciò è interessante in considerazione delle potenziali applicazioni di questo materiale nel campo dell'applicazione topica: il silicio, infatti, può influire positivamente sulla normale formazione cutanea, in quanto questo elemento (sotto forma di acido ortosilicico) presenta funzioni trofiche e antinfiammatorie (Seaborn e Nielsen, 2002).



Figura 6.23 Rappresentazione schematica del meccanismo di rilacio del sistema ordinato; in giallo il principio attivo, in verde il tensioattivo e in blu la matrice inorganica. (Gallo et al, 2020)

Il sistema disordinato, invece, è caratterizzato da un rilascio di vitamina D₃ in sudore artificiale quasi istantaneo. In questo caso la dissoluzione dell'intero sistema potrebbe non essere necessaria affichè la micella abbandoni la matrice inorganica. Quest'ultima ipotesi trova spiegazione nella forza delle interazioni micelle-silice. Nel sistema ordinato le interazioni micelle-silice sono forti, mentre nel caso disordinato esse sono deboli; da qui la facilità di rilascio della micella, e quindi del principio attivo, del sistema disordinato senza una dissoluzione del sistema necessaria.

Nella **Figura 6.24** viene rappresentato invece il meccanismo di rilascio delle micelle e quindi del principio attivo nel caso del sistema disordinato.

6. Caratterizzazione delle sintesi 'DILUITO'



Figura 6.24 Rappresentazione schematica del meccanismo di rilacio del sistema disordinato; in giallo il principio attivo, in verde il tensioattivo e in blu la matrice inorganica.

Anche la localizzazione del principio attivo all'interno della micella influenza la cinetica di rilascio: nel sistema disordinato la vitamina D_3 sembrerebbe andare tra le code del tensioattivo (paragrafo 6.4.), dunque non si ha la necessità della dissoluzione della matrice inorganica ai fini del rilascio. Nel caso del sistema ordinato invece la vitamina D_3 sembrerebbe posizionarsi tra le teste idrofile del tensioattivo (interagendo anche con la silice), dunque potrebbe essere necessaria la degradazione della silce amorfa per garantire il rilascio.

È significativo considerare come interazioni più deboli si traducono in un *self-assembly* meno efficace e quindi un ordine minore, interazioni più forti si traducono invece in un ordine maggiore.

Interessante è la valutazione della tipologia delle interazioni che la vitamina D_3 forma all'interfaccia con la silice nel caso in cui si localizzi tra le teste polari del tensioattivo, quindi nel caso ordinato. Dal punto di vista chimico la vitamina D_3 può essere considerata un acido debole di Brønsted con pK_a pari a 18.38, la sua concentrazione nell'ambiente di sintesi è particolarmente bassa, il pH nell'ambiente di sintesi è circa pari a 10; da queste considerazioni è possibile affermare che la molecola non si dissocia in queste condizioni. Per questo motivo si può ipotizzare che la vitamina D_3 interagisca tramite legame a idrogeno con i gruppi SiO⁻ della silice grazie al gruppo ossidrile presente della molecola (**Figura 6.25**).



Figura 6.25 Struttura chimica del colecalciferolo

6. Caratterizzazione delle sintesi 'DILUITO'

7. Caratterizzazione delle sintesi 'CONCENTRATO'

La stesse analisi di caratterizzazione eseuite per i campioni 'DILUITO' vengono ripetute per quelli 'CONCENTRATO'; si riportano i risultati sottolineando le differenze con i casi precedenti, evitando di ripetere le caratteristiche in comune e lo scopo di ogni analisi.

7.1. Analisi termogravimetrica

Nella **Figura 7.1** e nella **Figura 7.2** si riportano i risultati dell'analisi termica, mostrando come nell'intorno dei 350°C i campioni perdano la maggior parte della massa a dimostrazione della presenza di una porzione organica, senza poter distinguere, tuttavia, le quantità di vitamina D₃ e CTA.



Figura 7.1 Analisi termogravimetrica dei campioni ord_conc e ord_conc_VD



Figura 7.2 Analisi termogravimetrica dei campioni disord_conc e disord_conc_VD

In **Tabella 7.1** si riportano le perdite in massa dai 150°C e le masse dei campioni analizzate. Le differenze tra le perdite in massa dei campioni con e senza vitamina D_3 non è significativa: la vitamina D_3 potrebbe aver sostituito il CTAB durante il processo di *self-assembly*.

Sintesi	Massa campione (mg)	Perdità di massa dai 150 °C (%)
ord_conc	6,7	48,15
ord_conc_VD	6,8	49,74
disord_conc	8	56,51
disord_conc_VD	7,8	56,46

Tabella /.1 Kisultati dell'alla lisi termito

7.2. Spettroscopia FTIR

L'interpretazione degli spettri FTIR per i campioni 'CONCENTRATO' risulta essere la medesima dei campioni 'DILUITO' (vedere paragrafo 6.2.). I risultati ottenuti analizzando i quattro sistemi sono riportati nella **Figura 7.3** e nella **Figura 7.4**.



Figura 7.3 Spettri FTIR dei campioni ord_conc e ord_conc_VD



Figura 7.4 Spettri FTIR dei campioni disord_conc e disord_conc_VD

Vengono evidenziati in tutti e quattro gli spettri i picchi intorno a 1500 cm⁻¹ dovuti al CTA e i picchi a 2800-2900 cm⁻¹ attribuibili ai gruppi $-CH_2$ - e $-CH_3$ e relativi alla presenza di una componente organica (CTA ed, eventualmente, vitamina D₃) nel sistema.

Inoltre nei campioni contententi la vitamina D_3 si sottolinea la presenza del picco intorno a 1650 cm⁻¹ che conferma la presenza del colecalciferolo nella struttura.

7.3. Estrazione in etanolo

Restano valide le condizioni operative descritte nel paragrafo 6.3, come rimane invariata la procedura per il calcolo della massa di vitamina estratta a partire dagli spettri UV visibili (**Figura 7.5** e **Figura 7.6**) e la retta di taratura utilizzata. Anche in questo caso si evince dagli spettri che soltanto la vitamina D_3 è stata rilasciata dalla struttura; il picco a maggiore intensità si trova alla lunghezza d'onda di 265 nm in entrambi i campioni.



Figura 7.5 Spettro UV/visibile campione ord_conc_VD in etanalo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni



Figura 7.6 Spettro UV/visibile campione disord conc VD in etanalo dopo 3 ore e bagno ultrasuoni

Nella **Figura 7.7** e nella **Figura 7.8** si riportano gli andamenti delle percentuali in massa di vitamina estratta (rispetto alla massa dei campioni immersi in soluzione) e nella **Tabella 7.2** vengono riassunti i risultati ottenuti.



Figura 7.7 Percentuale massa di vitamina D3 estratta in etanolo dal campione disord_conc_VD



Figura 7.8 Percentuale in massa di vitamina D3 estratta in etanolo dal campione ord_conc_VD

Sintesi	Massa campione in soluzione (mg)	Massa campione estratta (%)	Efficienza di inorporazione (%)
ord_conc_VD	6,2	10,4	96,19
disord_conc_VD	5,7	4,3	18,20

Tabella 7.2 Massa di campione in soluzione (valutato in modo da restare nel range di concentrazione della retta di taratura, come riportato in letteratura (Daniele Arduino, 2021), massa di campione estratta in etanolo rispetto alla massa del campione in soluzione in termini percentuali, ed efficienza di incorporazione della vitamina D₃.

Si osserva una situazione analoga alla precedente (paragrafo 6.3): il sistema esagonale presenta una massa di vitamina D₃ estratta in termini percentuali pari circa al doppio di quella che si ottiene con il sistema disordinato. L'efficienza di incorporazione del principio attivo del sistema ord_conc_VD risulta pari al 96%, mentre si ha soltanto un 18% nel caso del sistema disord_conc_VD. Alcune ipotesi per spiegare questa evidenza verranno trattate nei paragrafi successivi.

7.4. Diffrazione di raggi-X

7.4.1. Analisi a bassi angoli

Si riportano nella Figura 7.9 e nella Figura 7.10 i pattern XRD a bassi angoli dei campioni.



Figura 7.9 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni ord_conc e ord_conc_VD

In questo caso si osserva un fenomeno particolare: con l'aggiunta della vitamina D_3 nel sistema si assiste ad una coesistenza di due fasi, una esagonale e una lamellare.

7. Caratterizzazione delle sintesi 'CONCENTRATO'

Il picco a $2\theta=2^{\circ}$ del campione ord_conc_VD risulta essere spostato verso bassi angoli rispetto al rispettivo picco della fase esagonale nel campione senza vitamina D₃, e lo stesso si osserva per il riflesso a circa $2\theta=4^{\circ}$. Dunque il colecalciferolo si colloca tra le code lipofile della micella, causando un aumento del parametro di cella e quindi una dilatazione delle micelle stesse (il parametro *l* sarà maggiore). Inoltre viene a formarsi una nuova fase che presenta picchi caratteristici a circa $2\theta=2,6^{\circ}$ e $2\theta=5,1^{\circ}$. Si propone che tale fase é probabilmente lamellare, in base al confronto con il pattern tipico di una fase lamellare riportata in letteratura (**Figura 7.10**).



Figura 7.10 Pattern XRD a bassi angoli di una fase lamellare MCM-51 (Luan et al, 1998)



Figura 7.11 Pattern XRD a bassi angoli per i campioni disord_conc e disord_conc_VD

Analizzando gli spettri dei sistemi disordinati il picco a $2\theta=2^{\circ}$ del campione disord_conc_VD si sposta verso bassi angoli rispetto al picco osservato per il campione disord_conc. Le considerazioni sono le medesime del campione disord_dil_VD (paragrafo 6.4): il colecalciferolo si colloca tra le code lipofile della micella, causando un aumento del parametro di cella e quindi una dilatazione delle micelle stesse.

Inoltre è possibile notare come il pattern del campione contenente il colecalciferolo sia ancora meno definito di quello del campione senza la vitamina D_3 : ciò suggerisce che l'incorporazione della vitamina D_3 riduce l'ordine a lungo raggio del sistema.

7.4.2. Analisi ad alti angoli

Le analisi XRD ad alti angoli confermano quanto detto in precedenza nel paragrafo 6.4.2.; nella **Figura 7.12** e nella **Figura 7.13** si riportano i risultati per i quattri campioni .



Figura 7.12 Pattern XRD ad alti angoli per i campioni ord_conc e ord_conc_VD



Figura 7.13 Pattern XRD ad alti angoli per i campioni disord_conc e disord_conc_VD

Entrambi i sistemi rimangono amorfi dopo l'aggiunta di vitamina D₃.

7.5. Microscopia FESEM

ord_conceord_conc_VD

Nella **Figura 7.14** e nella **Figura 7.15** vengono riportati rispettivamente il campione ord_conc_VD.



Figura 7.14 Micrografie FESEM del campione ord_conc



Figura 7.15 Micrografie FESEM del campione ord_conc_VD

E' interessante sottolineare che, rispetto al il campione ord_dil (paragrafo 6.5.), la morfologia del sistema ord_conc risulta non definita e la popolazione di particelle discrete submicrometriche è molto bassa.

Queste considerazioni trovano probabilmente spiegazione nelle diverse condizioni di sintesi utilizzate, quali la minore quantità di acqua e il maggiore tempo di ageing. L'aumento della dimensione delle particelle e degli aggregati può essere dovuto all'aumento del tempo di ageing.

Per quanto riguarda l'influenza della vitamina D₃, si osserva che l'aggiunta del principio attivo provoca la formazione di frammenti leggermente più piccoli e irregolari rispetto al campione di riferimento (ord_conc).

disord_conc e disord_conc_VD

Nella **Figura 7.16** e nella **Figura 7.17** vengono riportati rispettivamente il campione disord_conc_VD.



Figura 7.16 Micrografie FESEM del campione disord_conc

7. Caratterizzazione delle sintesi 'CONCENTRATO'



Figura 7.17 Micrografie FESEM del campione disord_conc_VD

Anche in questo caso restano valide le considerazioni fatte in precedenza: la tipologia della morfologia dipende dalla quantità di acqua utilizzata durante la sintesi e dal tempo di ageing, nei casi 'CONCENTRATI' si ottiene una morfologia poco definita e non particellare. Nei campioni disord_conc e disord_conc_VD, in particolare, non si distingue la presenza di particelle, piuttosto di aggregati molto più grandi (decine di µm) rispetto ai campioni precedenti.

Anche per questi campioni (ord_conc_VD e disord_conc_VD) l'inserimento della vitamina D₃ nelle sintesi induce un cambiamento morfologico rispetto ai riferimenti.

7.6. Rilascio in sudore artificiale

Le condizioni operative dell'analisi, la procedura e la retta di taratura utilizzate restano invariate rispetto alle analisi eseguite sui campioni 'DILUITO'. In **Figura 7.18** si riportano gli spettri UV dei campioni ord_conc_VD e disord_cond_VD al termine del test di rilascio, evidenziando la presenza dei picchi a circa 290 nm e a circa 205 nm, dovuti rispettivamente alla vitamina D₃ e al CTA (vedere paragrafo 6.6.).



Figura 7.18 Spettro UV/visibile dei campioni ord_conc_VD e disord_conc_VD al termine del test di rilascio

In Tabella 7.3 si riassumono i risultati ottenuti dal test di rilascio.

Sintesi	Massa campione messa in soluzione per il test di rilascio (mg)	Massa di Vit D ₃ rilasciata in sudore artificiale rispetto alla massa di campione in soluzione (%)	Massa di Vit D ₃ estratta in etanolo rispetto alla massa di campione in soluzione (%)
ord_conc_VD	26,2	1,5	10,4
disord_conc_VD	54,8	1,5	4,3

Tabella 7.3 Massa rilasciata in sudore artificiale (%) dai campioni ord_conc_VD e disord_conc_VD

Le percentuali in massa di vitamina D₃ rilasciata (rispetto al campione in soluzione) dei due sistemi sono confrontabili; tuttavia, ricordando quanto detto nel paragrafo 7.3., il contenuto in massa (in termini percentuali) di vitamina D₃ nel campione ord_conc_VD è più del doppio di quello nel campione disord_conc_VD. Ne deriva che circa il 35% della vitamina D₃ presente nel sistema disordinato viene rilasciata; invece soltanto il 14% circa della vitamina D₃ presente nel sistema esagonale viene rilasciata.

Il fatto che il sistema ord_conc_VD presenti un rilascio limitato può essere giustificato dalla coesistenza delle due fasi nella sua struttura: la fase esagonale rilascia il suo contenuto di vitamina, mentre quella lamellare trattiene il clecalciferolo, come già presentato in un altro lavoro trovato in letteratura (Daniele Arduino, 2021).





Figura 7.19 Profili di rilascio dei campioni ord_conc_VD e disord_conc_VD

Anche in questo caso nel sistema ordinato il rilascio avviene soltanto dopo un tempo di latenza: c'è la presenza della fase lamelalre che trattiene il principio attivo, inoltre la fase esagonale del sistema potrebbe comportarsi come il sistema ord_dil_VD (paragrafo 6.6). Il sistema disordinato invece mostra un andamento simile al campione disord_dil_VD, seppur il profilo è meno accentuato; potrebbero restare valide le considerazioni fatte in precedenza (paragrafo 6.6).

7. Caratterizzazione delle sintesi 'CONCENTRATO'

8. Conclusioni

8.1. Discussione dei risultati

In questo lavoro di tesi sono stati studiati sistemi per il rilascio di vitamina D_3 in vista di una somministrazione topica, a seguito delle sue proprietà antipsoriasiche. Sono stati sintetizzati quattro sistemi ibridi tensioattivo-silice: sono state indagate due metodologie di sintesi e, per ciascuna, sono state sintetizzate una mesostruttura ordinata di tipo esagonale e un sistema disordinato con un rapporto molare tensioattivo/silice pari a 0,8. Si sono ripetute le stesse sintesi con l'aggiunta del principio attivo, ottenendo così dei sistemi ibridi tensioattivo-silice-vitamina D_3 .

Gli otto campioni sono stati caratterizzati attraverso analisi chimico-fisiche al fine di valutare l'effetto dovuto all'incorporazione del principio attivo.

I dati ottenuti tramite la diffrazione di raggi X confermano la natura amorfa nei campioni contenenti la vitamina D_3 ; inoltre dalle analisi ottentute a bassi angoli è possibile fare delle ipotesi sulla localizzazione del principio attivo (tabella 21), oltre a individuare le fasi delle mesostrutture ottenute.

L'analisi FTIR ha confermato la presenza della vitamina nei sistemi attraverso la presenza negli spettri del picco caratteristico del colecalciferolo a circa 1650 cm⁻¹.

Dall'analisi termogravimetrica si è misurata la massa della porzione organica all'interno dei sistemi ibridi, senza riuscire a distinguere il contributo dovuto alla presenza del tensioattivo e quello dovuto alla vitamina D_3 . Una misura più accurata della quantità di vitamina D_3 incorporata nei sistemi è stata eseguita attraverso l'analisi, mediante spettroscopia UV-visibile, delle soluzioni ottenute dopo estrazione in etanolo (**Tabella 8.1**).

Nell'ultima parte del lavoro si sono eseguiti i test di rilascio in sudore artificiale al fine di valutare le proprietà dei sistemi in vista della loro applicazione nel drug delivery (**Tabella 8.1**).

8. Conclusioni

	ord_dil_VD	disord_dil_VD	ord_conc_VD	disord_conc_VD
Cambiamento della struttura	Diminuzione del parametro di cella	Aumento della dimensione delle micelle	Si conferma la presenza della fase esagonale e si assiste alla formazione di un'ulteriore fase, lamellare.	Aumento della dimensione delle micelle
Localizzazione vitamina D ₃	Tra le teste polari	Tra le code idrofobiche	Tra le code idrofobiche delle micelle della fase esagonale	Tra le code idrofobiche
Contenuto in massa di vitamina D ₃ (%)	8,6	4,1	10,4	4,8
Efficienza di incorporazione vitamina D ₃ (%)	≈90	≈68	≈96	≈18
Quantità di vitamina D ₃ rilasciata in sudore artificiale rispetto alla massa di campione in soluzione (%)	3,6	3,7	1,5	1,5
Efficienza di rilascio in sudore artificiale (%)	≈41	≈90	≈14	≈35

I abella 0.1 Kassulito del lisultati Ottelluti	Tabella	8.1	Rassunto dei risultati ottenuti
---	---------	-----	---------------------------------

8. Conclusioni

In linea generale si possono dunque fare le seguenti considerazioni:

- I sistemi 'DILUITI' risultano essere più facilemente controllabili rispetto a quelli 'CONCENTRATI', dunque si considerano più interessanti dal punto di vista del drug delivery.
- Nei sistemi ordinati il meccanismo di *self-assembly* della vitamina D₃ risulta più evidente rispetto ai sistemi disordinati, dove la molecola sembrerebbe non agire da agente co-templante (cosa che accade in quelli ordinati).
- Si conferma quanto visto nel un precedente lavoro di tesi (Daniele Arduino, 2021): la vitamina D₃, che partecipa al meccanismo di *self-assembly*, può influenzare il tipo mesostruttura ottenuta portando alla formazione di una fase lamellare.
 La fase lamellare sembrerebbe trattenere il principio attivo impedendone il rilascio: nel caso ord_conc_VD la fase che rilascia è probabilmente soltanto quella esagonale (viene incorporato circa il 96% della vitamina D₃ e ne viene rilasciato soltanto il 14%).
- Nel caso in cui il principio attivo venga incorporato tra le teste polari del tansioattivo nel sistema esagonale, il rilascio dello stesso risulta ritardato nel tempo.
- Nel caso in cui il principio attivo venga incorporato tra le code idrofobiche del tensioattivo il rilascio risulta immediato.
- I profili di rilascio ottenuti mostrano delle differenze, ne derivano possibili soluzioni a diversi trattamenti (Figura 8.1).
 Per esempio, se il fine della terapia fosse una somministrazione quasi istantanea il sistema disord_dil_VD, con un rilascio quasi totale già dalla 4° ora potrebbe essere il carrier più adatto; in caso contrario se il fine della terapia fosse invece una somministrazione lenta il sistema ord_dil_VD potrebbe essere più idoneo.



Figura 8.1 Percentuale in massa di vitamina D₃ rilasciata in sudore artificiale per i campioni ord_dil_VD, disord_dil_VD, ord_conc_VD e disord_conc_VD

8.2. Sviluppi futuri

Al fine di continuare lo sviluppo di efficaci sistemi di somministrazione di vitamina D_3 per la cura della psoriasi si potrebbero perseguire diverse migliorie.

In primo luogo, visto che in questi sistemi il tensioattivo è coinvolto nello step di rilascio, si potrebbe pensare all'utilizzo di un tensioattivo che non presenti i problemi di citotossicità del CTAB, così da ottenere un prodotto totalmente biocompatibile.

Si potrebbe, inoltre, studiare nel dettaglio il comportamento della vitamina D₃ come agente autoassemblante: un'idea potrebbe essere quella di mantenere costante il rapporto vitamina D₃/CTAB nelle varie sintesi (esagonali e disordinate, + e -) al posto che il rapporto vitamina D₃/TEOS come fatto nel presente lavoro.. Tale studio potrebbe permettere di indagare e, quindi, sfruttare il più possibile la capacità di *self-assembly* del colecalciferolo per migliorarne l'efficienza di rilascio.

Interessante sarebbe uno studio più approfondito per valutare in quale situazione avviene effettivamente la degradazione della matrice inorganica, al fine di validare le ipotesi fatte.

Abdo, J., Rai, V., & K Agrawal, D. (2017). Interplay of immunity and vitamin D: interactions and implications with current IBD therapy. Current medicinal chemistry, 24(9), 852-867.

ALOthman, Z. A. (2012). A review: fundamental aspects of silicate mesoporous materials. *Materials*, 5(12), 2874-2902.

Alsaqr, A., Rasoully, M., & Musteata, F. M. (2015). Investigating transdermal delivery of vitamin D₃. AAPS PharmSciTech, 16(4), 963-972.

Asefa, T., MacLachlan, M. J., Coombs, N., & Ozin, G. A. (1999). Periodic mesoporous organosilicas with organic groups inside the channel walls. Nature, 402(6764), 867-871.

Ashby, M. F., & Bréchet, Y. J. (2003). Designing hybrid materials. Acta materialia, 51(19), 5801-5821.

Bagheri, E., Ansari, L., Abnous, K., Taghdisi, S. M., Charbgoo, F., Ramezani, M., & Alibolandi, M. (2018). Silica based hybrid materials for drug delivery and bioimaging. Journal of controlled release, 277, 57-76.

Barrea, L., Savanelli, M. C., Di Somma, C., Napolitano, M., Megna, M., Colao, A., & Savastano, S. (2017). Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 18(2), 195-205.

Barrea, L., Savanelli, M. C., Di Somma, C., Napolitano, M., Megna, M., Colao, A., & Savastano, S. (2017). Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 18(2), 195-205.

Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., ... & Schlenker, J. (1992). A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. Journal of the American Chemical Society, 114(27), 10834-10843.

Benhadou, F., Mintoff, D., & Del Marmol, V. (2019). Psoriasis: keratinocytes or immune cells–which is the trigger?. Dermatology, 235(2), 91-100.

Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Photosynthesis research, 101(2), 157-170.

Bordoloi, A., Mathew, N. T., Lefebvre, F., & Halligudi, S. B. (2008). Inorganic–organic hybrid materials based on functionalized silica and carbon: A comprehensive understanding toward the structural property and catalytic activity difference over mesoporous silica and carbon supports, Microporous and mesoporous materials, 115(3), 345-355.

Bottom, R. (2008). Thermogravimetric analysis. Principles and applications of thermal analysis, 1, 87-118.

Bradley, D. C. (1989). Metal alkoxides as precursors for electronic and ceramic materials. Chemical Reviews, 89(6), 1317-1322.

Brinker, C. J. (1988). Hydrolysis and condensation of silicates: effects on structure. Journal of non-crystalline solids, 100(1-3), 31-50.

Brinker, C. J., Scherer, G. W., (1990) Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing, Academic Press: New York.

Broekhoff, J. C. P. (1979). Mesopore determination from nitrogen sorption isotherms: Fundamentals, scope, limitations. In Studies in surface science and catalysis (Vol. 3, pp. 663-684). Elsevier.

Burkett, S. L., Sims, S. D., & Mann, S. (1996). Synthesis of hybrid inorganic–organic mesoporous silica by co-condensation of siloxane and organosiloxane precursors. Chemical Communications, (11), 1367-1368.

Cai, Q., Lin, W.-Y., Xiao, F.-S., Pang, W.-Q., Chen, X.-H., & Zou, B.-S. (1999). The preparation of highly ordered MCM-41 with extremely low surfactant concentration. In *Microporous and Mesoporous Materials* (Vol. 32).

Castillo, R. R., de la Torre, L., García-Ochoa, F., Ladero, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Production of MCM-41 nanoparticles with control of particle size and structural properties: optimizing operational conditions during scale-up. International journal of molecular sciences, 21(21), 7899.

Chandrashekar, N. S., & Rani, R. S. (2008). Physicochemical and pharmacokinetic parameters in drug selection and loading for transdermal drug delivery. Indian journal of pharmaceutical sciences, 70(1), 94.

Ciesla, U., & Schüth, F. (1999). Ordered mesoporous materials. Microporous and mesoporous materials, 27(2-3), 131-149.

Colthup, N. (2012). Introduction to infrared and Raman spectroscopy. Elsevier.

Damiani, G., Bragazzi, N. L., Aksut, C. K., Wu, D., Alicandro, G., McGonagle, D., ... & Naghavi, M. (2021). The global, regional, and national burden of psoriasis: results and insights from the global burden of disease 2019 study. Frontiers in medicine, 8.

Daniele Arduino, Hybrid particles for Vitamin D₃ release in view of psoriasis treatment, Politecnico di Torino, Corso di laurea magistrale in Nanotechnologies for ICTs, 2021

DeLuca, H. F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. The American journal of clinical nutrition, 80(6), 1689S-1696S.

Doadrio, J. C., Sousa, E. M., Izquierdo-Barba, I., Doadrio, A. L., Perez-Pariente, J., & Vallet-Regí, M. (2006). Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern. Journal of Materials Chemistry, 16(5), 462-466.

Drummond, C. J., & Fong, C. (1999). Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. Current opinion in colloid & interface science, 4(6), 449-456.

Elena Zuena, Particelle ibride a base di silice per il rilascio di curcumina: valorizzazione del processo di sintesi = Hybrid silica-based particles for curcumin release: valorization of the synthesis route, Politecnico di Torino, Corso di laurea magistrale in Ingegneria Chimica e Dei Processi Sostenibili, 2021.

Fabio Giudice, Silici mesostrutturate per il rilascio di curcumina = Mesostructured silica for the release of curcumin., Politecnico di Torino, Corso di laurea magistrale in Ingegneria Biomedica, 2019

Fei, X. I. A., Heyang, J., Yaping, Z., & Xinqiu, G. (2011). Supercritical antisolvent-based technology for preparation of vitamin D3 proliposome and its characteristics. Chinese journal of chemical engineering, 19(6), 1039-1046.

Gallo, M., Giudice, F., Banchero, M., Ronchetti, S., Manna, L., & Onida, B. (2020). A mesostructured hybrid CTA-silica carrier for curcumin delivery. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 96(1), 236-246.

Gao, Z., & Eisenberg, A. (1993). A model of micellization for block copolymers in solutions. Macromolecules, 26(26), 7353-7360.

Giulia Palestrini, Silici nanoporose come carrier di vitamina D₃, Politecnico di Torino, Corso di laurea magistrale in Ingegneria Biomedica, 2020. (Giulia Palestrini, 2020)

Goltzman, D. (2018). Functions of vitamin D in bone. Histochemistry and cell biology, 149(4), 305-312.

Grandi, S., Magistris, A., Mustarelli, P., Quartarone, E., Tomasi, C., & Meda, L. (2006). Synthesis and characterization of SiO2–PEG hybrid materials, Journal of non-crystalline solids, 352(3), 273-280.

Grzybowski, B. A., Wilmer, C. E., Kim, J., Browne, K. P., & Bishop, K. J. (2009). Self-assembly: from crystals to cells. Soft Matter, 5(6), 1110-1128.

Guidotti M., Tecnologia farmaceutica: liposomi e nanoemulsioni.

Haham, M., Ish-Shalom, S., Nodelman, M., Duek, I., Segal, E., Kustanovich, M., & Livney, Y. D. (2012). Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. Food & function, 3(7), 737-744.

Han, Y. H., Taylor, A., Mantle, M. D., & Knowles, K. M. (2007). Sol-gel-derived organicinorganic hybrid materials. *Journal of Non-Crystalline Solids*, *353*(3), 313-320.

Huo, Q., Margolese, D. I., Ciesla, U., Demuth, D. G., Feng, P., Gier, T. E., ... & Chmelka, B. F. (1994). Organization of organic molecules with inorganic molecular species into nanocomposite biphase arrays. Chemistry of Materials, 6(8), 1176-1191.

Jones, M. C., & Leroux, J. C. (1999). Polymeric micelles-a new generation of colloidal drug carriers. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 48(2), 101-111.

Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Melik-Nubarov, N. S., Fedoseev, N. A., Dorodnich, T. Y., Alakhov, V. Y., ... & Kabanov, V. A. (1992). A new class of drug carriers: micelles of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. Journal of controlled release, 22(2), 141-157.

Kangarlou, S., Haririan, I., & Gholipour, Y. (2008). Physico-mechanical analysis of free ethyl cellulose films comprised with novel plasticizers of vitamin resources. International journal of pharmaceutics, 356(1-2), 153-166.

Kickelbick, G. (2004). Hybrid inorganic–organic mesoporous materials. Angewandte Chemie International Edition, 43(24), 3102-3104.

Kickelbick, G. (2014). Hybrid materials-past, present and future. Hybrid Mater, 1(1), 39-51.

Kickelbick, G. (Ed.). (2007). Hybrid materials: synthesis, characterization, and applications. John Wiley & Sons.

Kwon, G., Naito, M., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., & Kataoka, K. (1997). Block copolymer micelles for drug delivery: loading and release of doxorubicin. Journal of Controlled Release, 48(2-3), 195-201.

Lai F., Nanoparticelle Polimeriche

Lavasanifar, A., Samuel, J., & Kwon, G. S. (2002). Poly (ethylene oxide)-block-poly (L-amino acid) micelles for drug delivery. Advanced drug delivery reviews, 54(2), 169-190.

Lehmann, B. (2005). The vitamin D3 pathway in human skin and its role for regulation of biological processes. Photochemistry and photobiology, 81(6), 1246-1251.

Li, H., Wang, Q., Xiao, Y., Bao, C., & Li, W. (2013). 25-Hydroxyvitamin D3-loaded PLA microspheres: in vitro characterization and application in diabetic periodontitis models. Aaps Pharmscitech, 14(2), 880-889.

Luan, Z., He, H., Zhou, W., & Klinowski, J. (1998). Transformation of lamellar silicate into the mesoporous molecular sieve MCM-41. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 94(7), 979-983.

Mahmoodani, F., Perera, C. O., Abernethy, G., Fedrizzi, B., & Chen, H. (2018). Lipid oxidation and vitamin D₃ degradation in simulated whole milk powder as influenced by processing and storage. Food Chemistry, 261, 149-156.

Mai, Z., Chen, J., Hu, Y., Liu, F., Fu, B., Zhang, H., ... & Zhou, W. (2017). Novel functional mesoporous silica nanoparticles loaded with Vitamin E acetate as smart platforms for pH responsive delivery with high bioactivity. Journal of colloid and interface science, 508, 184-195.

Mendes, A. C., Baran, E. T., Reis, R. L., & Azevedo, H. S. (2013). Self-assembly in nature: using the principles of nature to create complex nanobiomaterials. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 5(6), 582-612.

Meynen, V., Cool, P., & Vansant, E. F. (2009). Verified syntheses of mesoporous materials. Microporous and mesoporous materials, 125(3), 170-223.

Musat, V. (2008). Sol-gel ZnO-based thin films as key multifunctional materials for advanced technological applications. METALURGIA INTERNATIONAL, 13, 29-35.

Myers, D. (2020). Surfactant science and technology. John Wiley & Sons.

Napolitano, M., Caso, F., Scarpa, R., Megna, M., Patrì, A., Balato, N., & Costa, L. (2016). Psoriatic arthritis and psoriasis: differential diagnosis. Clinical rheumatology, 35(8), 1893-1901.

Narayan, R., Nayak, U. Y., Raichur, A. M., & Garg, S. (2018). Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances. Pharmaceutics, 10(3), 118.

Okamura, W. H., Midland, M. M., Hammond, M. W., Rahman, N. A., Dormanen, M. C., Nemere, I., & Norman, A. W. (1995). Chemistry and conformation of vitamin D molecules. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 53(1-6), 603-613.

Okuhara, T., Mizuno, N., & Misono, M. (1996). Catalytic chemistry of heteropoly compounds, In Advances in catalysis (Vol. 41, pp. 113-252). Academic Press.

Ouahab, L. (1997). Organic/inorganic supramolecular assemblies and synergy between physical properties. Chemistry of materials, 9(9), 1909-1926.

P. Innocenzi, (2019) The Sol-to-Gel Transition, Springer International Publishing.

Pagliaro, M., Ciriminna, R., & Palmisano, G. (2007). The chemical effects of molecular solgel entrapment. Chemical Society Reviews, 36(6), 932-940.

Pandey, S., & Mishra, S. B. (2011). Sol-gel derived organic-inorganic hybrid materials: synthesis, characterizations and applications. Journal of sol-gel science and technology, 59(1), 73-94.

Pedersen, J. N., Frislev, H. S., Pedersen, J. S., & Otzen, D. E. (2016). Using protein-fatty acid complexes to improve vitamin D stability. Journal of dairy science, 99(10), 7755-7767.

Perkampus, H. H. (2013). UV-VIS Spectroscopy and its Applications. Springer Science & Business Media.

Pradhan, M., Singh, D., & Singh, M. R. (2013). Novel colloidal carriers for psoriasis: current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. Journal of controlled release, 170(3), 380-395.

Pukale, S. S., Sharma, S., Dalela, M., kumar Singh, A., Mohanty, S., Mittal, A., & Chitkara, D. (2020). Multi-component clobetasol-loaded monolithic lipid-polymer hybrid nanoparticles ameliorate imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in Swiss albino mice. *Acta Biomaterialia*, *115*, 393-409.

Ramezanli, T., Kilfoyle, B. E., Zhang, Z., & Michniak-Kohn, B. B. (2017). Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. International journal of pharmaceutics, 516(1-2), 196-203.

Rangel-Yagui, C. O., Pessoa Jr, A., & Tavares, L. C. (2005). Micellar solubilization of drugs. J. Pharm. Pharm. Sci, 8(2), 147-163.

Raska Jr, I., & Toropov, A. (2006). Comparison of QSPR models of octanol/water partition coefficient for vitamins and non vitamins. European journal of medicinal chemistry, 41(11), 1271-1278.

Rejinold, N. S., Kim, H. K., Isakovic, A. F., Gater, D. L., & Kim, Y. C. (2019). Therapeutic vitamin delivery: Chemical and physical methods with future directions. Journal of controlled release, 298, 83-98.

Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis pathogenesis and treatment. International journal of molecular sciences, 20(6), 1475.

Schottner, G. (2001). Hybrid sol-gel-derived polymers: applications of multifunctional materials. Chemistry of materials, 13(10), 3422-3435.

Seaborn CD, Nielsen FH (2002) Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. Biol Trace Elem Res 89:251–261

Sharma, R., & Jani, D. (2013). Interaction of cationic CTAB surfactant with curcumin, an anticarcinogenic drug: spectroscopic investigation. Tenside Surfactants Detergents, 50(4), 283-288.

Shimamura, T., Tairabune, T., Kogo, T., Ueda, H., Numajiri, S., Kobayashi, D., & Morimoto, Y. (2004). Investigation of the release test method for the topical application of pharmaceutical preparations: release test of cataplasm including nonsteroidal anti-inflammatory drugs using artificial sweat. Chemical and pharmaceutical bulletin, 52(2), 167-171.

Simonazzi, A., Cid, A. G., Villegas, M., Romero, A. I., Palma, S. D., & Bermúdez, J. M. (2018). Nanotechnology applications in drug controlled release. In *Drug targeting and stimuli sensitive drug delivery systems* (pp. 81-116). William Andrew Publishing.

Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P., & Hupperts, R. (2008). Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. Journal of neuroimmunology, 194(1-2), 7-17.

Temova Rakuša, Ž., Pišlar, M., Kristl, A., & Roškar, R. (2021). Comprehensive stability study of vitamin D3 in aqueous solutions and liquid commercial products. Pharmaceutics, 13(5), 617.

Temova, Ž., & Roškar, R. (2017). Shelf life after opening of prescription medicines and supplements with vitamin D3 for paediatric use. European Journal of Hospital Pharmacy, 24(2), 115-119.

Torchilin, V. P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. Journal of controlled release, 73(2-3), 137-172.

Ulbrich, K., Koňák, Č., Tuzar, Z., & Kopeček, J. (1987). Solution properties of drug carriers based on poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] containing biodegradable bonds. Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics, 188(6), 1261-1272.

Vartuli, J. C., Schmitt, K. D., Kresge, C. T., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Mccullen, S. B., Hellring, S. D., Beck, J. S., Schlenker, J. L., Olson, D. H., & Sheppard, E. W. (1994). Effect of Surfactant/Silica Molar Ratios on the Formation of Mesoporous Molecular Sieves: Inorganic Mimicry of Surfactant Liquid-Crystal Phases and Mechanistic Implications. In *Chem. Mater* (Vol. 6).

Wärnheim, T., & Jönsson, A. (1988). Phase diagrams of alkyltrimethylammonium surfactants in some polar solvents. Journal of colloid and interface science, 125(2), 627-633.
Bibliografia

Waseda, Y., Matsubara, E., & Shinoda, K. (2011). X-ray diffraction crystallography: introduction, examples and solved problems. Springer Science & Business Media.

Wei-hong, T., Min-chang, G., Zhen, X., & Jie, S. (2014). Pharmacological and pharmacokinetic studies with vitamin D-loaded nanoemulsions in asthma model. Inflammation, 37(3), 723-728.

Wen, J., & Wilkes, G. L. (1996). Organic/inorganic hybrid network materials by the sol- gel approach. Chemistry of Materials, 8(8), 1667-1681.

Yadav, S., Sharma, A. K., & Kumar, P. (2020). Nanoscale self-assembly for therapeutic delivery. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 12.

Yi, Z., Dumée, L. F., Garvey, C. J., Feng, C., She, F., Rookes, J. E., ... & Kong, L. (2015). A new insight into growth mechanism and kinetics of mesoporous silica nanoparticles by in situ small angle X-ray scattering. Langmuir, 31(30), 8478-8487.

Yokoyama, M., Satoh, A., Sakurai, Y., Okano, T., Matsumura, Y., Kakizoe, T., & Kataoka, K. (1998). Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size. Journal of controlled release, 55(2-3), 219-229.

Zhang, J., Luz, Z., & Goldfarb, D. (1997). EPR Studies of the Formation Mechanism of the Mesoporous Materials MCM-41 and MCM-50.

Zhang, Y., Vassilopoulos, A. P., & Keller, T. (2008). Stiffness degradation and fatigue life prediction of adhesively-bonded joints for fiber-reinforced polymer composites. International journal of fatigue, 30(10-11), 1813-1820.

Bibliografia

Ringraziamenti

Alla professoressa Barbara Onida, per la sua cordialità e professionalità, per aver condiviso con me il suo sapere e il suo animo gentile. Ho fatto tesoro di tutto.

Alla dottoressa Marta Gallo, per essere stata fonte di ispirazione nell'ambito universitario e non solo, per aver portato alla luce tante mie capacità che non conoscevo; a lei per essere entrata nella mia vita e aver lasciato un segno indelebile.

A me stessa, a tutte le sconfitte che mi hanno lanciato fin qua, a tutte le Vittorie che mi hanno risollevato il morale ogni volta che pensavo di non valere abbastanza. Alla forza di volontà, alla costanza e alla tenacia che ho saputo dimostrare. Alle giornate belle, ma soprattutto a quelle brutte per avermi spinta a superare ogni limite anche quando non vedevo più alcun presupposto per continuare. A me stessa per non essermi mai arresa.