

POLITECNICO DI TORINO

Dipartimento di tecnologia e scienze applicate
Corso di laurea magistrale in Ingegneria dei materiali

TESI DI LAUREA

Sintesi di materiali ibridi silice-ciclodestrina



RELATRICE

Prof.ssa Barbara Onida

CORRELATORI

Dr. Marta Gallo

Prof. Mauro Banchemo

STUDENTE

Antonino Alessi (262415)

Novembre 2022

INDICE.....	2
ACRONIMI.....	5
INTRODUZIONE.....	6
CAPITOLO 1. NANOMATERIALI E CICLODESTRINE.....	7
1.1 Nanotecnologie.....	7
1.1.1 L'origine.....	7
1.1.2 Requisiti di una nanotecnologia.....	7
1.1.3 Due differenti approcci di sintesi nelle nanoscienze: Top Down e Bottom up.....	7
1.1.4 Nanomedicina.....	9
1.2 Le ciclodestrine	10
1.2.1 Un po' di storia sulle CDs.....	10
1.2.2 Cosa sono le ciclodestrine?.....	11
1.2.3 Processo produttivo delle CDs.....	11
1.2.4 Caratteristiche peculiari delle CDs.....	12
1.2.5 Applicazioni delle CDs in ambito ingegneristico.....	13
1.2.6 Ciclodestrine e complessi con farmaci.....	17
1.2.6.1 Lo studio della complessazione tramite il diagramma di solubilità.....	19
1.2.6.2 I fattori che influenzano la formazione del complesso: carica elettrica e temperatura.....	21
1.2.6.3 La beta- e betametil- ciclodestrina (β -metil-CD).....	21
1.3 Drug Delivery System (DDS).....	22
1.3.1 Rilascio di farmaci: nuove e vecchie formulazioni.....	22
CAPITOLO 2. SILICI NANOSTRUTTURATE.....	26
2.1 Introduzione.....	25
2.2 Schema generale di sintesi.....	27
2.3 Idrolisi e condensazione dei precursori di silice: reazioni e cinetica.....	28
2.3.1 Idrolisi e condensazione.....	28
2.4 Influenza dell'ambiente di reazione.....	29
2.4.1 Idrolisi e condensazione in ambiente acido.....	29
2.4.2 Idrolisi e condensazione in ambiente basico.....	30

CAPITOLO 3. VITAMINA D₃ E COMPLESSAZIONE CON CD: STATO DELL'ARTE	31
3.1 La Vitamina D ₃	32
3.2 I complessi a base di Vitamina D ₃ per uso topico.....	32
3.3 Ibridi silice-CD: cosa è presente in letteratura?.....	33
3.4 Criticità nel processo di sintesi.....	36
CAPITOLO 4. MATERIALI E METODI	38
4.1 Reagenti e materiali.....	38
4.2 Sintesi.....	38
4.3 Tecniche di caratterizzazione.....	39
4.3.1 Diffrazione a raggi X (XRD).....	39
4.3.2 Termogravimetria (TGA/DSC).....	40
4.3.3 Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).....	41
4.3.4 Spettroscopia UV/Visibile.....	42
4.3.5 FESEM e EDS.....	43
CAPITOLO 5. SINTESI	44
5.1 Caratterizzazione dei building block organici	44
5.1.1 β-ciclodestrina (β-CD) e β-metil-ciclodestrina (β-mCD).....	44
5.2 SINTESI IN AMBIENTE ACIDO.....	48
5.2.1 CDS1(β-Ciclodestrina-Silice 1° sintesi).....	48
5.2.2 CDS2 (β-Ciclodestrina-Silice 2° sintesi).....	52
5.2.3 β-mCDS1 (β-mCiclodestrina-Silice 1° sintesi).....	57
5.2.4 β-mCDS2(β-mCiclodestrina-Silice 2° sintesi).....	60
5.3 SINTESI IN AMBIENTE BASICO.....	63
5.3.1 Il Metodo Stöber: in cosa consiste?.....	63
5.3.2 Sintesi silice tipo Van blaaderen (VBS).....	64
5.3.3 Sintesi silice tipo Van blaaderen con ciclodestrina (VBCDS).....	69
5.4 CAMPIONI TRATTATI IN CO ₂ SUPERCRITICA.....	72
5.4.1 Trattamento in CO ₂ supercritica (scCO ₂): nozioni generali.....	72
5.4.2 ScCO ₂ e CD.....	74

5.4.3	Principi di funzionamento dell'impregnazione in CO ₂ supercritica.....	75
5.4.4	Descrizione delle varie prove di impregnazione.....	76
5.4.5	Vitamina D ₃	76
5.4.6	βCDV.....	79
5.4.7	βCD_sc_CO ₂	82
5.4.8	βmCDV.....	84
5.4.9	Test di rilascio in etanolo e acqua dei campioni impregnati con scCO ₂	86
5.4.9.1	CD in etanolo.....	87
5.4.9.2	βCDV in etanolo.....	88
5.4.9.3	βCDV in acqua.....	89
5.4.9.4	βmCD in etanolo.....	90
CAPITOLO 6. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....		93
6.1	Progettazione dispositivo silice/CD.....	93
6.2	Conclusioni e sviluppi futuri.....	99
7. BIBLIOGRAFIA.....		99
8. RINGRAZIAMENTI.....		104

ACRONIMI

NT Nanotecnologia

T-D Top-down

B-U Bottom-up

CVD Chemical vapor deposition

MBT 2-mercaptobenzotiazolo

CDs Ciclodestrine

β -CD Beta-ciclodestrina

β -mCD Beta-metil-ciclodestrina

NS Nanospugne

POPs Persistent Organic Pollutants

AuNPs Nanoparticelle d'oro

MTX Metotressato

CMC Concentrazione micellare critica

MSNs Silici mesoporose

DDS Drug delivery system

CDS1 Sintesi in ambiente acido a base di β CD e silice

CDS2 Sintesi in ambiente acido a base di β CD e silice, con un rapporto tra i reagenti a livello di acqua e silice moltiplicati per 4 rispetto CDS1

β -mCDS1 Sintesi in ambiente acido a base di β mCD e silice, con invecchiamento in stufa a 60°C

β -mCDS2 Sintesi in ambiente acido a base di β mCD e silice, con invecchiamento in stufa a 40°C

VIT-D Vitamina D₃ (colecalfiferolo)

CTAB Bromuro di cetil-trimetilammonio

scCO₂ CO₂ supercritica

β -CDV Impregnazione in scCO₂ supercritica di VIT-D in β CD

β CD_sc_CO₂ Impregnazione in scCO₂ supercritica di β CD in β CD

β -mCDV Impregnazione in scCO₂ supercritica di VIT-D in β mCD

VBS Sintesi in ambiente basico per la realizzazione di particelle di silice con il metodo Van Bladeren

VBCDS Sintesi in ambiente basico per la realizzazione di particelle di silice con CD con il metodo Van Bladeren

INTRODUZIONE

I sistemi ibridi a base di ciclodestrine (CDs) e silice sono una opportunità in ambito farmacologico, in quanto possono rappresentare nuovi carrier di principi attivi per il rilascio di farmaci.

Le CDs sono oligosaccaridi, polimeri naturali derivanti dalla scissione enzimatica dell'amido. Negli ultimi decenni le CDs hanno attirato l'attenzione da parte della comunità scientifica, per una serie di proprietà fisico-chimiche, che ben si prestano a vari settori ingegneristici. Il cuore delle ciclodestrine è in grado di confinare reversibilmente tramite interazioni deboli un elevato spettro di molecole lipofile (come il colecalciferolo), aumentandone la solubilità in acqua e proteggendole da reazioni di degradazione termica e fotochimica.

L'obiettivo del seguente lavoro di tesi è stato quello di impiegare le ciclodestrine come building-block per ottenere degli ibridi silice-ciclodestrina che coniughino i vantaggi della silice (stabilità termica ed azione favorevole sul derma in vista di applicazioni dermatologiche) e delle ciclodestrine (protezione di principi attivi e incremento della loro solubilità). È stato pertanto necessario analizzare gli eventuali ibridi simili, presenti in letteratura, al fine di comprendere come ottenere l'autoassemblaggio delle CDs in soluzione acquosa e mettere in luce le relative criticità nei processi di sintesi.

Il primo capitolo dell'elaborato è dedicato allo studio delle ciclodestrine, in ambito scientifico, industriale (con un nutrito numero di esempi) e biomedicale.

Il secondo capitolo affronta le tematiche relative alle silici nanostrutturate, elencandone le proprietà e relativi meccanismi di idrolisi e condensazione.

Il terzo capitolo si apre con un'analisi dettagliata dei lavori in letteratura, per cercare di comprendere quale possa essere il meccanismo di assemblaggio delle CDs in soluzione acquosa.

Il quarto capitolo è interamente dedicato alla descrizione delle procedure sperimentali e dei reagenti impiegati. Le tecniche di caratterizzazione impiegate sono state la diffrazione a raggi X, l'analisi termogravimetrica, la spettroscopia infrarossa (FTIR), la spettroscopia UV/Visibile in soluzione e la microscopia elettronica FESEM.

Il quinto capitolo rappresenta il nucleo centrale del lavoro sperimentale. Al suo interno viene descritta e discussa ogni singola sintesi effettuata. I processi di sintesi vengono suddivisi secondo la tipologia di ambiente acquoso (acido o basico) nel quale sono stati eseguiti. La parte finale del capitolo è dedicata ad un lavoro preliminare effettuato per valutare come incorporare la vitamina D nella CD tramite l'impregnazione mediante CO₂ supercritica.

Il sesto capitolo, in chiusura del lavoro di tesi, propone, prima delle conclusioni e della discussione di possibili sviluppi futuri, la progettazione di un dispositivo che sfrutta la tecnologia investigata per una potenziale applicazione biomedicale.

CAPITOLO 1: NANOMATERIALI E CICLODESTRINE

1. Nanotecnologia

1.1 L'origine

“C'è un sacco di spazio giù in fondo” è una frase celebre pronunciata nel 1959 dal professore **R.P. Feynman**, durante una conferenza, divenuta poi iconica nell'ambito della nanotecnologia. La sua lezione venne, infatti, pubblicata nel febbraio 1960 nel numero di *Engineering & Science* rivista del *California Institute of Technology*. [1]

Durante l'intervento vennero gettate le basi per l'affermazione delle nanotecnologie (**NT**). Per **NT** si intende un tipo di tecnologia per cui è possibile “manipolare la materia a livello molecolare, atomo per atomo, per creare grandi strutture con organizzazione gerarchica. L'obiettivo è quello di sfruttare queste proprietà ottenendo il controllo di strutture e dispositivi a livello atomico, molecolare e supramolecolare, applicando metodi efficienti di fabbricazione”. [1]

1.2 Requisiti di un sistema nanotecnologico

Affinché un sistema possa essere definita nanotecnologico, deve possedere una serie di requisiti che sono così riassumibili:

- Deve possedere almeno una dimensione sulla nanoscala, in un range compreso tra 1 e 100 nanometri (nm).
- Deve essere prodotta tramite un processo standardizzato che abbia un ottimo controllo fisico-chimico delle strutture.
- Deve possedere proprietà “**building block**”, ovvero le **NT** possono combinarsi tra loro per formare strutture via via più grandi, complesse e gerarchicamente organizzate.
- Deve possedere delle proprietà (di tipo chimico, elettrico, magnetico, meccanico e/o ottico) differenti rispetto al medesimo materiale massivo. [2]

A seconda della dimensione caratteristica possiamo ulteriormente suddividere le nanotecnologie come:

- **Nano-oggetto**: una o più dimensioni esterne nella nanoscala (fullereni, grafene).
- **Nano-materiale**: Una o più dimensioni caratteristiche geometriche nella nanoscala (nanocomposito).
- **Nano-dispositivo**: Automa con memorizzazione di informazioni e l'elaborazione nella nanoscala (transistor a singolo elettrone). [2]

Sebbene in differente misura, le nanotecnologie soffrono tutte del problema dell'aggregazione. Infatti le **NT** possiedono un elevato rapporto superficie-volume, che si traduce in una elevata tensione superficiale e pertanto in un'elevata tendenza all'agglomerazione. Per tale motivo è necessario sviluppare una strategia ad hoc, come la stabilizzazione elettrostatica o sterica, per prevenirne precipitazione e agglomerazione.

1.3 Due differenti approcci di sintesi delle nanotecnologie: Top-down e Bottom up

La possibilità di nanostrutturare un materiale può prevedere due diversi approcci di sintesi, i quali vengono indicati come “top-down” (**T-D**) ed il “bottom up” (**B-U**) (**Figura 1**).

Il **T-P** viene anche chiamato approccio “*fisico*”, poiché corrisponde ad una riduzione di taglia del materiale massivo fino ad arrivare a dimensioni nanometriche; in questo caso la struttura del nanomateriale è la stessa del materiale massivo di partenza. Si tratta di un tipico approccio ingegneristico, che tende a produrre strutture molto precise, stabili, regolari e planari. Tale metodo di “macinazione” può essere implementato con l’uso di radiazioni ad alta energia (raggi X, ioni o elettroni) e può consentire di realizzare nanostrutture allo stato solido. Appartengono a tale famiglia il ball milling, l’evaporazione termica, l’ablazione laser e lo sputtering. [3]

Il metodo **B-U**, invece, si avvicina più alle ipotesi di **Feynman**, poiché il punto di partenza sono atomi, molecole o aggregati molecolari che hanno la capacità di auto-organizzarsi in strutture via via più complesse. Questa capacità consente ad atomi e molecole, inizialmente aggregati in maniera disordinata, di assemblarsi in strutture stabili grazie a particolari interazioni geometriche ed elettroniche.

Appartengono a tale famiglia la chemical vapor deposition (**CVD**), l’evaporazione idrotermica, i processi di co-precipitazione e le sintesi sol-gel. [3]

I due metodi presentano notevoli differenze: mentre un approccio **T-D** richiede soluzioni maggiormente standardizzate, dal basso costo operativo e con facile gestione dell’impianto, quello **B-U** risulta essere oggetto di studi in letteratura poiché più sensibile al cambiamento delle condizioni di reazione, meno controllabile e con costi sensibilmente più alti.

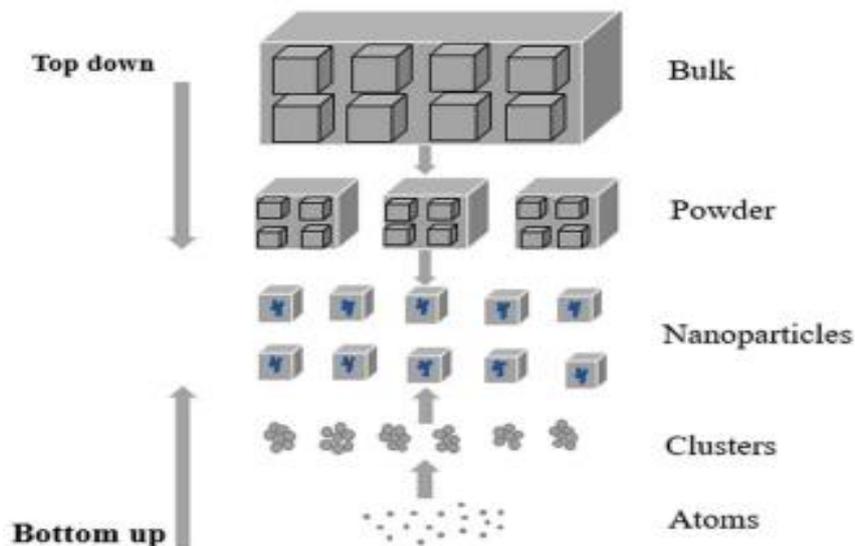


Figura 1: Esempificazione dei due differenti approcci di sintesi: la freccia dall’alto verso il basso indica il metodo top-down, mentre quella dal basso verso l’alto il metodo bottom up. [3]

Nel presente lavoro di tesi, al fine di ottenere delle particelle con nanostruttura controllata, è stato perseguito più il secondo metodo tramite le sintesi sol-gel.

Uno schema semplificato di reazione sol-gel si può osservare in **Figura 2**: a partire da una soluzione dei precursori, sotto agitazione, avvengono le reazioni di idrolisi (*sol*) e condensazione (*gel*); Il gel ottenuto viene poi sottoposto ad essiccazione (per via termica, con estrazione di fluidi supercritici o tramite tecniche di freezing), ed infine calcinato per ottenere delle particelle.

Molteplici sono i fattori che influenzano la reazione tra i quali il pH, la velocità e la durata dell'agitazione, la temperatura e il tempo di reazione; essi influenzano la microstruttura, la porosità, la cristallinità e, quindi, la densità del prodotto finale. [3]

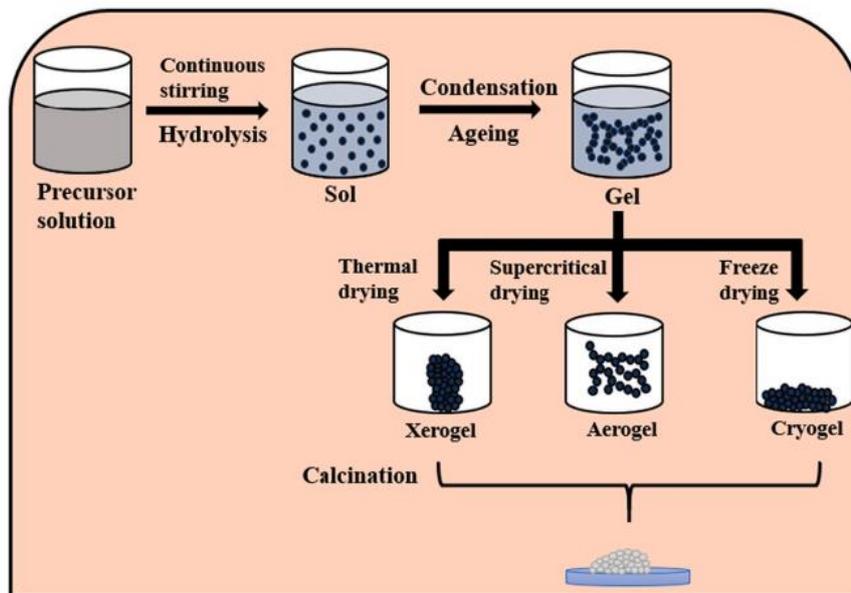


Figura 2: Schema semplificato di reazione di una sintesi sol-gel: dopo la formazione delle particelle e la successiva gelificazione seguono le fasi di rimozione del solvente (da sinistra verso destra metodo termico, con fluidi supercritici o freeze drying) e la calcinazione per fissare la struttura [3]

Come vantaggi della tecnica è possibile annoverare: una bassa temperatura di lavorazione (inferiore di base a 100°C), la possibilità di introdurre modeste quantità di dopanti nel sol e l'alta purezza delle particelle. Come svantaggi, invece, tempi maggiori di reazione, possibile presenza di sostanze organiche ad alto impatto per la salute e la necessità di purificazione del prodotto tramite trattamenti post sintesi. [3]

1.4 Nanomedicina

Dagli anni '60 ad oggi, le nanotecnologie, per l'incredibile possibilità di manipolazione atomica, hanno assicurato molteplici sviluppi tecnologici come sistemi ottici, dispositivi per l'industria elettronica, chimica e automobilistica, per l'ingegneria ambientale e la medicina. Nuove forme allotropiche del carbonio (come nanotubi, fullereni e grafene), nanocompositi, quantum dots, adamantani condensati, come anche tecniche avanguardistiche come lo Scanning Tunneling Microscope (STM) e l'Atomic Force Microscope (AFM) sono solo alcune delle centinaia di scoperte fatte in ambito nanotecnologico. [5]

Il quadro nel quale si colloca il seguente elaborato, però, è quello dell'impiego di **NT** in ambito biomedicale e farmacologico. In tal senso godono di grande interesse accademico, tra altri, i liposomi, gli anticorpi monoclonali (**Figura 3**) e le ciclodestrine (che verranno trattate nei paragrafi seguenti). La nanoscienza, infatti, si presta perfettamente alle scienze microbiologiche poiché le dimensioni delle bio-particelle, come virus ed enzimi, rientrano proprio nella scala di 10⁻⁹ metri.



Figura 3: Rappresentazione (a destra) di una particella liposomica insieme ad un set di molecole interagenti, (a sinistra) la rappresentazione schematica di un anticorpo monoclonale. [4]-[5]

1.2 Le ciclodestrine

1.2.1 Un po' di storia sulle CDs

La scoperta delle ciclodestrine risale al 1891 quando uno studioso francese A. Villiers pubblicò una breve nota in cui faceva riferimento ad una molecola, da lui ribattezzata "cellobiosina" [6]. (o **Schardinger** destrina [1]) proveniente dall'isolamento di una digestione batterica. Il composto era stabile in condizioni di idrolisi acida e, come l'amido, non mostrava proprietà riducenti. Villiers aveva inconsapevolmente isolato una miscela mista composta da α -CD e β -CD. Bisogna comunque aspettare il 1940 affinché le **CDs** possano essere isolate e caratterizzate in base alle loro proprietà. Il primo brevetto, infatti, viene pubblicato in Germania solo nel 1953. Dal primo brevetto ad oggi, si è assistito ad un trend esponenziale di crescita di studio delle loro tipologie presenti sul mercato, come evidenziato dal grafico riportato in **Figura 4**.

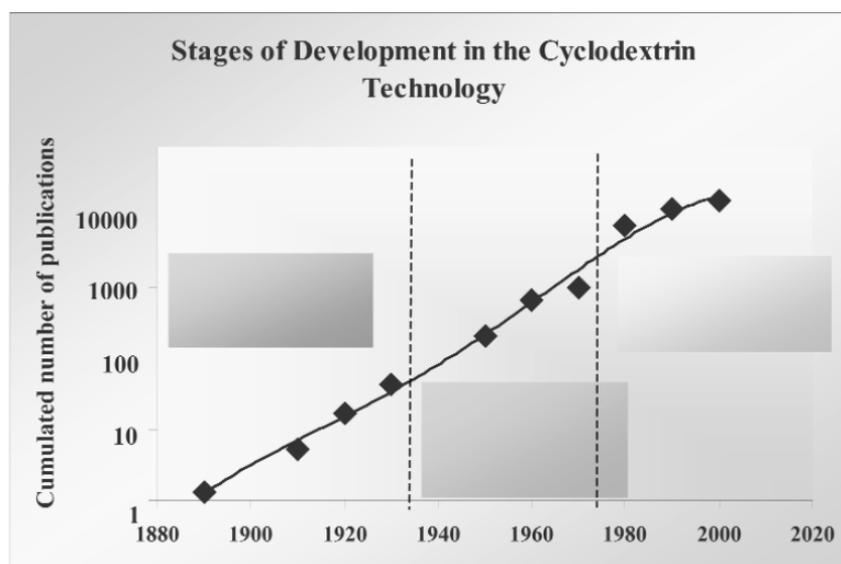


Figura 4 Grafico che mostra il trend di crescita del numero di CDs, dalla scoperta loro scoperta, risalente al 1891, sino ad oggi. [5]

1.2.2 Cosa sono le ciclodestrine?

Le **ciclodestrine** sono oligosaccaridi naturali formati da più di 6 monomeri di *D(+)-glucopiranosio* uniti tra loro con un legame $\alpha,1-4$ glucosidico e chiusi ad anello (**Figura 5**). Esse mostrano una struttura molecolare a tronco di cono, con una cavità centrale, debolmente idrofobica ed in grado di ospitare molecole (mediante la formazione di un complesso d'inclusione) ed una superficie esterna idrofilica, ricca di ossidril.

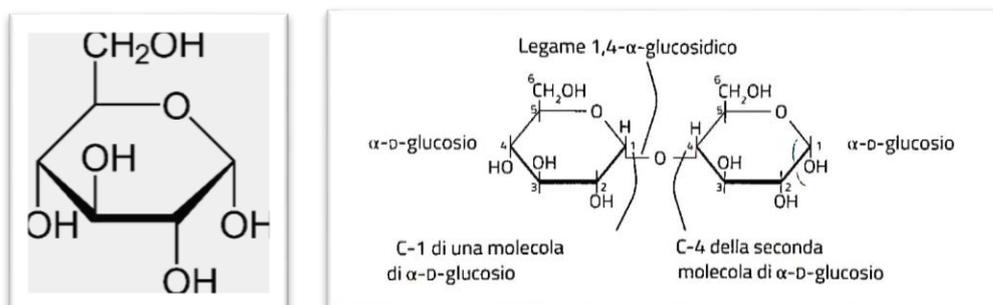


Figura 5: Rappresentazione di una singola molecola di *D(+)*glucopiranosio (a sinistra) e di formazione del legame $\alpha,1-4$ glucosidico (a destra).[7] - [8]

1.2.3 Processo produttivo CDs

La produzione delle **CDs** prevede come reagente principale l'amido, la cui struttura chimica è osservabile nella **Figura 6**. Esso è un polisaccaride, cioè una macromolecola assimilabile ad un polimero naturale. Le unità fondamentali sono monomeri di glucosio con un numero variabile tra 50.000 alle 200.000 unità. L'amido è composto da due polimeri naturali: l'*amilosio* (circa il 20%) e l'*amilopectina* (circa l'80 %), che si differenziano per il modo in cui i monomeri si legano fra loro.[9]

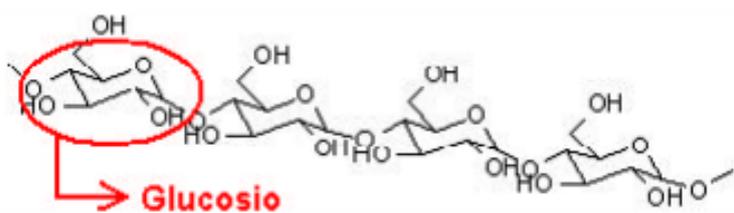


Figura 6: Rappresentazione di quattro unità ripetitive di glucosio lungo una singola macromolecola di amido. [9]

La degradazione enzimatica è la via principale di produzione delle **CDs**: ad opera delle α -*amilasi*, avviene una scissione tramite l'idrolisi della catena dell'amido e la produzione di glucosio, maltosio e altre molecole di piccole dimensioni. L'impiego di specifici catalizzatori spinge la reazione verso prodotti di natura oligomerica. Le destrine appartengono a quest'ultima categoria, ovvero agli oligomeri, e sono molecole eterogenee, lineari o ramificate, variamente solubili in acqua. [9]

Con una particolare α -*amilasi* (la cicloglucotransferasi) oltre alla reazione di idrolisi, si verifica una contemporanea ciclizzazione intramolecolare ed il prodotto di reazione diventa una destrina ciclica, appunto una **CD**.

Il processo produttivo in realtà è più complesso e si articola in tre step differenti: inizialmente viene fatta una fermentazione batterica ed estrazione di CD-glicosiltransferase; segue una reazione enzimatica di CD dall'amido e precipitazione attraverso complessazione; infine una rimozione dell'agente complessante ed una purificazione del prodotto.

1.2.4 Caratteristiche peculiari delle CDs

La struttura ad anello con cavità interna lipofila e superficie esterna idrofila fa sì che le CDs possano includere al loro interno molecole ospiti come ad esempio dei farmaci (**Figura 7**).

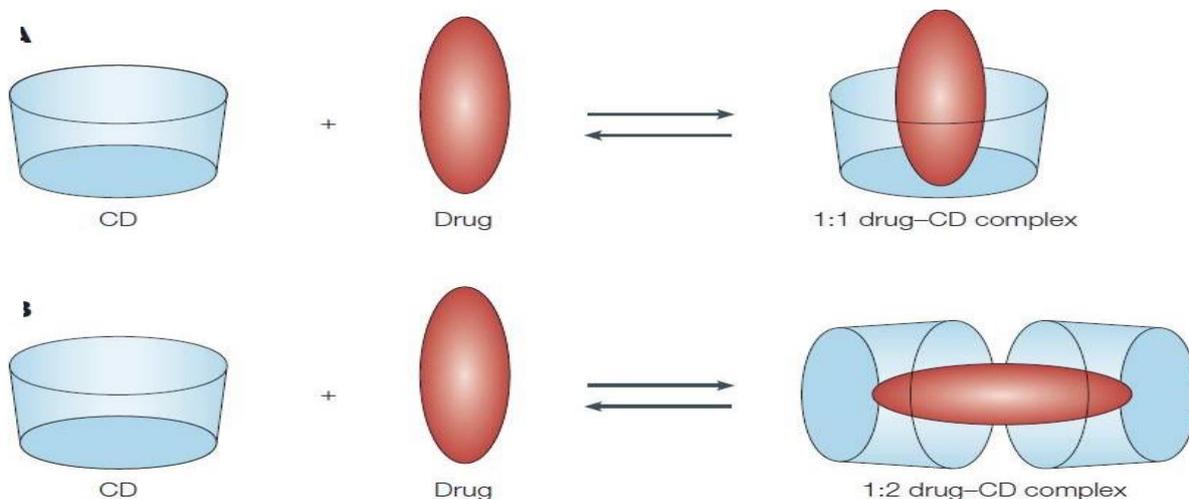


Figura 7 : Schema di complessi di inclusione della ciclodestrine con farmaci secondo un rapporto 1:1 (sopra) o in rapporto 1:2 (sotto). [10]

Tale conformazione dona alle **CDs** particolari proprietà chimico-fisiche che possono così essere riassunte:

Protezione delle molecole ospiti contro:

- reazioni di decomposizione indotte dalla luce o dal calore
- ossidazione o idrolisi
- reazioni chimiche con altri composti organici
- perdita per evaporazione

Solubilizzazione delle molecole ospiti in acqua:

- aumento della solubilità
- aumento del tasso di solubilizzazione
- variazione di viscosità

Eliminazione di:

- odori o sapori indesiderati
- igroscopicità

Miglioramento della manipolazione:

- di sostanze liquide o oleose sotto forma di polveri
- aumento della stabilità delle emulsioni

1.2.5 Applicazioni di CDs in ambito ingegneristico

Prima di approfondire gli studi relativi all'impiego di ciclodestrine in ambito farmacologico e di drug delivery system è necessario riportare preventivamente alcune delle loro applicazioni in ambito industriale. Nel tempo la crescente domanda ha provocato una sensibile riduzione dei relativi costi di produzione [5]. Ciò ha reso maggiormente disponibili e appetibili le CDs sul mercato per svariate applicazioni (**Figura 8**).

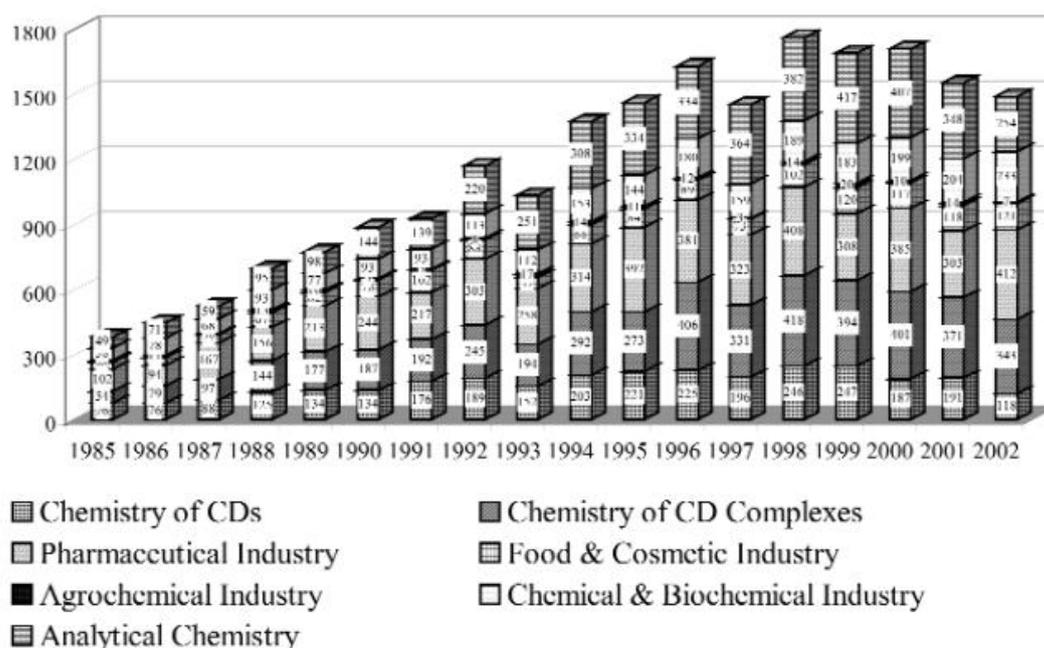


Figura 8: Istogramma relativo al trend di crescita del numero di pubblicazioni relative alle CDs dal 1985 ad oggi. [5]

Da una ricerca bibliografica è emersa, ad esempio, la possibilità di impiegare le **β -CD** come *coating anticorrosione* di strutture in bronzo del patrimonio storico-culturale; in previsione di eliminare completamente molecole, sia protettive, ma cancerogene e altamente inquinanti (come l'**MBT**¹) ed adeguarsi agli standard europei di sostenibilità e chimica a basso impatto ambientale. [11]

Esplicativo è, inoltre, l'impiego delle **CDs** come precursori di **nanospugne (NS)** polimeriche iper-reticolate, dotate di proprietà complessanti. [12] L'elevato numero di gruppi ossidrilici esposti verso l'esterno, conferisce alle **CDs** una discreta solubilità in solventi polari come acqua e dimetilsolfossido, come anche la capacità di agire in qualità di monomeri polifunzionali in reazioni di polimerizzazione [12]. I prodotti che si ottengono, facendo reagire

¹Il 2-mercaptobenzotiazolo(o **MBT**) è un composto eterociclico. A temperatura ambiente si presenta come un solido giallo chiaro dall'odore caratteristico. È un composto allergenico e pericoloso per l'ambiente.

le **CDs** con agenti reticolanti (come diisocianati e/o composti carbonilici), sono preferenzialmente polimeri insolubili, ad alto tasso di reticolazione chiamati appunto **NS** (**Figura 9**). Grazie alle porosità cellulari interconnesse, le **NS** sono solitamente in grado di complessare uno spettro più ampio di molecole, se paragonate alle singole CD di partenza. [12]



Figura 9 Reazione di polimerizzazione di una **NS**: sulla sinistra sono presenti i reagenti (molecole di ciclodestrina) insieme ad un opportuno agente reticolante. La presenza di catalizzatore e calore induce l'inizio della reazione di polimerizzazione e l'iper-reticolazione con formazione di una **NS**. [12]

I campi di applicazioni sono molteplici: la rimozione di sostanze organiche indesiderate da acque reflue, sintesi di composti a comportamento intumescente (ovvero additivi per il ritardo alla fiamma), supporto per enzimi ed influenza nei processi di fotochirogenesi. [12]

Fra questi, è possibile citare un caso esemplificativo di impiego delle **NS** relativo all'abbattimento d'inquinanti. In **Figura 10** è possibile infatti osservare la decolorazione di una soluzione ad opera di una **NS** a base di β -**CD**. Come si evince dal confronto tra le provette, il colorante rosso a base organica (la fenoltaleina) viene completamente rimosso dalla soluzione acquosa con una bassa concentrazione di **NS**. [13]

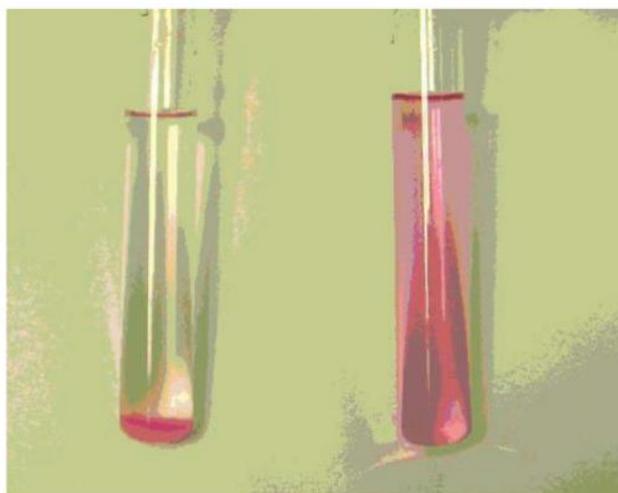


Figura 10: Decolorazione di una soluzione rossa metilata ad opera di una NS di policarbonato a base di β -**CD**. [13]

Le **NS** infatti possono essere impiegate per la purificazione di acque contaminate da inquinanti organici, anche detti *Persistent Organic Pollutants (POPs)*. È possibile annoverare in tale categoria i clorobenzeni, i clorotolueni e i policloro bifenile. Attualmente, le tecniche più utilizzate si basano su carboni attivi. Le **NS**, grazie alla possibilità di

controllare polarità e dimensione dei pori, possono portare a risultati comparabili a quelli dei carboni attivi e, in alcuni casi, anche superiori. [13]

Le **β -CDs** esplicano la loro azione, se pur in maniera ridotta, non solo come polimeri reticolati ma anche tal quali in unione ad altri nanomateriali. Ad esempio, nel caso del lavoro redatto da Nataly Silva e al. [14] viene descritta approfonditamente una formulazione ternaria formata da un tipo di **CD**, il metotressato (**MTX**) e delle nanoparticelle d'oro (**AuNPs**). Il rilascio del farmaco **MTX** è mediato da reazioni di foto-eccitazione: l'irraggiamento del sistema ternario, con specifica lunghezza d'onda del laser provoca la dissipazione di energia locale producendo il rilascio controllato della molecola ospite dalle cavità lipofile (**Figura 11**). Tramite caratterizzazione dettagliata è stato dimostrato come la nanotecnologia in questione permetta di trattare in modo più efficace tumori e neoplasie rispetto alla singola formulazione mista oligosaccaride e farmaco. [14]

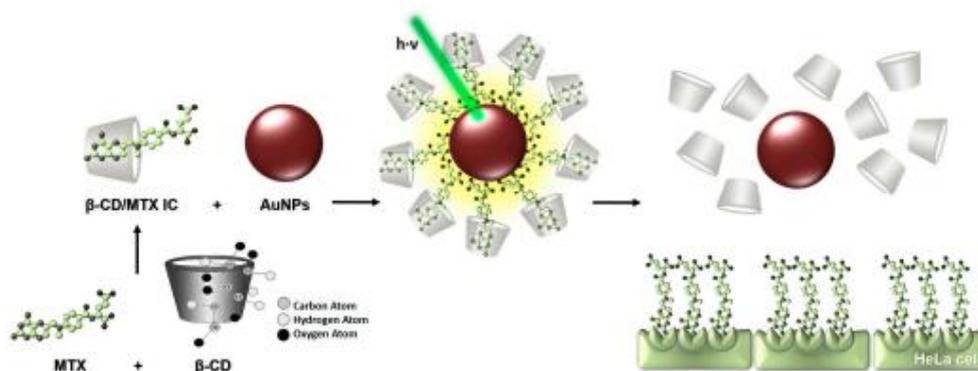


Figura 11: Meccanismo di interazione del sistema ternario misto prima (a sinistra), durante (al centro) e dopo (a destra) la fase di rilascio con la radiazione laser. [14]

Ulteriore campo applicativo è quello relativo alle CDs come sostanze ausiliarie per l'industria tessile [15]. Le **CDs** risultano promettenti nell'ottica di rimozione e/o sostituzione di tensioattivi; nell'ottimizzazione della finitura dei tessuti e, quando legate chimicamente alle fibre, nel fornire una maggiore idrofobicità alle stesse. Inoltre la capacità di formare complessi d'inclusione permette di fissare eventuali profumi, repellenti per insetti, agenti antimicrobici, ecc. [15]. Non solo, ma le **CDs** sono in grado di formare complessi con le molecole di detergente e possono agire come molecole antischiuma. Se, infatti, esse vengono addizionate in fase di risciacquo durante il lavaggio, si fissano le ultime tracce di detersivo. Questo effetto antischiumogeno può generare un impatto positivo nell'ottica di ridurre il contenuto d'acqua in fase di risciacquo. Un processo di lavaggio tradizionale si articola in due cicli con acqua fredda dolce e un ciclo con acqua fredda dura, ciascuno della durata di 3 min. L'aggiunta di 3 g/L di CD nell'acqua di risciacquo finale ha ridotto il contenuto residuo di tensioattivo nel tessuto da 209 a 134 ppm. [16]

Altrettanto investigato è il campo relativo alla cosmesi. È possibile riportare due esempi di eliminazione di sgradevoli odori. Il primo è quello del "diidrossiacetone", uno dei concimi maggiormente impiegati nell'industria agricola. Uno dei principali svantaggi del diidrossiacetone è legato al fatto di non poterne mascherare l'odore con i profumi

tradizionali. L'odore svanisce utilizzando un complesso con la ciclodestrina che ne permette quindi l'assorbimento in soluzione. [17]

Un secondo esempio è dato dai deodoranti. Essi sono usati per controllare gli odori formati dalla degradazione microbica del sudore [17]. Le ciclodestrine, o le loro miscele, possono essere addizionate nelle formulazioni di deodoranti spray. Esse sono in grado di complessare terpeni, le molecole responsabile degli odori, per il rilascio controllato di fragranze sulla pelle e, inoltre, possono catturare composti maleodoranti prodotti dalla stessa [17].

Infine, è possibile riportare alcuni campi di impiego delle **CDs** in ambito alimentare. Esse infatti sono state definite sicure dall'associazione "American Food and Drug Administration", per cui è stata prevista una loro introduzione nei prodotti alimentari [18]. La ricerca alimentare si è concentrata in vari settori sia relativi alle applicazioni che ai processi produttivi, come rappresentato in **Figura 12**. Tra i vari esempi figurano l'incapsulamento di composti bioattivi (come composti fitochimici e probiotici) [18], la costruzione di pellicole intelligenti per il confezionamento degli alimenti, come nel caso del lavoro di *Pan e al.* [19], nel controllo del rilascio dei sapori e nel mascheramento degli odori sgradevoli [18].

Alcuni composti bioattivi, tra cui composti fenolici, carotenoidi, oli e acidi grassi essenziali e vitamine insolubili, sono difficili da assorbire dai tessuti fisiologici a causa della loro bassa solubilità in acqua. Inoltre, la loro scarsa stabilità rispetto alle condizioni fisiologiche, di lavorazione e di conservazione (ad esempio, calore, luce, ossigeno e pH) e le potenziali interazioni con le matrici alimentari contribuiscono ad una limitata biodisponibilità.

Le **CDs**, grazie alle loro proprietà complessanti, possono aumentarne la solubilità proteggendoli, contemporaneamente, dalla degradazione. [18]

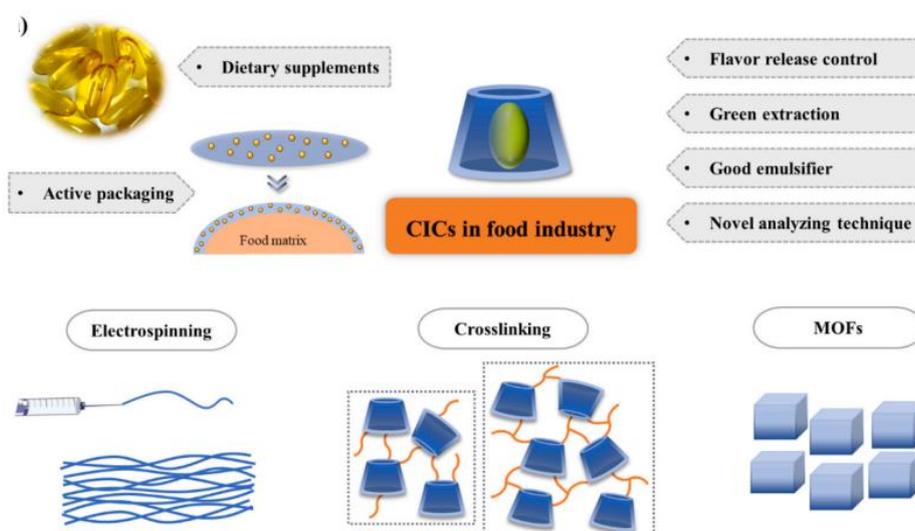


Figura 12: Rappresentazione delle applicazioni (parte superiore della foto) delle CDs in ambito alimentare (controllo dei sapori, estrazione green e buona emulsionabilità) e delle nuove tecniche di fabbricazione (parte inferiore della foto) dei complessi CD: principio attivo. [18]

1.2.6 Ciclodestrine e complessi con farmaci

Le **CDs** possiedono delle cavità interne *lipofile* e delle superfici esterne *idrofiliche*. Esse sono in grado di interagire con una grande varietà di molecole host per formare dei complessi di inclusione con legami non covalenti. Si presentano in tre forme che possono essere indicate come struttura **α -CD**, **β -CD** e **γ -CD** (Figura 13).

Le tre strutture differiscono per il numero di monomeri crescente (rispettivamente 6, 7 e 8 unità). Il differente numero di unità monomeriche si traduce in diversi diametri della cavità, peso molecolare e solubilità, come evidenziato in **Tabella 1**.

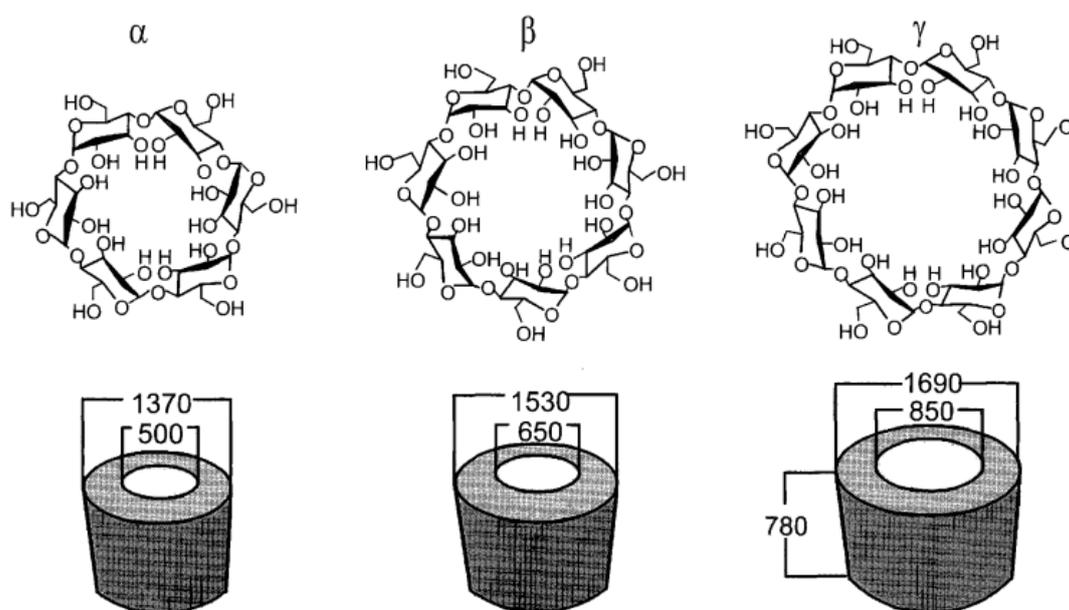


Figura 13: Rappresentazione molecolare delle α -CD, β -CD e γ -CD con le relative quote di diametro interno, diametro esterno e altezza della struttura a tronco di cono. [20]

Type of CD	Cavity Diameter Å	Molecular Weight	Solubility (g/100 mL)
α -CD	4.7–5.3	972	14.5
β -CD	6.0–6.5	1135	1.85
γ -CD	7.5–8.3	1297	23.2
δ -CD	10.3–11.2	1459	8.19

Tabella 1: Proprietà delle α -CD, β -CD e γ -CD in funzione del diametro della cavità, peso molecolare e solubilità in acqua. [20]

In base alle dimensioni caratteristiche delle cavità è possibile asserire che:

- le **α -CD** complessano preferibilmente molecole alifatiche
- le **β -CD** complessano molecole aromatiche ed eterocicli;
- le **γ -CD** complessano macromolecole (come gli steroidi)

Non solo, ma si riscontra una grande dipendenza di formazione del complesso anche dalla geometria di coordinazione. La molecola Guest può entrare nella cavità della CD dal lato più stretto (gruppi ossidrili primari) oppure dal lato più ampio (gruppi ossidrili secondari), come mostrato in **Figura 14**. [13]

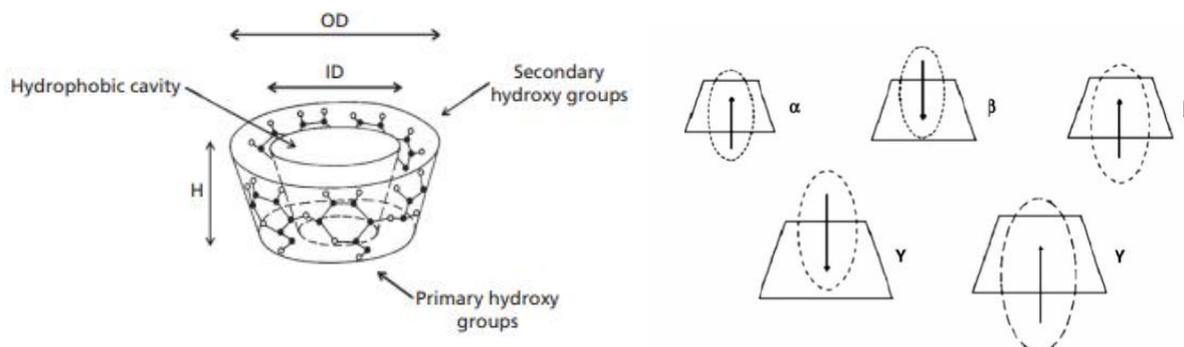


Figura 14: Rappresentazione dei differenti gruppi ossidrili di una CD (a sinistra), influenza della molecola e della cavità della CD sul meccanismo d'inclusione (a destra). [5]-[13]

La dimensione della cavità di α -CD è molto piccola per la maggior parte delle molecole di farmaco, mentre la γ -CD è molto costosa. La formulazione δ -CD, invece, ha una minor propensione nel formare complessi rispetto alle forme α , β e γ . Ad esempio, con farmaci come digitossina e spiranolattone, la δ -CD mostra un maggior effetto solubilizzante rispetto alla α -CD ma l'effetto di δ -CD nettamente inferiore rispetto alle strutture β -CD e γ -CD. La β -CD è stata ampiamente utilizzata nelle prime applicazioni farmaceutiche grazie al suo rilascio immediato e grazie anche alla dimensione della cavità, adatta alle molecole di farmaco. Eppure la sua bassa solubilità in soluzione acquosa e la relativa nefrotossicità possono limitarne l'utilizzo soprattutto in sinergia con altri farmaci. [20]

Oltre alle CD naturali, fin qui descritte, esistono delle CD modificate in cui alcuni ossidrili (o atomi di idrogeno) che vengono appositamente sostituiti con altri gruppi funzionali. Il grado di sostituzione (degree of substitution, **DS**) indica il numero medio di idrossili sostituiti per unità glucopiranosica di anello. Poiché il numero di ossidrili reattivi per ogni unità glucopiranosica è 3, il numero massimo di sostituenti possibili per α -, β -, e γ -CD è rispettivamente 18, 21, e 24. [20]

La versatilità della β -CD, quindi, si traduce in 21 gruppi ossidrili che possono essere modificati sostituendo l'atomo di idrogeno o il gruppo ossidrile con una grande varietà di gruppi sostituenti come gruppi alchil-, idrossialchil-, carbossialchil-, ammino-, tio-, tosil-, glucosil-, maltosil-, ecc. (se ne contano molti con sostituenti di eteri, esteri, anidrossi, acidi, basici, ecc.). [20]

I derivati delle **β -CDs** possono essere preparati tramite due approcci differenti, ovvero tramite reazioni chimiche o reazioni enzimatiche.

Le derivazioni possono avere lo scopo di:

- migliorare la solubilità della CD.
- migliorare la complessazione tra la CD e la molecola ospite, con la contemporanea stabilizzazione dell'ospite e riducendone reattività e mobilità.
- legare chimicamente gruppi specifici (ad esempio con attività catalitica). [6]

1.2.6.1. Lo studio della complessazione tramite il diagramma di solubilità

In soluzione acquosa, la cavità della ciclodestrina, leggermente apolare, è occupata da molecole d'acqua. Tale interazione è energeticamente sfavorita poiché si tratta di un'interazione tra una specie polare ed una apolare ed è quindi facilmente sostituibile da molecole ospiti meno polari dell'acqua [8]. Nel caso più semplice, il rapporto Host:Guest è di 1:1. In questo caso si fa parla di "incapsulamento molecolare"(Figura 15).

Tuttavia rapporti stechiometrici pari 2:1 (come nel caso del complesso CD/Vitamina D₃), in esame nei prossimi capitoli), 1:2, 2:2, o anche interazioni più complesse di ordine superiore esistono quasi sempre contemporaneamente. [13]

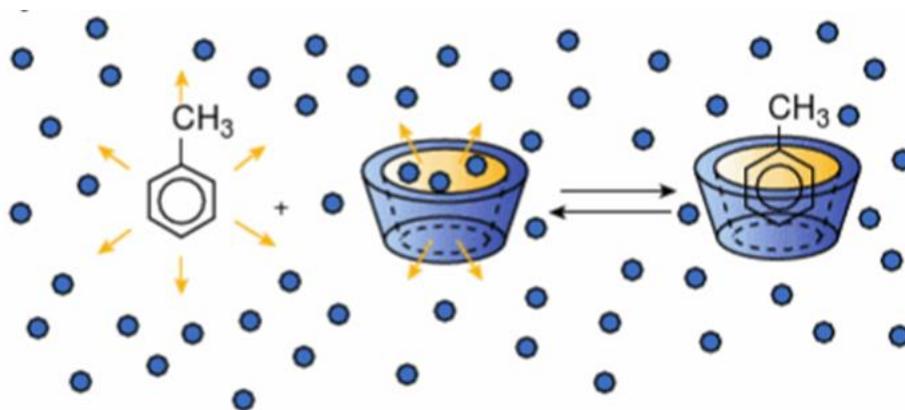


Figura 15: Rappresentazione schematica della formazione di un complesso in soluzione acquosa di una molecola host (ciclodestrina) e del guest (p-xilene). [13]

L'approccio più utilizzato per studiare la complessazione di inclusione è il metodo di solubilità di fase descritto da Higuchi e Connors [21], in quanto esamina l'effetto di solubilizzazione tra farmaco e substrato.

Il diagramma di fase del complesso farmaco/CD (Figura 16) mostra due andamenti differenti schematizzabili come *tipo A* e *tipo B*: il tipo **A** mostra la formazione di un complesso solubile, mentre il tipo **B** indica la formazione di un complesso a bassa solubilità.

La differenza che sussiste tra il complesso **B_I** e **B_S** è legata al fatto che il primo ha una totale insolubilità, mentre il secondo mostra una solubilità parziale. Curve di tipo **A** sono suddivise in sottotipo **A_L**, in cui si osserva un aumento lineare di solubilità del farmaco in funzione della concentrazione di CD, **A_P** (caratterizzati da isoterme che deviano positivamente) e **A_N** (isoterme con curvatura in senso negativo). [21]

La curva di solubilità delle β -CDs rientra nel sottotipo **B**, poiché tale struttura molecolare presenta una scarsa solubilità in solventi acquosi. Altri tipologie di **CDs**, invece, specialmente quelle modificate chimicamente, come quella con il sostituito isopropilico (**HP- β -CD**), di solito producono complessi più solubili e generano sottotipo **A**. [21]

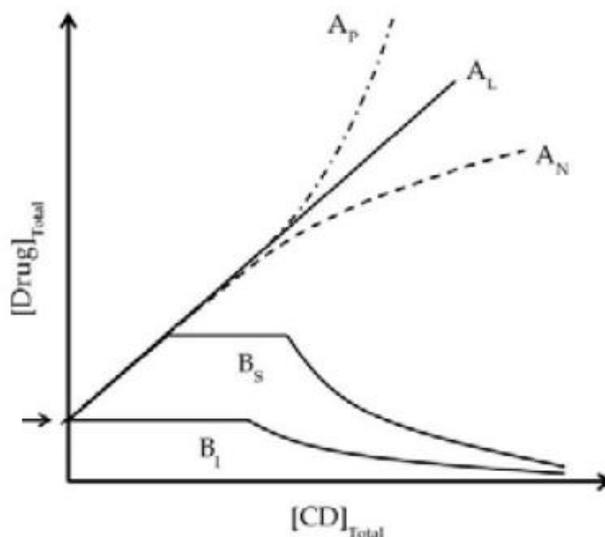


Figura 16: Diagramma solubilità di fase della molecola disciolta in funzione della quantità di CD. [21]

Qualora la stechiometria del complesso tra farmaco e CD è di 1:1, è possibile impiegare la seguente equazione per calcolare la costante di equilibrio $K_{(a:b)}$:

$$K_{a:b} = \frac{\text{slope}}{S_0 (1 - \text{slope})}$$

Nella formula $K_{(a:b)}$ è calcolata in funzione della pendenza della porzione lineare della curva (**slope**) ed S_0 è la solubilità intrinseca del farmaco nelle condizioni di sintesi. [22]

Il tipo più comune di complessi a base di CD prevede un rapporto 1:1 tra farmaco/ ciclodestrina (D/ CD), complesso nel quale una molecola di farmaco (drug, **D**) interagisce con una molecola di ciclodestrina (**CD**), come mostrato in **Figura 17**. [23]

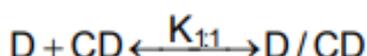


Figura 17: Equazione nella quale viene descritto l'equilibrio di solubilità farmaco (D) e ciclodestrina (CD) con formazione di un complesso (D/CD). La costante di equilibrio della reazione viene fornita dal valore $K_{1:1}$ [23]

La stechiometria più comune dei complessi D/CD di ordine superiore è il complesso 1:2 farmaco/CD e dà come risultante nel diagramma di solubilità di fase un sottotipo A_p . In questi casi, si assume una complessazione consecutiva, dove il complesso 1:2 (**Figura 18**) si forma con una molecola supplementare di CD nel momento in cui si coordina con un complesso 1:1 già presente in soluzione. [23]

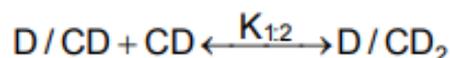


Figura 18: Equazione nella quale viene descritto l'equilibrio di solubilità tra un complesso con coordinazione 1:1 (D/CD) e ciclodestrina (CD) con formazione di un complesso di ordine superiore (D/CD₂). La costante di equilibrio della reazione viene fornita dal valore K_{1:2}. [23]

1.2.6.2 I fattori che influenzano la formazione del complesso: carica elettrica e temperatura

La formazione di un complesso e il successivo rilascio sono estremamente influenzate dal tipo di **CD**. Come spiegato in precedenza, ogni molecola di farmaco può essere correttamente ospitata con un'interazione Host:Guest interna solo se la sua dimensione confrontabile con la cavità lipofila. Diversamente dalle CD neutre, la complessazione può essere ottimale quando oligosaccaride e il farmaco possiedono carica elettrica di segno opposto; di contro se invece hanno la stessa carica la complessazione è sfavorita. [20]

Anche le variazioni di temperatura possono influenzare la complessazione del farmaco: generalmente un aumento della temperatura produce la riduzione della costante di solubilità, probabilmente perché la complessazione avviene tramite interazioni deboli come forze di Van der Waals e legami a idrogeno [13]. Il fenomeno di complessazione può dunque risultare esotermico. Tuttavia, le variazioni di temperatura possono avere un effetto trascurabile quando l'interazione farmaco/CD è guidata prevalentemente da un fattore entropico più che da un fattore entalpico. [20]

1.2.6.3 La beta- e betametil- ciclodestrina (β-metil-CD)

Come già anticipato, il diametro della cavità delle β-CD, o di suoi composti unitari β-glucopiranososi, è adatto per l'uso con molecole delle dimensioni degli ormoni, delle vitamine, delle molecole organiche per applicazioni tissutali o delle colture cellulari. Ai fini delle ricerche del lavoro di tesi, è stato impiegato come reagente la **β-CD**. (**Figura 19**)

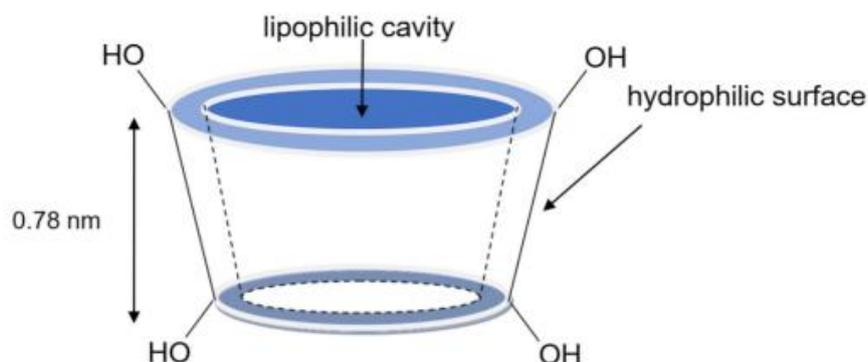


Figura 19: Rappresentazione tridimensionale di una singola molecola di **β-CD** la cui struttura presenta una cavità lipofila interna e una superficie esterna idrofila, grazie agli ossidrili esposti. [24]

Quest'ultima è stata ampiamente utilizzata nell'ambito biomedicale perché il diametro della cavità ha una dimensione ottimale per la coordinazione di legami con molecole di farmaci.

Nonostante ciò, la bassa *solubilità in acqua* e la *nefrotossicità* hanno limitato l'uso di questo oligosaccaride, specialmente in sinergia con altre molecole di farmaco.

Ai fini di tale elaborato è stata impiegata in alcune sintesi anche la **β -metil-CD** con sostituenti metilici rappresentata in **Figura 20**. Si tratta chimicamente la β -CD con un processo di metilazione per incrementarne la solubilità in acqua.

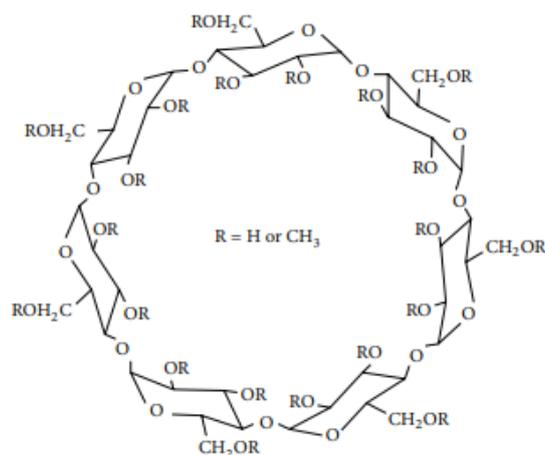


Figura 20: Rappresentazione di una singola molecola di β -metil-CD vista dall'alto. [25]

1.3 Drug Delivery System (DDS)

Dall'analisi dei paragrafi precedenti emerge l'enorme versatilità d'impiego delle CDs in ambito industriale e ingegneristico. Risulta inoltre evidente una grande potenzialità nel settore biomedicale e farmacologico.

I seguenti paragrafi verranno dedicati, quindi, ad indagare in maniera più approfondita i sistemi di rilascio di farmaco, con particolare attenzione a due classi di materiali di interesse per questo scopo: le silici nanostrutturate (presentate nel dettaglio nel capitolo successivo) e le **CDs**.

1.3.1 Rilascio di farmaci: nuove e vecchie formulazioni

La farmacologia affonda le proprie radici in tempi antichissimi, quando i metodi primitivi di assimilazione di molecole "curative" si basavano su masticazione di foglie o inalazioni di fumi. Nella storia sono stati via via perfezionati metodi sempre più efficienti basati su formulazioni più affidabili, come compresse o capsule. [26]

I *sistemi di somministrazione controllata di farmaci (DSS)* sono una delle applicazioni più promettenti per l'assistenza sanitaria e rappresentano un campo in continua evoluzione per la scienza dei biomateriali.

La differenza principale tra un farmaco tradizionale e un DDS risiede nelle differenti cinetiche di rilascio nell'organismo.

Nello specifico, è possibile asserire che con il termine *DDS* si intende "l'incapsulazione di un farmaco in un nanocarriers opportuno, al fine d'augmentarne l'efficacia medica" [27]. Il concetto principale risiede nel fatto che il farmaco non venga somministrato nel paziente in

elevata quantità affinché raggiunga la parte da curare, ma venga inserito all'interno di un carrier (o vettore farmacologico) che tenderà a concentrarsi nel sito di rilascio. [27]

Una formulazione farmacologica tradizionale, assunta per via intravenosa, intramuscolare o orale, subisce una variazione di concentrazione nel tempo. Essa è crescente fino ad un picco (indice di una massima assimilazione) e poi decresce; una successiva assimilazione produce un nuovo incremento della curva. La concentrazione è quindi oscillante nel tempo a causa di successive assunzioni e deve variare al più tra una *concentrazione minima effettiva* ed una *concentrazione massima tossica*, come evidenziato in **Figura 21**.

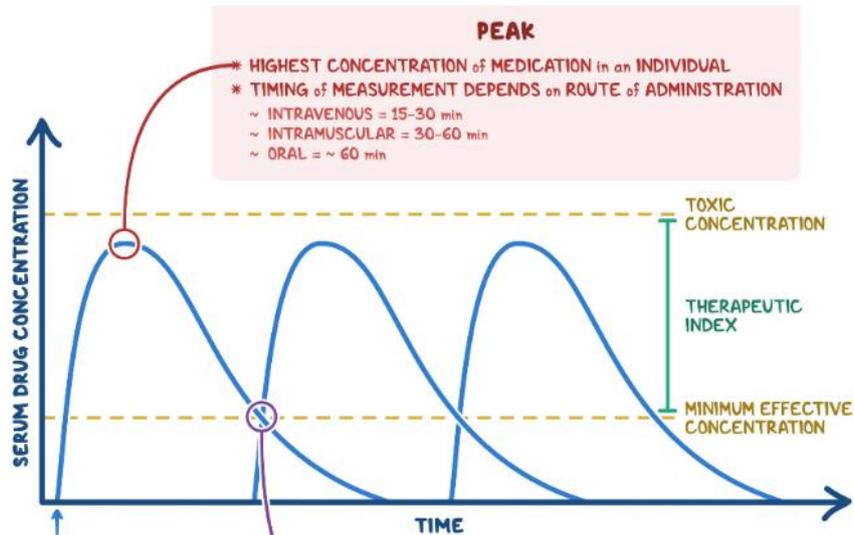


Figura 21: Rappresentazione della concentrazione di farmaco nel sangue in funzione del tempo: la concentrazione oscilla tra un minimo e un massimo. [28]

Da ciò si intuisce che l'assunzione non è stazionaria. In una formulazione DDS, invece, il rilascio è costante nel tempo per cui non si incorre in assimilazioni variabili (**Figura 22**).

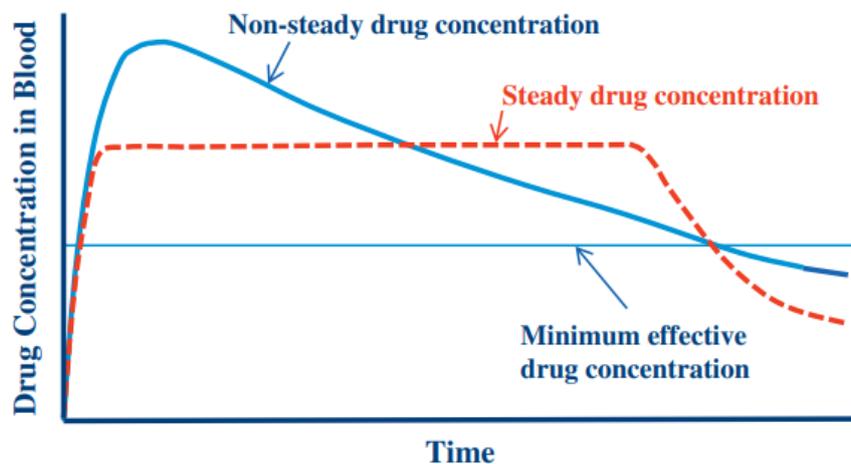


Figura 22: Grafico simile a quello presente in **Figura 21**, in cui viene fatto un confronto tra le cinetiche di rilascio di un farmaco tradizionale ed un DDS. [29]

I **DDS** in realtà raggruppano una grande quantità di sistemi di rilascio (**Figura 23**) che cambiano in base alla dimensione caratteristica della molecola, al tessuto in cui vengono dispersi, al tipo di organismo su vengono testati ed alle cinetiche di rilascio.

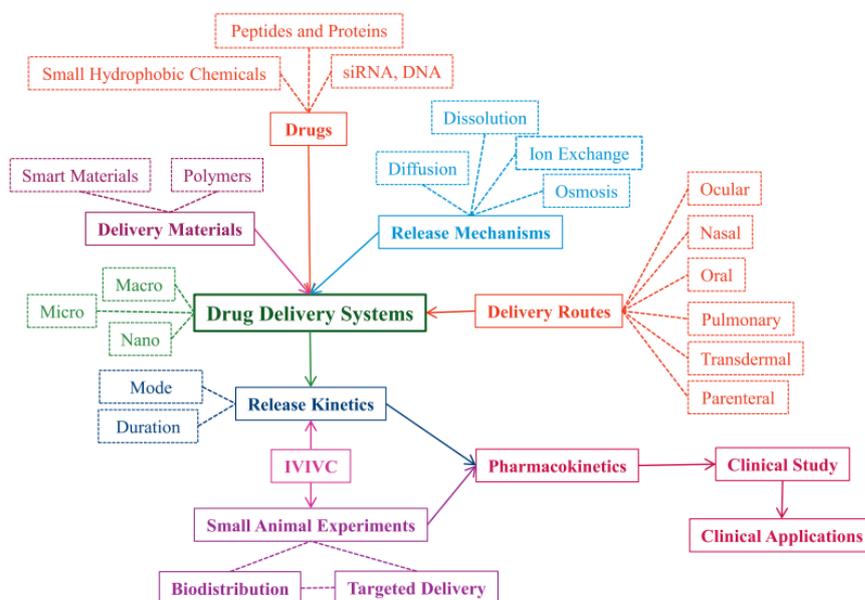


Figura 23: Schema di rappresentazione dei DDS in base alla dimensione caratteristica, la farmacocinetica, il meccanismo di rilascio, il tipo di farmaco etc. [31]

Tra i DDS esistono differenti formulazioni tra cui: microemulsioni nanoemulsioni, liposomi, dendrimeri, nanoparticelle lipidiche, nanoparticelle polimeriche e nanoparticelle inorganiche. [30]

Lo sviluppo di un nuovo sistema prevede una lunga caratterizzazione preliminare e uno studio dettagliato delle proprietà chimico-fisiche così da modulare correttamente il rilascio di farmaco nel tempo e nello spazio (in gergo anche detto “targeting” del tessuto). [31]

Pertanto esistono due tipi di targetizzazione:

- **Targeting passivo:** sfrutta interazioni non specifiche correlate alle proprietà fisico-chimiche dei sistemi di produzione (come carica elettrica, idrofobicità e dimensioni) per indirizzare siti specifici dell’organismo.
- **Targeting attivo:** impiega interazioni specifiche del sito, come il legame tra antigene anticorpo e recettori, per cercare il suo bersaglio cellulare. [31]

Indipendentemente dal tipo di targeting, sia attivo che passivo, la produzione del **DDS** richiede l’impiego di **particelle** che possano superare le eventuali barriere biologiche per raggiungere l’obiettivo specifico.

La dimensione ottimale delle particelle dipende dalla via di somministrazione (orale, oculare, vaginale, endovenosa, ecc.), dall’organo e/o dalle cellule bersaglio. Sebbene ciascun sistema abbia i suoi vantaggi, diverse limitazioni influiscono sull’applicabilità di un DDS. Ad esempio, i liposomi e le micelle soffrono di stabilità chimica che ne limita sia la via di somministrazione che la durata di conservazione. [31] Non solo, ma nel sangue essi

possono disintegrarsi per attacco biochimico da parte di lipoproteine ad alta densità. Anche la possibilità di progettare micelle e liposomi per ottenere rilascio controllato è limitata. La degradazione in vivo dei polimeri sintetici pone problemi di tossicità, mentre per i polimeri naturali, come il chitosano e l'agarosio, la mancanza di controllo sulla purezza porta a una potenziale mancanza di riproducibilità nei loro profili di rilascio. [31]

Le particelle inorganiche non presentano problemi di instabilità, degradazione ed impurezza. Tra queste figurano quelle di silice nanostrutturata. Anzi, tali materiali presentano caratteristiche particolarmente interessanti per il drug delivery quali:

- l'elevata superficie specifica
- la possibilità di funzionalizzazione dei gruppi silossanici
- L'inerzia e la stabilità termochimica
-

Le silici nanostrutturate, in particolare, verranno descritte con maggiore dettaglio nel capitolo successivo.

CAPITOLO 2: SILICI NANOSTRUTTURATE

2.1 Introduzione

In **Figura 24** sono rappresentate una serie di possibili applicazioni delle silici nanostrutturate in ambito nanomedicale; lo sviluppo tecnologico degli ultimi decenni ha infatti promosso i progressi in varie settori terapeutici e diagnostici.

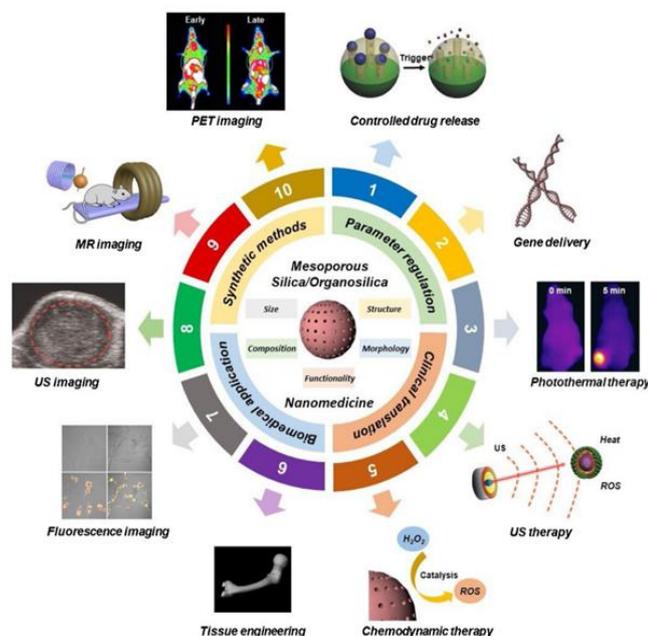


FIGURA 24: Illustrazione schematica delle possibili applicazioni delle silici nanostrutturate in ambito nanomedicale. Lo sviluppo crescente degli ultimi decenni ha promosso i progressi in varie settori terapeutici e diagnostici. [33]

I primi brevetti per la sintesi di silici nanoporose tramite metodi sol-gel, in presenza di tensioattivi come building-block, fanno riferimento ad una procedura per la produzione di materiali mesoporosi (secondo la definizione IUPAC) per "farne uso nei processi di catalisi e assorbimento" e per "il campo della cromatografia". Solo nel 1992, per la prima volta nella storia, l'azienda *Mobil Research and Development Corporation* comunicò di aver sintetizzato una nuova famiglia di materiali, denominata *setacci molecolari mesoporosi ordinati* (M41S) e classificata come *silice mesoporosa periodica* (PMS). [34]

M41S è la famiglia dei materiali mesoporosi MCM-n (*Mobil Composition of Matter*). Tutti i materiali M41S hanno pori (o piani) uniformi e ben definiti, che determinano l'ordine a lungo raggio nonostante le pareti dei pori siano costituite da silice amorfa. La fase finale può essere lamellare, esagonale o cubica (**Figura 25**).



Figura 25: Diagramma schematico di un materiale MCM-50 (lamellare), uno MCM-41 (esagonale) ed uno MCM-48 (cubico). [35]

2.2 Schema generale di sintesi

La sintesi si basa principalmente su un approccio congiunto, derivante dalla combinazione della chimica del sol-gel insieme all'utilizzo di tensioattivi che formano cristalli liquidi e agiscono da *templanti* (dall'inglese *template*). Più in generale si tratta di una sintesi per *soft-templating*. L'utilizzo del template (tensioattivo) è fondamentale per ottenere una struttura ordinata. Il tensioattivo, infatti, origina per "self-assembly" micelle (prima sferiche, poi cilindriche) e i precursori della silice possono condensare alla superficie delle molecole anfifiliche formando un materiale ibrido inorganico-organico (**Figura 26**)

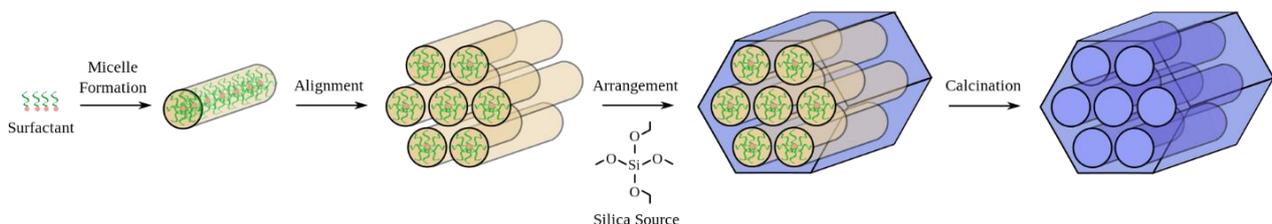


Figura 26: Schema riassuntivo della sintesi di MCM41: al di sopra della concentrazione micellare critica, le molecole di tensioattivo si organizzano nello spazio in aggregati cilindrici con simmetria esagonale. Successivamente viene infiltrata la struttura tramite il precursore siliceo e viene effettuato il trattamento termico di calcinazione per ottenere un materiale con porosità regolari. [37]

Il processo di assemblaggio può seguire due vie differenti che sono schematizzate in **Figura 27**. Il *metodo 1* prevede la presenza di una fase di cristallo liquido, poiché la concentrazione del tensioattivo è sufficientemente elevata (superiore alla concentrazione micellare CMC); il *metodo 2* invece si basa sull'auto-assemblaggio cooperativo (**CSA**), tra le molecole di tensioattivo (presenti a concentrazione inferiore della CMC) e le specie inorganiche che fungono da precursore della silice.

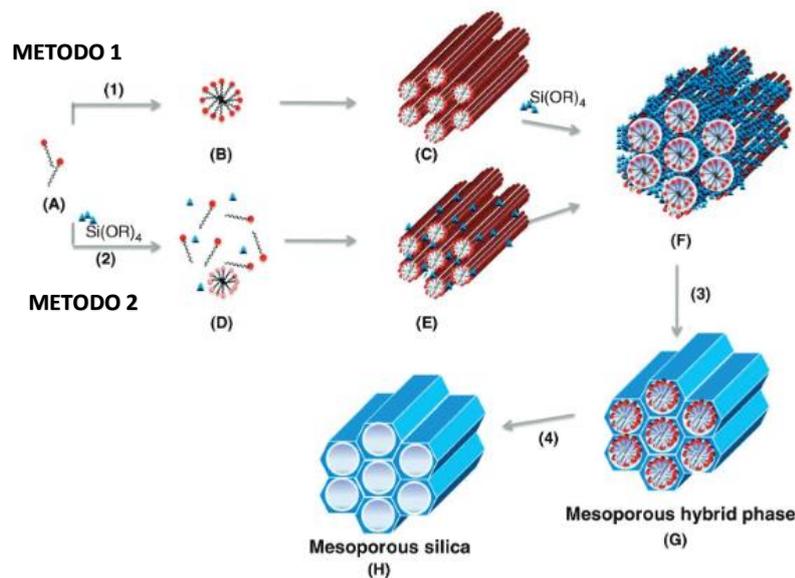


Figura 27: Schema riassuntivo delle due possibili vie di sintesi: (**METODO 1**) template liquido cristallino / (**METODO 2**) Autoassemblaggio cooperativo. [33]

La sintesi così condotta produce materiali di silice nanostrutturata ovvero un materiale ibrido di natura inorganica/organica.

I materiali ibridi, oggetto di questa tesi, rappresentano una interessante alternativa alle silici nanostrutturate ottenute tramite self-assembly di tensioattivi. Essi traggono beneficio dalle proprietà della silice amorfa e dalle ciclodestrine in essa incorporate.

L'utilizzo di sistemi ibridi misti, di tipo organico-inorganico, potrebbe semplificare considerevolmente il processo di produzione dei carrier su larga scala, come osservato da Zheng et al. [76]. La sintesi di silici in cui il principio attivo è inserito grazie all'interazione con l'agente template, infatti, può essere realizzata in modalità "one-pot", ovvero unendo tutti i reagenti nella sintesi iniziale, senza necessità di trattamenti post-sintesi per rimuovere il tensioattivo e successivamente incorporare il farmaco. [42] Occorre infatti tenere presente che le tecniche di impregnazione tradizionali per principi attivi liposolubili sono caratterizzate dal costo elevato, una certa complessità e un'efficacia fortemente dipendente dalla solubilità del principio attivo nel mezzo scelto. L'impregnazione con solventi organici, inoltre, non rientra negli standard imposti dalla legislazione che richiedono la presenza di tali sostanze in concentrazioni sempre più basse. [42]

2.3 Idrolisi e condensazione: reazioni e cinetica

Il metodo sol-gel è capace di produrre vetri a base ossidica con elevata purezza e a basse temperature; estremamente inferiori a quelle richieste dal processo di produzione del vetro massivo. Inoltre si tratta di un processo estremamente versatile poiché si presta alla realizzazione di fibre, film sottili, aerogel e xerogel, materiali nanoporosi per una varietà di applicazioni quali separazione di fase, rivestimenti ottici, film protettivi, membrane e catalizzatori. [43]

È possibile analizzare più in dettaglio le reazioni chimiche sulla base dei processi di idrolisi e condensazione dei precursori del materiale vetroso. Il processo sol-gel induce la trasformazione di un sol in un gel [44]. Un sol può essere definito come un colloide di particelle disperse in un solvente. Un gel, invece, è una massa rigida non solida e generalmente è costituita da un “network” che comprende una fase liquida al suo interno [45]. Le reazioni sol-gel comportano idrolisi e reazioni di condensazione di un alcossido inorganico; ciò consente ai monomeri delle particelle colloidali (sol) la conversione in un “network” (gel). Gli alcossidi sono i reagenti più utilizzati grazie alla loro facilità di idrolisi in ambiente acquoso. Nello specifico gli alcossisilani, come il tetrametossisilano $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ (**TMOS**) e il tetraetossisilano $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$ (**TEOS**), sono ampiamente utilizzati per la produzione di gel di silice. [35]

2.3.1 Idrolisi e condensazione

La reazione può essere facilmente visualizzata in **Figura 28**. Inizialmente, quando l'alcossisilano viene dissolto in acqua, avviene una reazione di idrolisi che prevede la sostituzione di un gruppo alchilico con un gruppo ossidrilico. Si forma un silanolo e una molecola di alcool, a basso peso molecolare, che si allontana dalla soluzione (**Reazione A**).

Aumenta così esponenzialmente la concentrazione dei silanoli presenti in soluzione. A questo punto possono avvenire due reazioni competitive: nel caso della **Reazione B** avviene una condensazione dei gruppi ossidrilici di due silanoli con formazione di un ponte silossanico e allontanamento di una molecola di acqua. Se, invece, la condensazione è di tipo alcolico (**Reazione C**), la reazione avviene tra un sostituente arilico/alchilico ed un ossidrilico con successiva evaporazione di una molecola di alcool. In entrambi i casi il progredire delle reazioni prevede la trasformazione del sol in un gel.

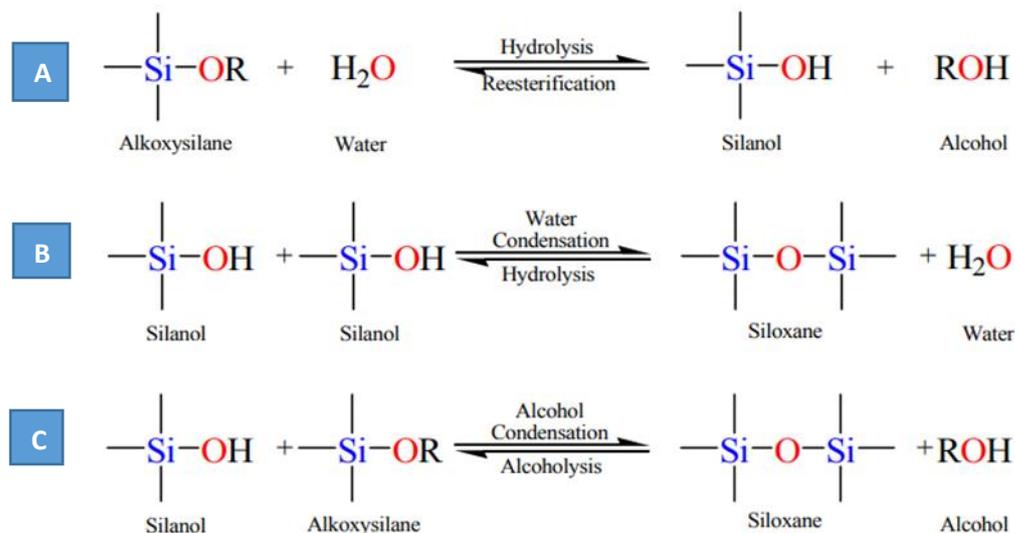


Figura 28: Schema generico di reazione del processo sol-gel degli alcossisilani: la reazione di idrolisi induce la formazione di silanoli (reazione A) i quali successivamente condensano in ponti silossanici sia tramite reazione di condensazione idrolitica (Reazione B) o alcolica (Reazione C). [43]

2.6 Influenza dell'ambiente acquoso di reazione

2.6.1 Idrolisi e condensazione in ambiente acido

I parametri che influenzano la reazione sono molteplici tra cui il rapporto tra acqua e alcossido poiché, se sbilanciato, può favorire la reazione di ri-transferificazione. A fini di tale lavoro di tesi però è necessario fare un approfondimento sull'influenza dal catalizzatore acido e basico sull'ambiente di reazione.

In ambiente acido, come spiegato dallo **Figura 29**, la prima fase dell'idrolisi è l'attacco elettrofilo del protone su un atomo di ossigeno del gruppo $-OR$ che porta alla formazione di una carica positiva (**Reazione A**). Questo attacco elettrofilo polarizza il legame $Si-O$ e ne facilita la successiva rottura. La reazione successiva, infatti, prevede un attacco nucleofilo da parte del doppietto libero di una molecola di acqua. Si assume che tale reazione generi uno stato di transizione a cinque nuclei in cui l'atomo di silicio è parzialmente legato a $-OH_2$ ed $-OHR$ (**Reazione B**). La cinetica della reazione di idrolisi è quindi del primo ordine rispetto alla concentrazione di acqua in condizioni acide. Di conseguenza, un aumento dell'acqua in rapporto con l'alcossido provoca un aumento della velocità di idrolisi.

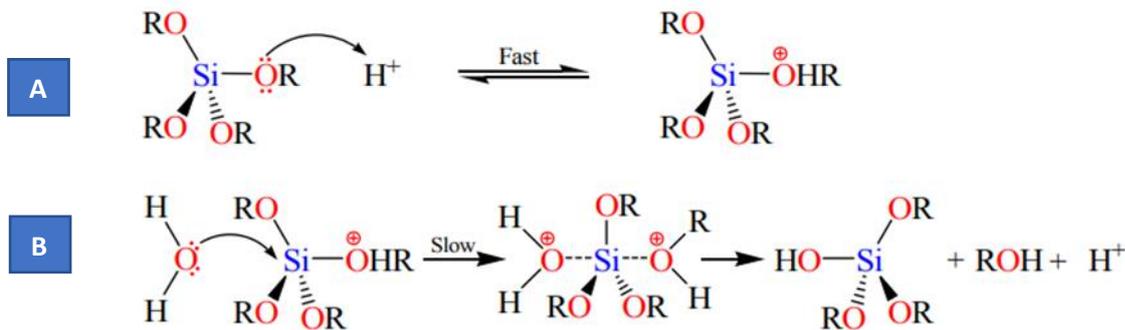


Figura 29: Schema di reazione dell'idrolisi in ambiente acido in una reazione sol-gel. [43]

Le reazioni di condensazione diventano irreversibili a pH basso perché la solubilità della silice e la sua velocità di dissoluzione sono esigue. Il meccanismo di condensazione in condizioni acide è descritto nella **Figura 30**. il primo step, con la cinetica più rapida, è l'attacco elettrofilo del protone sull'ossigeno del gruppo silanolo. L'attacco provoca la formazione di una carica positiva dell'ossigeno del silanolo. Il secondo step, invece, è la formazione di un ponte silossanico attraverso la perdita di un catione H_3O^+ a seguito della condensazione tra un silanolo protonato ed uno non protonato.

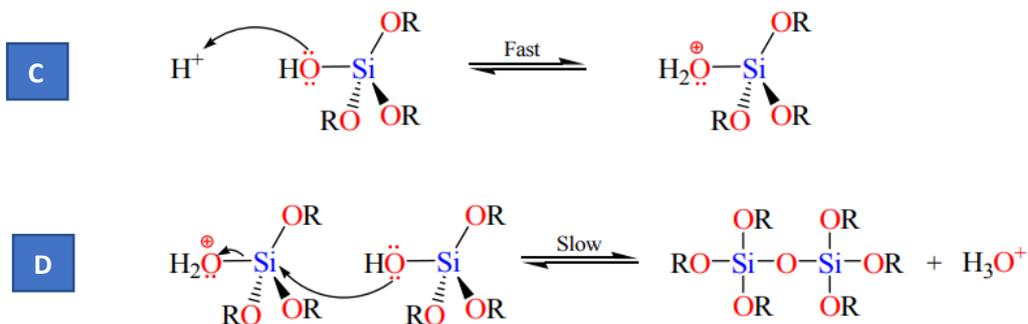


Figura 30: Schema di reazione di condensazione in ambiente acido in una reazione sol-gel [43]

2.6.2 Idrolisi e condensazione in ambiente basico

I meccanismi di idrolisi e di reazione di condensazione in ambiente basico sono illustrati nella **Figura 31** e nella **Figura 32**. Lo ione idrossido (OH^-), ad alta concentrazione in soluzione basica, funge da gruppo nucleofilo che attacca l'atomo di silicio di una singola molecola di TEOS (**Reazione A**). Il risultato di questa reazione è la formazione di un silanolo e uno ione alcossido. L'estrazione del protone dal silanolo da parte dello ione idrossido è il primo step del processo di condensazione, che porta alla formazione di uno ione deprotonato e acqua (**Reazione B**). Infine il ponte silossanico si forma attraverso l'attacco di quest'ultimo ione sull'atomo di silicio del silanolo (**Reazione C**). Questo passaggio rigenera il catalizzatore di ioni idrossido ed è, tra l'altro, il rate determined step della reazione complessiva (**Figura 34**).

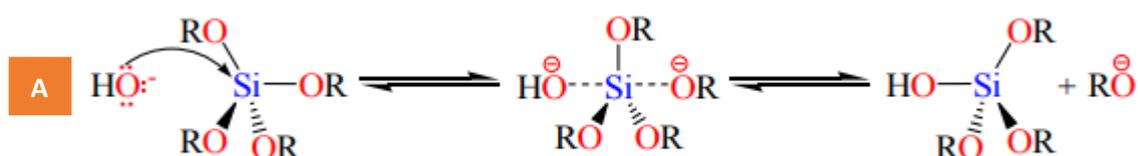
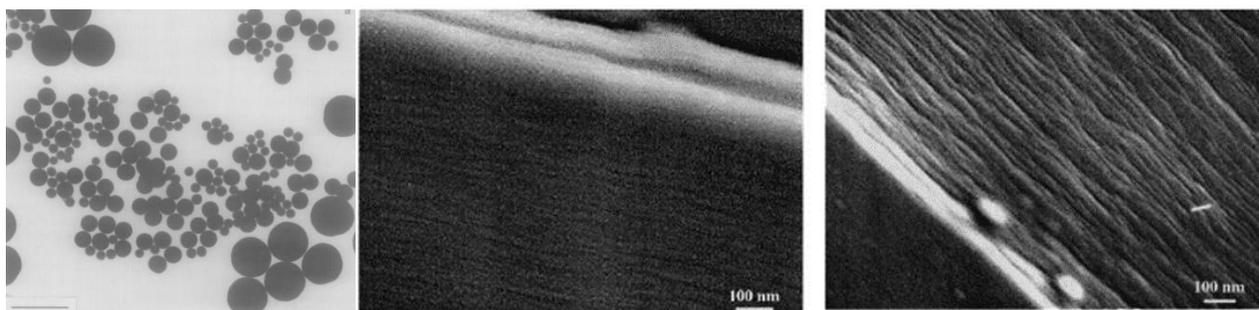


Figura 31: Schema di reazione dell'idrolisi in ambiente basico sulla reazione sol-gel. [43]



Figura 32: Schema di reazione della condensazione in ambiente basico in una reazione sol-gel [43]

In **Micrografia 1** vengono riportati due esempi di sintesi sol gel rispettivamente in ambiente basico (a sinistra) [65] e in ambiente acido (al centro e a destra). [99]



Micrografia 1: Micrografie di particelle di silice ottenute con una sintesi in ambiente basico (a sinistra) e micrografia di un film sottile ottenuto con sintesi in ambiente acido (a destra). [65]-[98]

CAPITOLO 3: VITAMINA D₃ E COMPLESSAZIONE CON CD: STATO DELL'ARTE

Come discusso nei capitoli precedenti, le **CDs** hanno la capacità di ospitare molecole idrofobiche, proteggendole e aumentandone la solubilità in soluzione acquosa. Inoltre le silici nanostrutturate presentano caratteristiche che le rendono ottimi candidati per il drug delivery. Le caratteristiche di questi sistemi risultano particolarmente rilevanti per le applicazioni topiche, in cui il principio attivo agisce solo a livello locale sul sito di interesse consentendo un adeguato dosaggio del farmaco e limitandone gli effetti collaterali [35].

L'obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di coniugare questi due materiali (CDs e silici e i loro rispettivi vantaggi) al fine di ottenere un materiale ibrido organico-inorganico per la somministrazione di vitamina D. Tale principio attivo, infatti, è efficace nel trattamento di alcune patologie della pelle, come la psoriasi a placche [46]. Il rilascio modulato sulla pelle, infatti, produce una serie di benefici per attenuare le forme lievi della patologia. I meccanismi di azione della Vitamina D implicano la modulazione della differenziazione delle cellule epidermiche e della produzione di citochine, nonché l'inibizione della proliferazione cellulare e dell'angiogenesi [46]. La vitamina D₃ (o colecalciferolo) però, è scarsamente solubile in acqua ed è facilmente soggetta a degradazione causata da fattori come luce, ossigeno, ed innalzamenti della temperatura. [47].

La solubilità del colecalciferolo in acqua come complesso con β -CD è 0,21 mg per 100 ml a 37° C. La vitamina D singola si decompone completamente a 80 ° C nell'arco di 24 ore, mentre il suo complesso con la β -CD conserva ancora il 49% della sua attività originaria anche dopo 43 giorni. [47]

3.1 La Vitamina D₃

La vitamina D₃ è stata indicata come "... una vitamina imposta all'uomo dalla civiltà." [48]. Ciò perché, per una buona salute, la vitamina D₃ può essere sintetizzata nella pelle dei mammiferi dall'azione della luce solare da un suo precursore, ovvero il 7-deidrocolesterolo. (Figura 33).

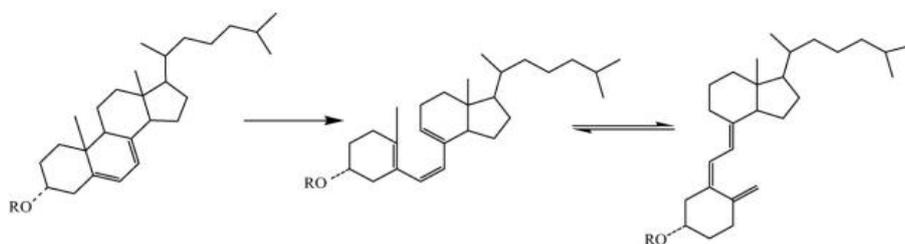


Figura 33: Rappresentazione della reazione fotochimica di produzione della vitamina D₃ (a destra), del complesso pre- vitamina D₃ (al centro), e del precursore 7-deidrocolesterolo(a sinistra). [48]

La vitamina D è un ormone steroideo, correlato al colesterolo, che attraverso un incidente storico è stata classificato appunto come vitamina. La sua scoperta può essere annoverata come un grande risultato per la medica mondiale, poiché ha permesso l'eliminazione del rachitismo. [49]

Il nome chimico della molecola definito dalla IUPAC è: (1S,3Z)-3-{2-[(1R,3aS,4E,7aR)-7a-methyl-1-[(2R)-6-methylheptan-2-yl]-octahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene}-4-methylidenecyclohexan-1-ol, ma è nota più semplicemente come colecalciferolo.

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

3.2I complessi a base di Vitamina D₃ per uso topico

Una serie di misure sperimentali, basate su diffrazione a raggi X, misure spettroscopiche e termooanalitiche, ampiamente documentate in letteratura, confermano che la vitamina D può formare complessi con le CDs [47], come mostrato in **Figura 34**.

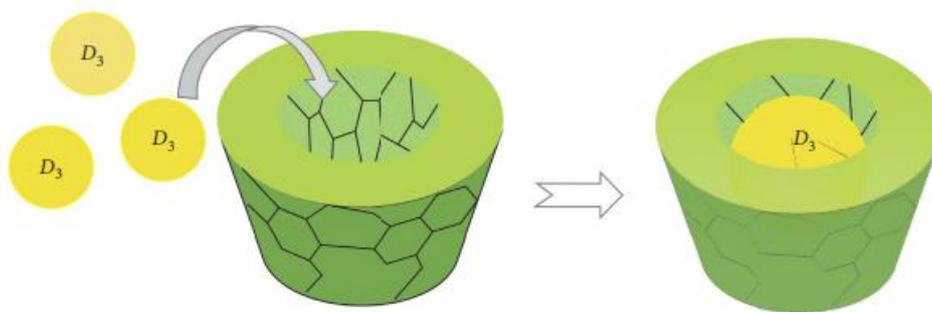


Figura 34: Rappresentazione schematica di un complesso inclusionale host:guest di ciclodestrina (in verde) e vitamina D₃ (in giallo) [99]

Il meccanismo di complessazione è legato alla presenza degli ossigeni glicosidici di collegamento delle CDs. Si formano delle reti di legami ad idrogeno o altre interazioni non covalenti con molecole ospiti appropriate, come la Vitamina D. I due cerchi ossidrilici delle CDs non sono ugualmente idrofili. Gli ossidrili secondari formano una rigida e forte barriera idrofila verso la cavità, mentre gli idrossili primari sono più flessibili, rendendo il cerchio leggermente meno idrofilo. In soluzione, questi gruppi idrossili primari (come gruppi CH_2OH) possono ruotare quasi liberamente, creando una continua apertura e chiusura porta per la cavità. [50]

Le associazioni non covalenti sono generalmente indicate come complessi d'inclusione, anche se in molti casi, specialmente nelle soluzioni, la molecola ospite ha un breve tempo medio di residenza all'interno della cavità. Nei casi in cui l'ospite è abbastanza grande rispetto alle CDs come molecole complesse tipo macrocicli, oligopeptidi o proteine, l'associazione è limitata a una parte appropriata della grande molecola. La stabilità del complesso è costante, con un equilibrio di tipo dinamico, ed è generalmente nell'intervallo di 100 - 3000 M^{-1} , in genere circa 500 M^{-1} nel caso di complessi 1:1. [50]

Seppure un'alta concentrazione di CDs può causare nefrotossicità, le CDs hanno comunque un margine relativamente ampio di sicurezza in molte delle applicazioni cutanee. Esse possono essere utilizzate sia come veicoli transdermici di farmaco, ma anche per protezione della pelle e cosmesi. La riduzione della cristallinità del farmaco derivante dalla complessazione, o più in generale dalla dispersione solida con ciclodestrine, contribuisce all'aumento della solubilità apparente del farmaco e del tasso di dissoluzione. [23] Oltre a migliorare la solubilità e la stabilità dei farmaci, attenuano alcuni effetti collaterali indesiderati associati a farmaci applicati per via cutanea. Il problema principale delle CDs è legato alla loro penetrazione attraverso la pelle; l'alta idrofilicità delle CDs idrosolubili limita il loro assorbimento attraverso il derma [50]. Gli stimolatori di penetrazione, come gli alcoli e gli acidi grassi, sono usati proprio per diminuire le proprietà barriera della cute. [23]

In generale, quindi, la CD, essendo in grado di formare dei complessi con la vitamina D, è un ottimo candidato per formare dei materiali ibridi silice-CD-vitamina D o, semplicemente silice-CD, scopo del presente lavoro di tesi.

3.3 Ibridi silice- ciclodestrina: cosa è presente in letteratura?

Dall'analisi bibliografica emerge la possibilità da parte delle **CDs** di poter auto-assemblarsi, quando l'oligosaccaride viene disperso in un solvente acquoso. I meccanismi e le morfologie di assemblaggio sono tuttavia poco note e sono stati studiati soltanto da Polarz et al. [51] e Han et al. [52]. I lavori di questi autori vengono qui, di seguito, analizzati.

L'analisi dell'assemblaggio parte dal presupposto che le **CDs**, come i saccaridi semplici, quando vengono sciolte in un solvente acquoso sono omogeneamente disperse nella soluzione (**Figura 35**).

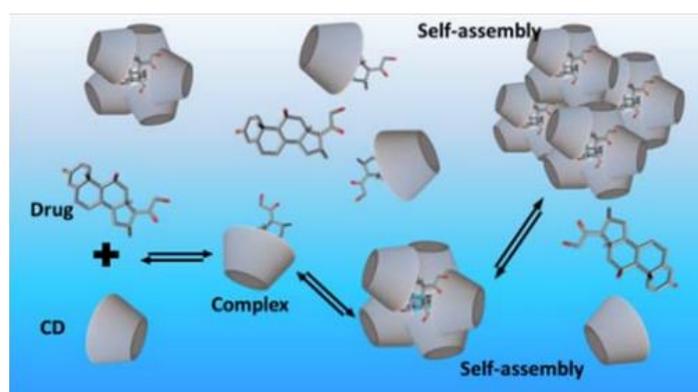


Figura 35: Rappresentazione della formazione del complesso e successivo self-assembly della ciclodestrina/ farmaco.[21]

Se si volessero utilizzare le CDs per processi di nanocasting a questo sistema, quindi, ci si aspetterebbe di ottenere (una volta eliminato il template) una porosità non controllata, randomica e bicontinua di tipo *worm-like* ed inoltre una dimensione caratteristica del poro confrontabile con quella della cavità interna della **CDs** (circa 1,5-2 nm). Polarz e collaboratori [52] hanno aggiunto che tale tipo di nanocasting genera un particolare tipo di porosità, con una dimensione intermedia tra la scala micro e meso porosa, che è stata definita come "supermicroporosità".

Poiché molteplici sono le **CDs**, molteplici possono essere i templanti per il nanocasting e, di conseguenza, le sintesi possibili (come riportato in **Tabella 2**).

Nella presente tesi, avendo come obiettivo finale quello di ottenere dei materiali ibridi per la somministrazione di vitamina D, è stato scelto di utilizzare la β -CD. Infatti questa CD ha la cavità che si presta ad accogliere la vitamina D, a livello di ingombro sterico. Inoltre, come detto, è noto da letteratura [25] che la β -CD è in grado di formare complessi con la vitamina D.

In particolare, quindi, tra le varie sintesi proposte da Polarz, ne sono state scelte due (indicate da frecce in **Tabella 2**); tali sintesi sono state entrambe eseguite, caratterizzate ed ottimizzate, come verrà ampiamente discusso nei capitoli successivi. A differenza di quanto riportato nel lavoro di Polarz, però, nel presente studio la CD non è stata eliminata tramite

calcinazione al fine di ottenere una silice nanoporosa, bensì è stata mantenuta all'interno del materiali in maniera da ottenere un ibrido nanostrutturato silice-CD.

Sample name	Amount of CD [g]	Amount of H ₂ O [g]	Amount of TMOS [g]	Casting temperature [°C]	BET surface [m ² g ⁻¹]
α-CD-silica	2	5	4	60	644
β-CD-silica	0.1	5	4	60	2
γ-CD-silica	0.7	5	4	60	–
β-MCD-silica	2	3	4	60	712
β-MCD_p-xylene-silica	2.16	3	4	60	596
α-HPCD-silica	2	2	4	60	832
β-HPCD-silica (1)	2	2	4	60	817
β-HPCD-silica (2)	2	3	4	60	873
γ-HPCD-silica	2	2	4	60	763

Tabella 2: Tabella riportante reagenti, temperatura di sintesi e misure di area superficiali su differenti silici nanostrutturate ottenute usando le CDs come templanti. [52]

In base a quanto riportato nel lavoro di Polarz, il modello di assemblaggio delle CD può essere studiato in prima approssimazione tramite il metodo CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*), un metodo semiempirico che permette di studiare le distribuzioni di potenziale di una molecola. Dall'analisi si nota come la CD possieda un momento di quadrupolo che alterna zone positive (cavità idrofobica) e negative (parte idrofiliche) (**Figura 36 A**).

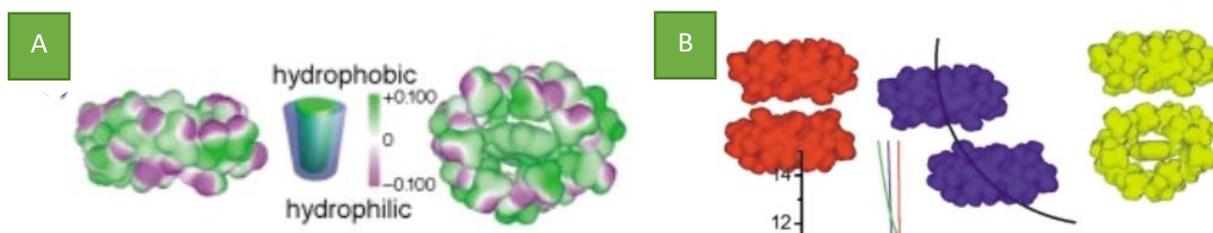


Figura 36 : Distribuzione di potenziale tra l'interno ed esterno della molecola di CD (a sinistra) e tre possibili modi di assemblaggio con disposizione parallela, sfalsata e perpendicolare degli anelli (a destra). [51]

Le geometrie proposte in base al metodo CNDO sono le seguenti (rappresentate in **Figura 36B**):

1. Idealmente parallela (in rosso)
2. Parallela sfalsata (in viola)
3. Orientamento perpendicolare degli anelli (in verde) (in questo caso le interazioni sono puramente repulsive)

Confrontando le relative curve di Condon-Morse delle tre interazioni [51], si osserva come il minimo di energia sia ottenuto dalla configurazione **1**, ovvero quella parallela. Tale configurazione può generare geometrie di assemblaggio della CD e della silice come quella riportata in **Figura 37**. Le energie d'interazione sono basse. Tuttavia anche per le geometrie **2** e **3**, non si può escludere che tale configurazione sia possibile. Lo studio in esame, però non tiene in considerazione le variazioni causate dal solvente, gli effetti entropici, nonché l'influenza dell'idratazione e della matrice acquosa.[51]

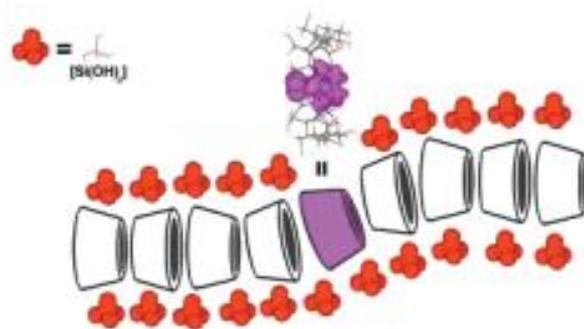


Figura 37: Possibile schema di assemblaggio di silice e CD. [51]

3.4 Criticità nel processo di sintesi

L'utilizzo delle CDs come building-block presenta i seguenti vantaggi. Contrariamente ai tensioattivi più comunemente utilizzati, le **CDs** non penetrano nelle pareti di silice, quindi non creano ulteriore microporosità che indebolirebbe il materiale [51]. Un altro vantaggio, non indifferente, è la totale biocompatibilità. Entro certi limiti, è possibile prevedere, quindi, la sostituzione delle CDs agli agenti building-block tradizionali come i surfattanti di tipo cationico quali il **CTAB** (citotossico per i tessuti umani e nocivo per l'ambiente). [53]

Seppur l'impiego delle **CDs** come templati di materiali porosi, sia concettualmente un campo promettente, nella pratica la realizzazione di tali sintesi presenta notevoli criticità. Prima fra tutte la possibilità di ottenere delle particelle effettuando una sintesi in ambiente acido. Seguendo le procedure di sintesi riportate da Polarz [51] e Han [52], infatti, il processo di gelificazione per bassi valori di pH porta alla formazione di un materiale bulk, ben lontano dalla forma di particelle sferiche in genere ricercata per applicazioni di drug delivery.

L'ottenimento di materiali massivi potrebbe essere spiegato alla luce delle cinetiche di gelificazione. Nonostante siano molteplici i parametri da monitorare, se si tiene conto soltanto del catalizzatore, si nota come l'ambiente di reazione acido, secondo la **Figura 38** e la **Tabella 3**, favorisca la condensazione. È favorita quindi la formazione di un materiale massivo. Sorge spontaneo quindi chiedersi come la presenza di piccoli domini di CD dispersi in una fase massiva di silice possa mediare lo scambio di sostanze tra la CD e l'ambiente esterno.

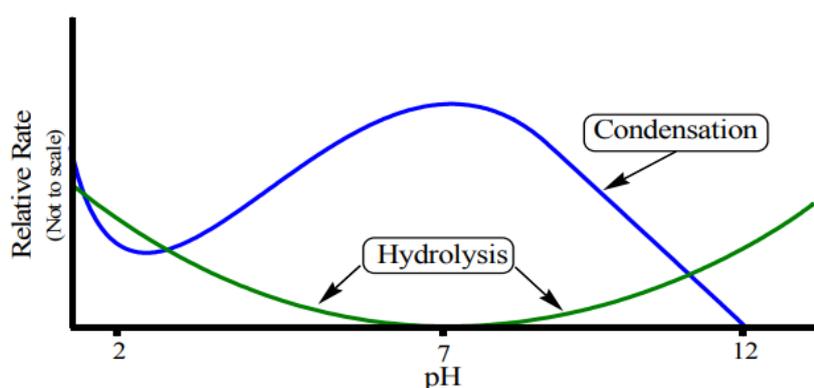


Figura 38: Grafico nel quale viene valutata la velocità relativa di idrolisi e condensazione in funzione del pH: la curva verde rappresenta la velocità di idrolisi, quella blu invece relativa alla condensazione. [43]

System	Catalysts	Comments
Silica	HCl	slow hydrolysis relative to the condensation reaction; small pores
	NH ₃ OH	rapid hydrolysis relative to the condensation reaction; large pores
Silica	HCl	high bulk density; no particles observed
	NH ₄ OH	low bulk density; spherical particles observed
Silica	catalyst used but not specified	the rate of gelation is proportional to the OH concentration above pH = 2, and proportional to the H ⁺ concentration below pH = 2
Silica	HCl	accelerated hydrolysis and retarded polymerization
	NH ₄ OH	"limited hydrolysis"
	NH ₄ Cl	"postponed hydrolysis" followed by rapid gelation
Alumina	16 organic and inorganic acids	evaluated peptizing effects of acids on slurry of Al(OH) ₃

Tabella 3: Tabella riassuntiva dell'incidenza del catalizzatore sulla morfologia del materiale poroso. [54]

Un altro problema relativo alla sintesi con β -CD, riportata nel lavoro di Polarz, è legato alla percentuale di acqua presente tra i reagenti e, di conseguenza, alla quantità di β -CD incorporabile. Per le condizioni di sintesi riportate in **Tabella 2**, tenendo conto delle quantità di reagenti e ipotizzando che tutto il TMOS si converta in silice e tutta la CD venga incorporata, si stima che il contenuto di CD nel materiale ibrido risultate sia intorno al 6% in massa. Confrontando quindi la concentrazione della CD nell'acqua ci si rende conto che nelle condizioni di sintesi di Polarz il valore è molto prossimo al limite di solubilità (18,5 g/l in condizioni di pressione e temperatura ambiente). In tale sintesi, quindi, non è possibile incrementare il contenuto di CD.

Uno degli obiettivi del presente lavoro di tesi è, quindi, quello di aumentare la quantità di CD incorporata, così da ottenere degli ibridi con un contenuto di CD significativo (intorno al 50% in massa) e comparabile a quello di sistemi ibridi di riferimento ottenuti con il CTAB, riportati nelle tesi magistrali di Daniele Arduino [55] e di Fabio Giudice [56].

Pertanto si sono seguite le seguenti strategie:

- Aumentare la quantità di acqua nella sintesi, così da poter aumentare la quantità di β -CD
- Sostituire la β -CD con una CD con solubilità maggiore; in particolar modo, è stata scelta la β -mCD.

L'analisi dettagliata di tali approcci e i conseguenti risultati sono riportati in dettaglio nei capitoli seguenti.

CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI

4.1 Reagenti e materiali

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

- Acqua demineralizzata di grado 3 tramite sistema RO CUBIC 30/d
- Acetone (C₃H₆O), liquido limpido, Sigma-Aldrich®
- Acetonitrile (C₂H₃N), liquido limpido, Merck Life Science ®
- Beta-ciclodestrina (C₄₂H₇₀O₃₅), polvere bianca, Merck Life Science®
- Beta metilciclodestrina(C₅₄H₉₄O₃₅) polvere bianca
- Etanolo assoluto (C₂H₅OH/C₂H₆O), liquido incolore, Reagente per analisi, EMSURE®.
- Acido cloridrico (HCl), liquido giallo chiaro, Sigma-Aldrich ®.
- Tetrametossisilano (TMOS)(C₄H₁₂O₄Si), liquido incolore Merck Life Science ®.
- Tetraetossisilano (TEOS) (SiC₈H₂₀O₄), concentrazione ≥99.995%, Sigma-Aldrich®.
- Etanolo (EtOH), (C₂H₅OH), Fluka®.
- Idrossido di sodio (NaOH), Sigma-Aldrich®
- Cloruro di sodio (NaCl), ≥99.9%, polvere bianca, Sigma-Aldrich®
- Vitamina D₃, colecalciferolo, (C₂₇H₄₄O), polvere bianca, Merck®
- Bromuro di potassio (KBr), polvere bianca Sigma-Aldrich®

4.2 Sintesi

Per la realizzazione delle sintesi relative agli ibridi CD e silice ci si è avvalsi delle poche procedure di sintesi riportate in letteratura. Le principali fonti sono stati i lavori di Sebastian Polarz [51] e Bao-Hang Han [52], apportando delle opportune modifiche.

Tramite tali procedure, però, sono stati ottenuti unicamente dei vetri massivi. Al fine di ottenere delle particelle sono state investigate altre tipologie di sintesi sol-gel più tradizionali e ampiamente studiate in letteratura (vedi Stöber [56] -[65]). La strategia principale è stata quella di inserire le molecole di oligosaccaride all'interno della soluzione di sintesi in modo tale che, durante i processi di idrolisi e condensazione, esse potessero precipitare insieme alla silice. I vari processi di sintesi verranno descritti in dettaglio nei capitoli successivi.

4.3 Tecniche di caratterizzazione

Una volta ottenuti i campioni, è stato necessario avvalersi di molteplici strategie di caratterizzazione chimico-fisica per valutare le proprietà degli ibridi ottenuti. È possibile analizzare, quindi, nel dettaglio tutti i metodi impiegati.

4.3.1 Termogravimetria (TGA /DSC)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica di analisi quantitativa che permette di misurare la variazione di massa di un campione in funzione della temperatura e/o del tempo.

È possibile, quando le temperature di decomposizione sono sufficientemente separate tra di loro, associare le variazioni di peso alle singole sostanze presenti nel campione. Nel caso

specifico le molecole biologiche hanno una temperatura di degradazione molto più bassa rispetto a quella del vetro di silice, per cui è stato possibile evidenziare la perdita di oligosaccaride, vitamina D e/o acqua rispetto al vetro massivo.

Lo strumento restituisce due spettri differenti, a seconda se l'analisi è condotta in TGA o DSC.

TGA (termogravimetric analysis)

Il termogramma caratteristico è un grafico cartesiano che rappresenta la variazione percentuale della massa del campione in funzione della temperatura. La variazione di peso percentuale è calcolata con la seguente equazione:

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

Lo strumento restituisce due tipi di segnali: integrale (quello descritto in precedenza) ed uno in derivata (derivata del segnale in TGA).

DSC (Differential scanning calorimeter)

Tale tipo di misura invece si basa sulla valutazione dello scambio di calore del campione in esame rispetto ad un crogiolo standard di riferimento. Il termogramma restituito dal software rappresenta la variazione del segnale in funzione della temperatura. In particolare le *variazioni di pendenza* del grafico sono associate a variazioni di calore specifico del materiale (o eventuale transizione vetrosa), mentre i *picchi* e le *valli* rappresentano trasformazioni del primo ordine per la struttura cristallina (fusione, degradazione e/o cristallizzazione).

Lo strumento utilizzato è *STA Linsesis*. All'interno di un crogiolino in allumina vengono posti circa 10 mg di campione. Viene impostata una rampa di riscaldamento di 20°C/min fino a 30°C, poi 10°C/min da 30°C fino al raggiungimento di 800°C. La misura viene effettuata in aria. Una volta terminata la misura si raccolgono i prodotti incombusti ancora presenti nel crogiolino; la valutazione di aspetto e colore di questi può fornire importanti informazioni sul processo di degradazione del campione caratterizzato.

4.3.2 Diffrazione a raggi X (XRD)

La **diffrazione a raggi X** (acronimo **XRD**) è una tecnica analitica rapida principalmente usata per l'identificazione delle fasi di un materiale cristallino. Essa fornisce informazioni sulla dimensione dell'unità di cella. Il materiale che viene analizzato deve essere finemente macinato e omogeneizzato

La tecnica si basa sull'interferenza costruttiva di una radiazione a raggi X monocromatica con un campione cristallino.

I raggi X vengono diretti sul campione e inviati su un detector. Ruotando il campione e il rivelatore simultaneamente, viene registrata l'intensità dei raggi X riflessi in funzione dell'angolo 2θ (**Figura 39**).

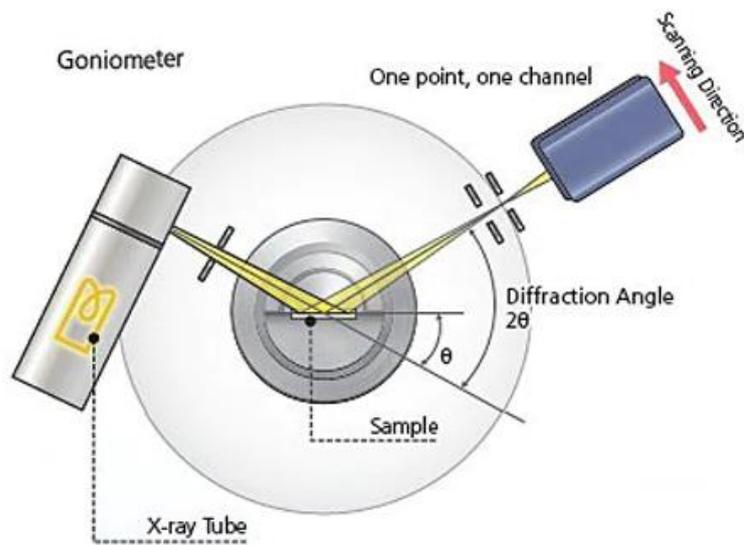


Figura 39: Schema di funzionamento di XRD. [57]

Quando la geometria dei raggi X incidenti soddisfa la *legge di Bragg* ($n \lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta$) si verifica un'*interferenza costruttiva* (**Figura 40**) ed un picco di intensità. Un rivelatore registra ed elabora questo segnale e lo registra sotto forma di uno spettro.

Nella legge di Bragg d_{hkl} è la distanza tra piani atomici paralleli del cristallo, (hkl) sono gli indici di Miller per un piano ortogonale all'asse, λ la lunghezza d'onda del raggio incidente, n è un numero intero e θ è l'angolo con cui il raggio incide sul materiale.

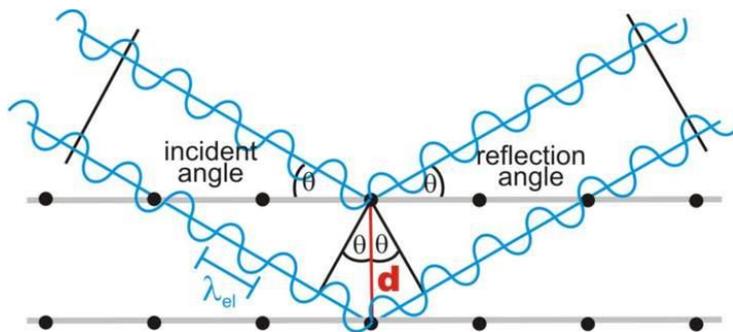


Figura 40: Rappresentazione interazione tra raggi X e piani cristallini. [58]

In conseguenza di specifiche relazioni che si stabiliscono tra due o più onde diffuse, è possibile, quindi, calcolare la distanza tra piani atomici paralleli del cristallo (d_{hkl}). Affinché la *legge di Bragg* sia valida è necessario che, tra le onde diffuse, la differenza di percorso ottico in seguito alla diffrazione sia un multiplo intero della lunghezza d'onda.

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

lungo raggio, mentre l'analisi ad alti angoli verifica se la matrice del materiale sia *amorfa* o *cristallina*.

Nello specifico le misure ad alti angoli, ai fini delle analisi, sono state necessarie per identificare i picchi cristallini e valutare la possibile amorfizzazione delle componenti organiche all'interno del vetro. Le misure a bassi angoli sono state usate per valutare la presenza o meno di un ordine a lungo raggio.

Le caratteristiche di scansione in termini di range angolare, step angolare, durata di acquisizione e filtri posizionati sono schematizzate nella **Tabella 4**.

	Analisi a bassi angoli	Analisi ad alti angoli
Range angolare	0,7 -10°	5-60°
Step angolare	0.0131°	0.0131°
Durata di acquisizione	60 min	10 min
Filtro anti-divergenza	1/32	1/4
Filtro antiscatter	1/32	1/2

Tabella 4: Parametri XRD dello strumento sia per bassi angoli (a sinistra) che ad alti angoli (a destra).

4.3.3 Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (più semplicemente **FTIR**) è un'analisi non distruttiva che sfrutta l'interazione tra fotoni infrarossi e il campione in esame per ottenere informazioni sui gruppi funzionali caratteristici e i legami chimici presenti.

La spettroscopia FTIR è stata condotta utilizzando lo spettrofotometro *Equinox 55 Bruker*. Gli spettri risultanti sono riportati come valori di assorbanza in funzione del numero d'onda. Per procedere all'analisi il campione viene macinato mediante un pestello e collocato in una pressa idraulica (alla pressione di circa 3 mbar per 10 secondi), per ottenere delle pastiglie molto sottili. Le pastiglie vengono alloggiare in una lamina d'oro forata. Poi il tutto viene posto in una cella in quarzo sulla cui estremità sono presenti due finestre in KBr (trasparente all'IR). Nella cella inoltre è disponibile una connessione ad una linea a vuoto grazie alla quale è possibile degasare il campione (fino ad una pressione residua di 0,1 Pa). Per ottenere una trasparenza sufficiente del campione alla radiazione infrarossa, è possibile aggiungere della polvere di KBr durante la fase di macinazione. Il KBr, essendo un composto ionico, è trasparente all'infrarosso e permette di diluire il campione diminuendone l'intensità di assorbimento e senza alterare le frequenze di vibrazione.

4.3.4 Spettroscopia UV/visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica di caratterizzazione che fornisce informazioni di tipo qualitativo (basate sulle lunghezze d'onda specifiche di assorbimento) e quantitativa tramite l'applicazione della legge di Lambert-Beer.

Una molecola allo stato fondamentale possiede una configurazione elettronica in cui tutti gli elettroni occupano gli orbitali molecolari a più bassa energia. La *radiazione UV* (con lunghezza d'onda compresa tra 180 nm e 400 nm) e quella *visibile* (con lunghezza d'onda compresa tra 400 nm e 780 nm) hanno sufficiente energia per indurre una transizione elettronica nella molecola, promuovendo un elettrone da un orbitale molecolare ad un altro a più alta energia (**Figura 41**).

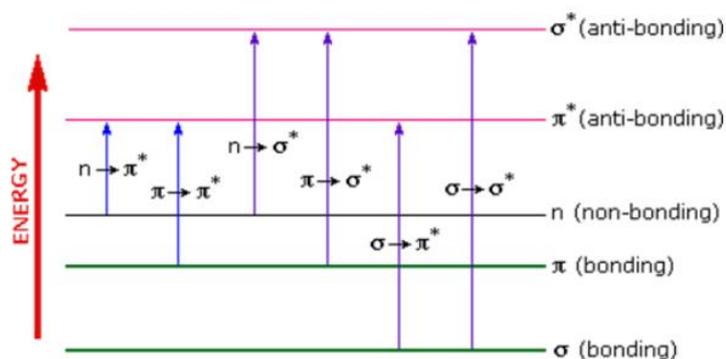


FIGURA 41: Rappresentazione schematica transizioni energetiche di un elettrone. [59]

Le transizioni elettroniche possibili sono:

n→**π***: promozione di un elettrone n di non legame ad un orbitale molecolare di antilegame π*

π→**π***: promozione di un elettrone da un orbitale molecolare di legame ad uno di antilegame.

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

Il fenomeno di assorbimento viene sfruttato per valutare la concentrazione della specie assorbente in una soluzione diluita attraverso la legge di Lambert-Beer.

La formulazione matematica può essere così riassunta dalla seguente formula:

$$A = \frac{I}{I_0} = \epsilon c l$$

I parametri che figurano nell'equazione sono: **A** è l'assorbanza misurata (adimensionale), **I₀** l'intensità della luce incidente a una determinata lunghezza d'onda, **I** l'intensità trasmessa, **ε** il coefficiente di assorbimento (L mol⁻¹ cm⁻¹), **c** la concentrazione della soluzione (mol L⁻¹), **l** il cammino ottico (cm).

Lo strumento utilizzato è lo spettrofotometro *Lambda 25 Perkin Elmer*. Tutte le cuvette (contenitori) utilizzate sono in quarzo e con un percorso ottico di 1 cm (**Figura 42**). Lo strumento è stato utilizzato per analisi qualitative per valutare la presenza di specie chimiche

assorbenti nelle soluzioni in cui sono stati immersi i campioni. Tutti i test sono stati ripetuti tre volte: la curva totale viene costruita come media ponderata delle tre prove.

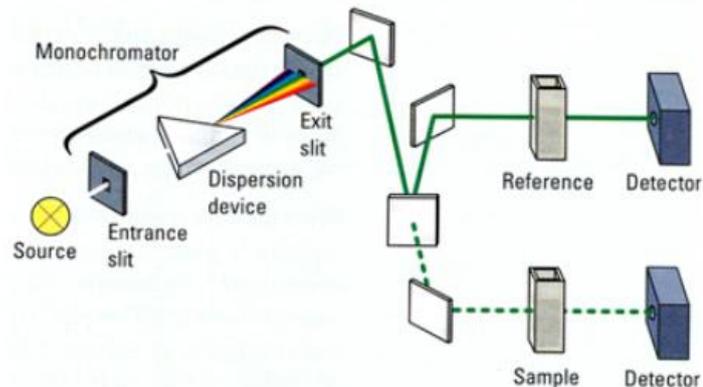


Figura 42: Rappresentazione schematica strumento. [59]

4.3.5 FESEM & EDS

La micrografia elettronica a scansione ad emissione di campo (acronimo **FE-SEM**) è un metodo di indagine micrografica non distruttivo ad alti ingrandimenti. Al fine del presente studio tale tecnica è stata utilizzata per valutare la morfologia dei campioni.

La micrografia elettronica sfrutta come sonda di indagine superficiale un fascio collimato di elettroni. Le risoluzioni ottenute sono molto più elevate rispetto alla micrografia ottica, in quanto gli elettroni, per la dualità onda-particella, si muovono con una lunghezza d'onda molto più piccola (10^{-9} m) rispetto alla luce visibile.

Lo strumento utilizzato è il *FESEM Merlin ZEISS*. Prima dell'analisi i campioni sono stati metallizzati con Pt.

CAPITOLO 5: SINTESI

Le sintesi dei materiali ibridi, realizzate durante il lavoro di tesi, sono state categorizzate in base all'ambiente di reazione (acido o basico). Il pH della soluzione di partenza influenza significativamente le cinetiche di idrolisi e condensazione del precursore siliceo fungendo da fattore determinante per la dimensione, la forma e la tipologia di vetro ottenuto.

Nel presente capitolo, quindi, vengono discussi in maniera approfondita tre tipi di sintesi (due in ambiente acido e una in ambiente basico), raggruppate secondo l'ambiente di reazione e/o il trattamento specifico. Per confronto vengono riportate anche le analisi dei singoli componenti (es. β -CD, β -mCD). Infine, per concludere il capitolo, vengono presentate alcune prove preliminari di incorporazione della vitamina D₃ in CD tramite impregnazione con CO₂ supercritica.

5.1 Caratterizzazione dei building block organici

Poiché tutte le sintesi in oggetto si prefiggono di ottenere dei sistemi ibridi e complessi, preliminarmente è stato necessario realizzare delle singole caratterizzazioni dei costituenti base come β -CD e β -mCD. La valutazione dei picchi caratteristici degli spettri FTIR e XRD e la perdita di massa nelle misure in TGA hanno permesso di costruire un "bianco", ovvero uno spettro di riferimento dei singoli sistemi monocomponente. Il confronto delle sintesi con i relativi "bianchi", consente di valutare la variazione delle caratteristiche del singolo sistema ibrido.

5.1.1 β -ciclodestrina (β -CD) e β -metil-ciclodestrina (β -mCD)

TGA

La **Figura 43** mostra il confronto tra le misure in TGA condotte in aria su campioni singoli di β -CD e β -mCD. Tra 0 e 150°C la misura mostra, in entrambi i casi, una perdita di massa dovuta alla perdita di acqua adsorbita. Successivamente si osserva una degradazione termica dell'oligosaccaride corrispondente ad una brusca perdita di massa attorno a 300°C. Si verifica, infine, un'ulteriore perdita di massa di minore entità su un range di temperature più ampio (350-580°C) imputabile all'ossidazione del materiale. I risultati ottenuti per entrambi i materiali, sono coerenti ai risultati presenti in letteratura, con un unico step di degradazione seguito da ossidazione, come conferma la misura condotta da Trotta e al. [60] presentata in **Figura 44**.

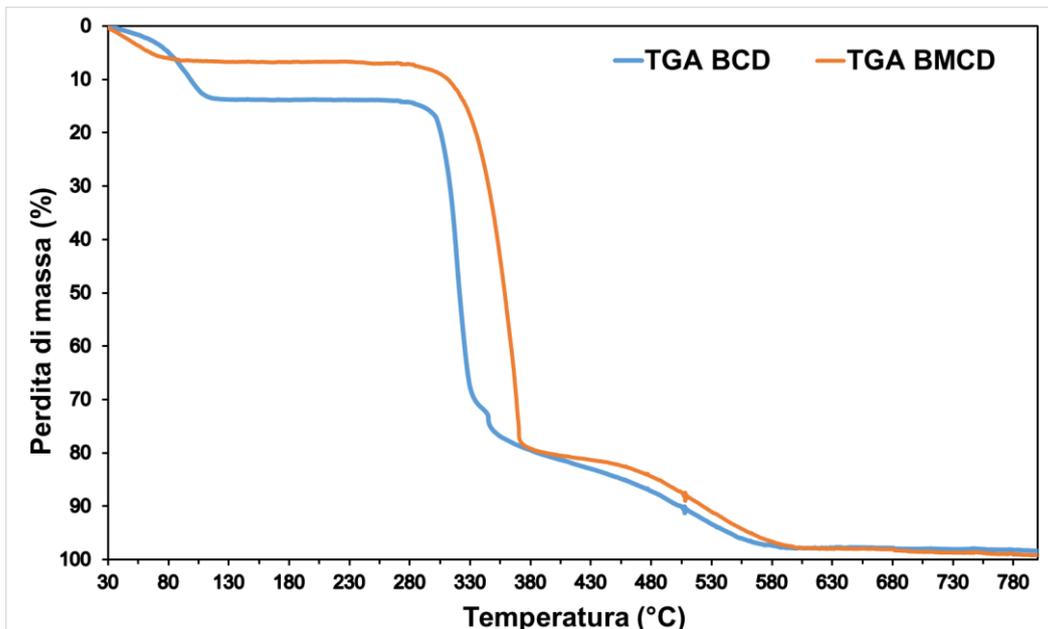


Figura 43: Termogravigramma a confronto tra di β -CD (curva in azzurro) e β -MCD (curva in arancione). Si nota una combustione totale del campione organico inserito, con la perdita di massa del 10,0 % circa fino a 200 °C, e dalla temperatura di 300°C una perdita di massa totale.

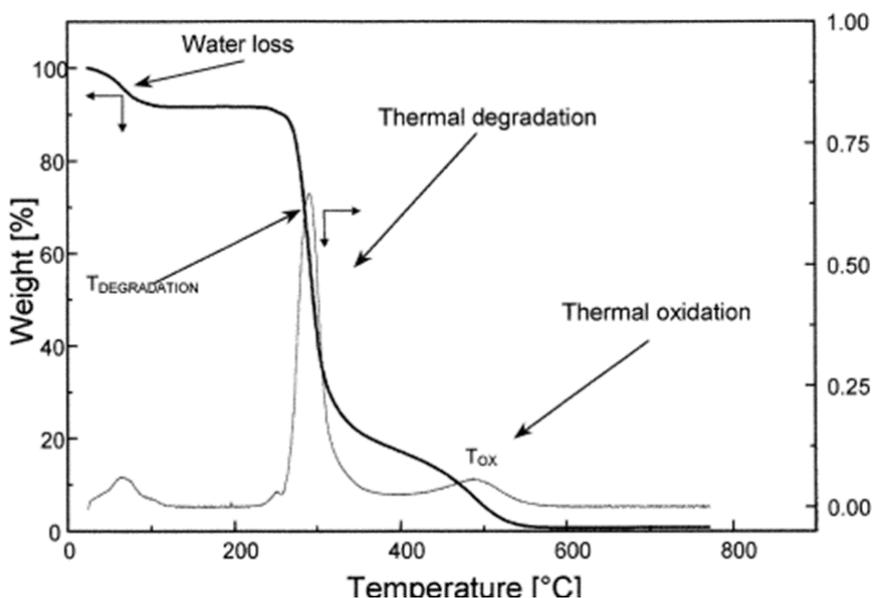


Figura 44: Termogravigramma relativo alla perdita di massa di una CD presente nel paper di Trotta e al. [60]

XRD

Dal confronto tra i due spettri caratteristici presenti in **Figura 45** emerge una sostanziale differenza tra i due campioni in esame. La β -CD presenta una struttura cristallina, con dei picchi caratteristici a valori di 2θ pari a 9- 10,6- 12,5 - 17- 19,6, coerenti con i valori presenti in letteratura riportati in **Figura 46** [61] e **Figura 47** [62]. La β -mCD, invece, presenta una struttura amorfa con un alone diffuso nel range analizzato.

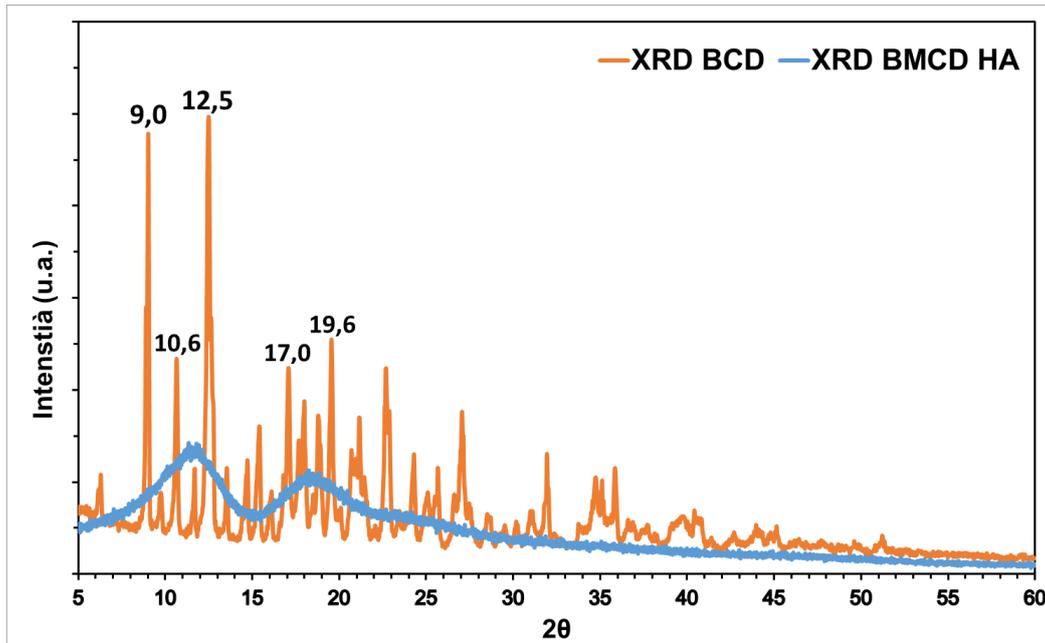


Figura 45: Due spettri caratteristici XRD ad alti angoli dei campioni β -CD (curva in arancione) e β -mCD (curva in azzurro).

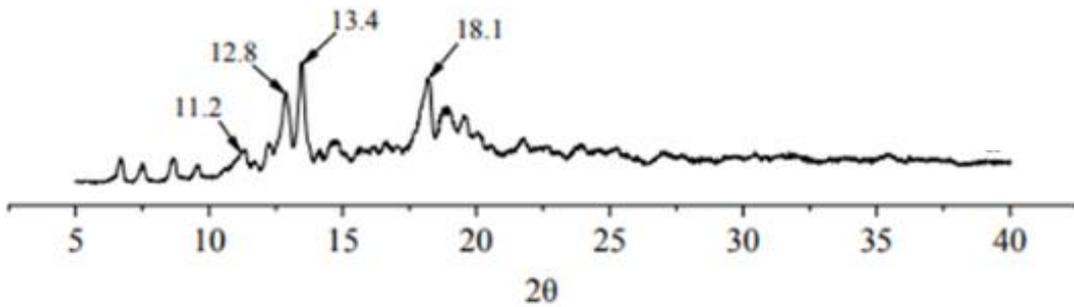


Figura 46: Spettro XRD della singola β -CD. [61]

β -Cyclodextrin	Vitamin D ₃	β -Cyclodextrin vitamin D ₃ complex
2.0	2.0	2.0
4.7	5.1	6.7
9.0	6.8	11.7
10.6	8.9	17.8
12.3	13.7	
15.3	15.8	
16.0	18.0	
19.6		

Figura 47: Tabella riassuntiva dei picchi caratteristici all’XRD (valori di 2θ) per la β -CD, la vitamina D₃ ed il complesso di inclusione CD/Vit-D. [62]

L’analisi invece del confronto degli spettri XRD caratteristici a bassi angoli dei campioni in esame conferma l’assenza di ordine a lungo raggio (Figura 48).

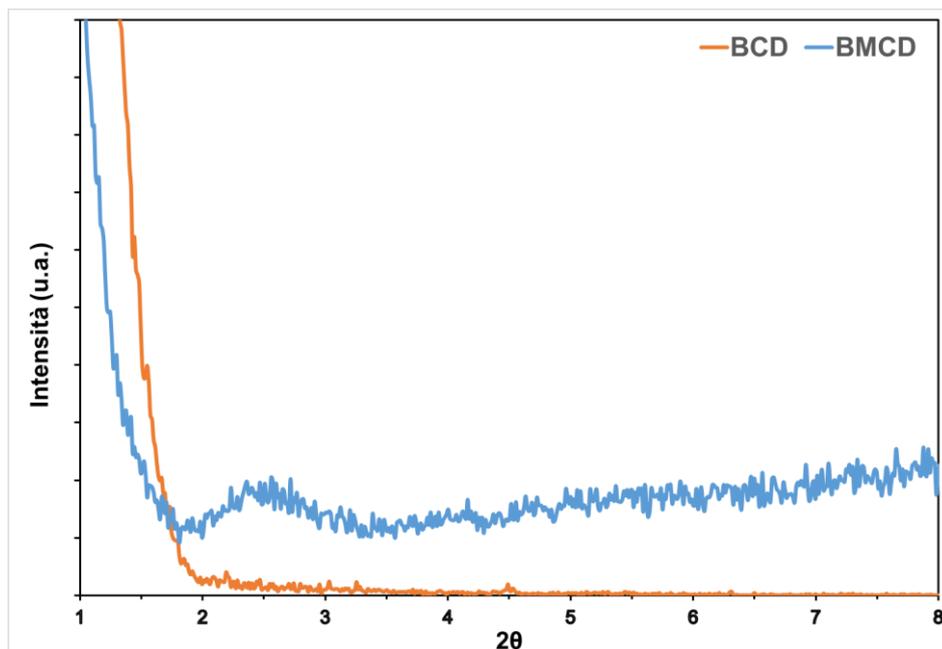


FIGURA 48: Due spettri caratteristici XRD a bassi angoli dei campioni β -CD (curva in arancione) e β -mCD (curva in azzurro).

FTIR

La **Figura 49** mostra il confronto dello spettro FTIR condotto su campioni singoli di β -CD e β -mCD in vuoto. Le frequenze caratteristiche per β -CD, secondo lo studio di Kavirajaa Pandian e al. [63] (**Figura 50**) sono osservate per numeri d'onda pari a 3370 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} , 1029 cm^{-1} e corrispondono rispettivamente alle vibrazioni di stretching dei gruppi [-OH], [-CH₂], [C-C] ed alle vibrazioni del piegamento del legame [-OH].

Sussiste una differenza principale tra la β -CD e β -mCD in un range di numeri d'onda attorno a 2900 cm^{-1} : la prima infatti possiede un picco singolo, mentre la seconda invece possiede un picco doppio, legato alla presenza dei nuovi gruppi funzionali -CH₃.

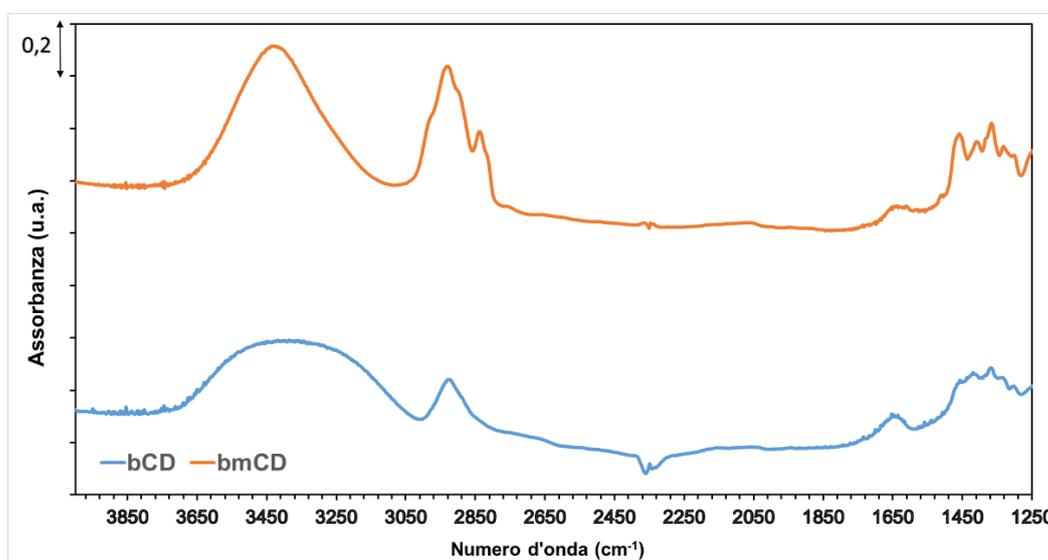


Figura 49: Curve caratteristiche dello spettro FTIR dei campioni β -CD in vuoto (curva azzurra) e del campione β -mCD in vuoto (curva in arancione).

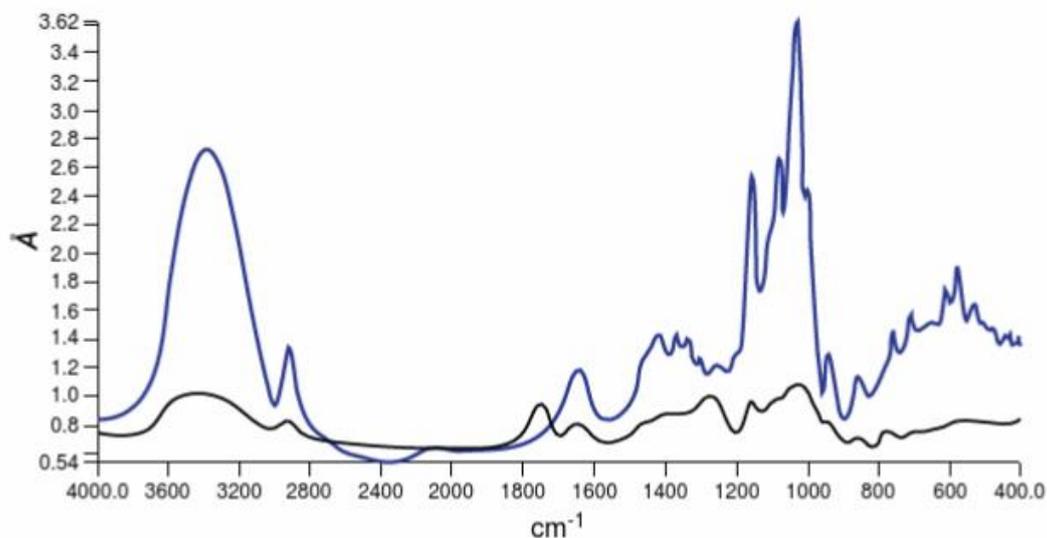


Figura 50: Spettro caratteristico dello spettro FTIR del campione di β -CD (curva blu). [63]

5.2 SINTESI IN AMBIENTE ACIDO

5.2.1 CDS1 (β -Ciclodestrina-Silice 1° sintesi)

La prima sintesi effettuata è stata eseguita con β -CD seguendo esattamente la procedura indicata nel lavoro di Polarz [51] per valutare la fattibilità dell'incorporazione della CD all'interno della silice.

Procedure di sintesi

Le quantità di reagenti utilizzate sono riportate in **Tabella 5**. Il metodo di preparazione prevede la dissoluzione di 0,1 g di β -CD in 5,0 g di acqua. La soluzione è stata sottoposta a mescolamento su piastra con velocità di agitazione di (circa) 300 rpm per 10 minuti. Successivamente sono state aggiunte 2/3 gocce di HCl fino ad un pH compreso tra 1 e 2. Dopo tale misura sono stati aggiunti 3,9 ml TMOS con inserimento goccia a goccia. È stata quindi interrotta l'agitazione e la soluzione è stata mantenuta su piastra a 60°C per 2 ore. Il tutto è poi trasferito in stufa a 60°C per 23 ore (fase di invecchiamento). Dopo l'invecchiamento, è stato estratto il gel dalla stufa, macinato al mortaio e sottoposto alla caratterizzazione.

β -CD	H ₂ O	HCl	TMOS
0,1 g	5,0 g	2/3 gocce	3,9 ml

Tabella 5: Quantità in volume e/o in massa dei reagenti impiegati per la sintesi del campione CDS1.

La massa finale del vetro ottenuto pari a 1,8 g.

Prima della macinazione, dall'analisi visiva è emerso qualche cristallo dal colore tipicamente bruno indicativo di una probabile caramellizzazione dell'oligosaccaride dentro il vetro durante la fase di invecchiamento, evidente nell'immagine a destra nella **Figura 51**.

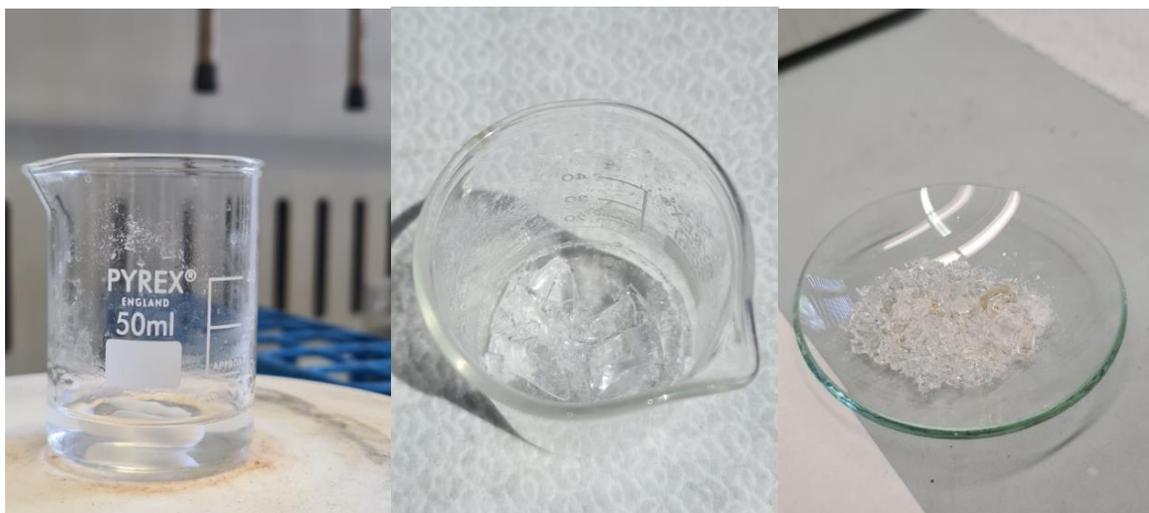


Figura 51: Tre foto delle fasi salienti della sintesi del campione CDS1: a sinistra la β -CD in soluzione acquosa subito dopo l'aggiunta del TMOS, al centro la sintesi pre-ageing, mentre a destra la sintesi post trattamento termico.

TGA

L'analisi termica sul campione **CDS1** mette in evidenza una differenza abbastanza marcata del comportamento termico dei due costituenti: il vetro di silice infatti è resistente alla temperatura nel range analizzato, mentre la CD ha una temperatura di degradazione di 80 °C. Dal termogravigramma in **Figura 52** è possibile valutare che nel range compreso tra la temperatura ambiente e 150°C, il sistema perde circa un 10,9 % della massa, fenomeno attribuibile alla perdita d'acqua contenuta nel campione. Inoltre nel range compreso tra 150 e 800°C si osserva una perdita di circa il 16,5 % della massa totale, attribuibile alla degradazione e volatilizzazione della CD.

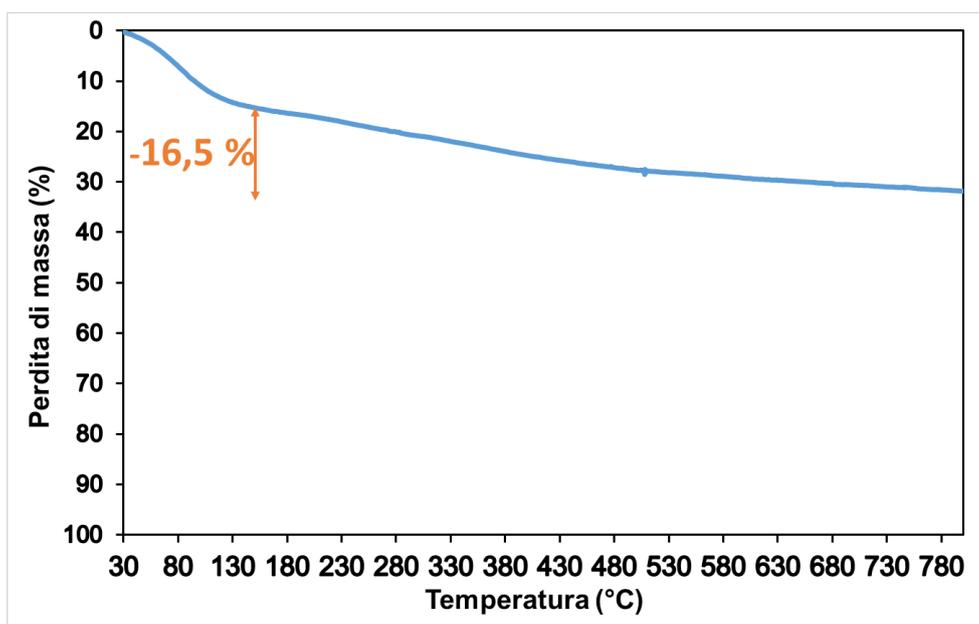


Figura 52: Termogravigramma in TGA del campione CDS1 in un range compreso tra 30 e 800°C.

XRD

Nelle **Figure 53** e **Figura 54** è possibile analizzare lo spettro caratteristico ai raggi X del campione **CDS1**, rispettivamente ad alti angoli e a bassi angoli. La misura ad alti angoli mostra uno scattering incoerente in tutto il range di misura. Ciò suggerisce la presenza di un materiale amorfo e l'assenza di una fase cristallina di CD.

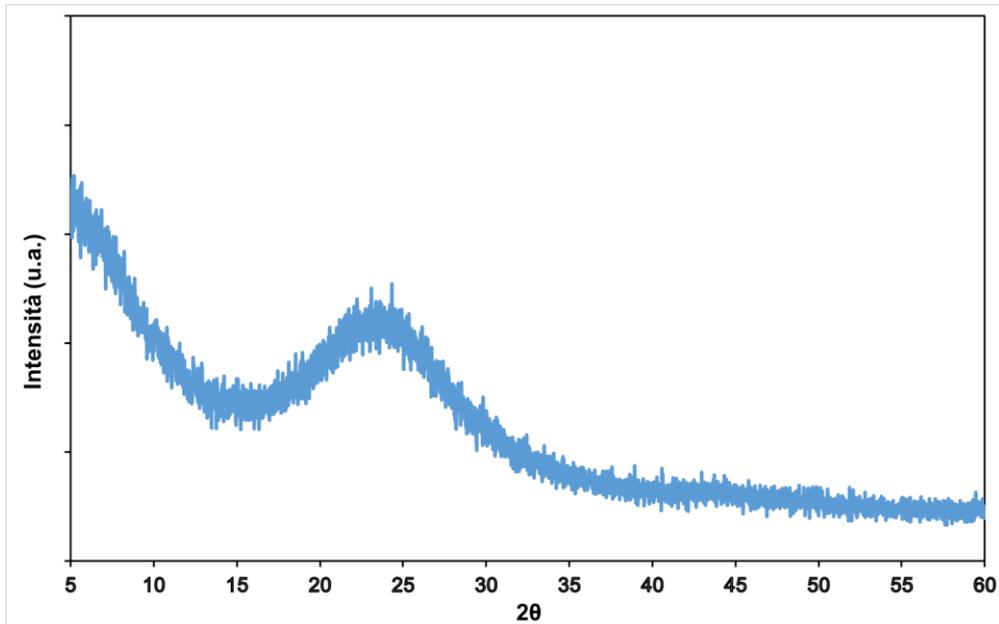


Figura 53: Spettro XRD del campione CDS1 ad alti angoli.

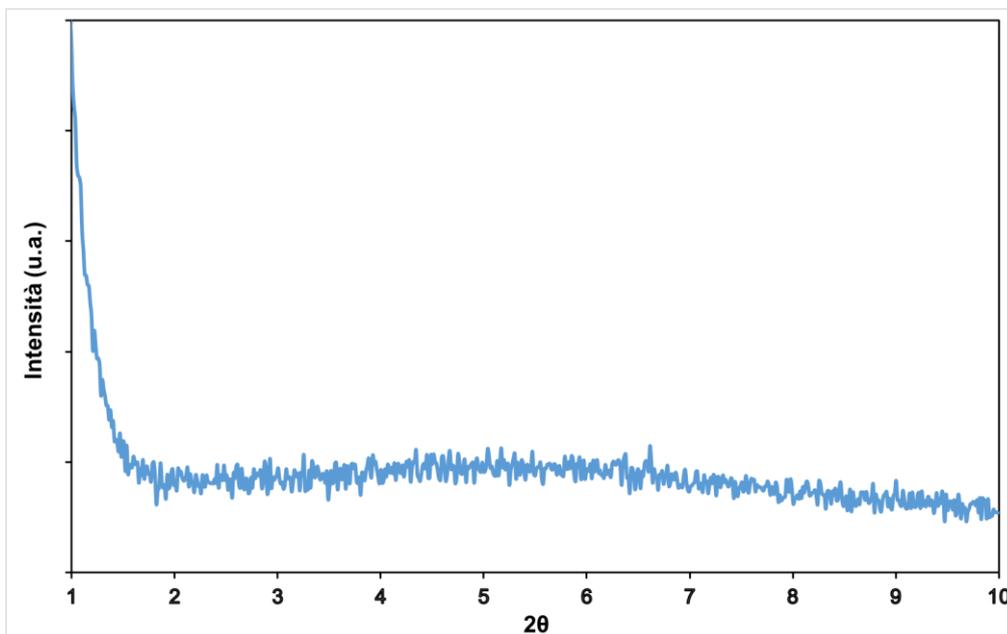


Figura 54: Spettro XRD del campione CDS1 a bassi angoli

FTIR

Lo spettro FTIR del campione **CDS1** viene presentato insieme a quello della sola β -CD, per poterne individuare graficamente la sovrapposizione dei picchi, come si evince dalla **Figura 55**.

La banda intorno a 3400 cm^{-1} e il picco debole intorno a 3700 cm^{-1} osservati nel campione CDS1 sono attribuibili ai silanoli interagenti per legame a idrogeno e terminali rispettivamente, tipici delle silici [76]. Il picco presente a 2928 cm^{-1} è quello caratteristico della β -CD, come emerso dalla caratterizzazione dei singoli costituenti. Tale valore è attribuibile allo "stretching" dei legami $-\text{CH}_2$.

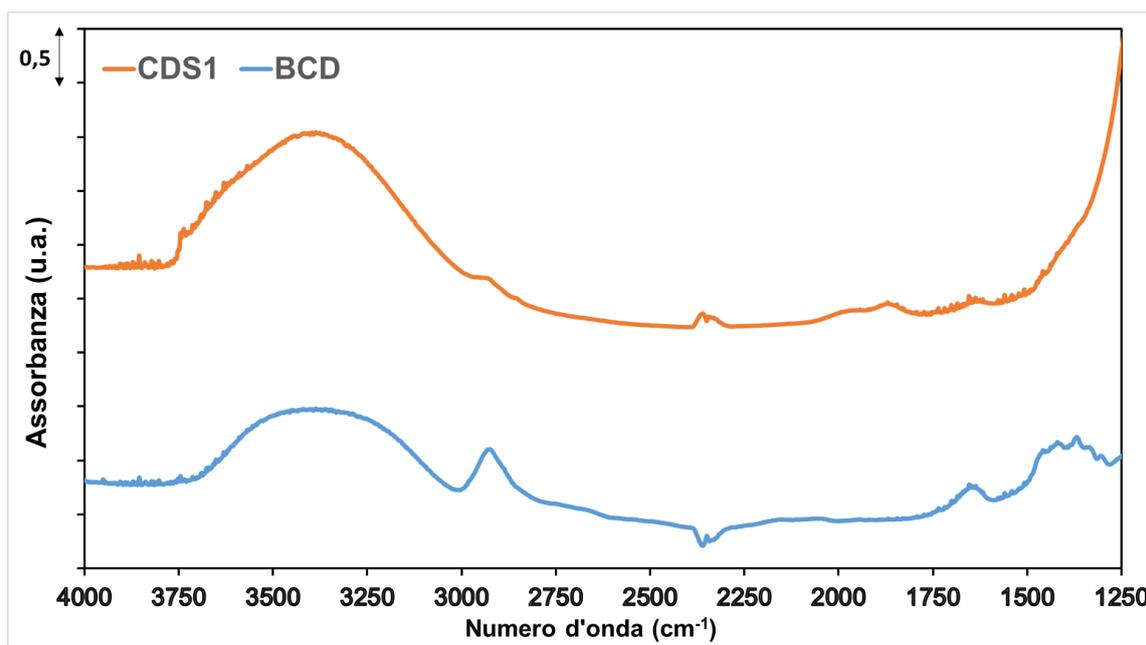
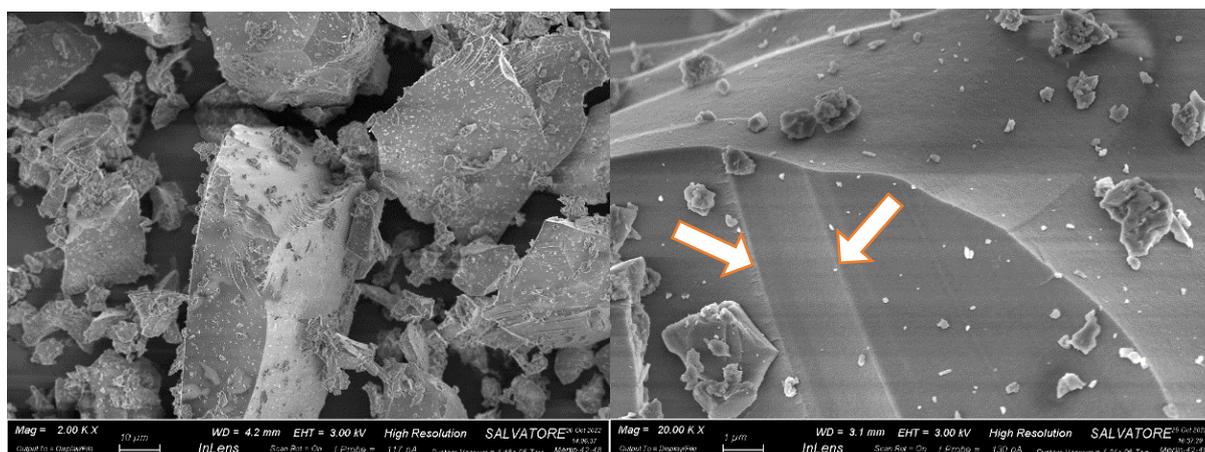


Figura 55: Spettri FTIR del campione β -CD in vuoto (curva in azzurro) e il campione CDS1 in vuoto (curva arancione).

La presenza dei picchi caratteristici, sia della silice che della **CD**, è evidenza di un sistema misto oligosaccaride-silice, sebbene l'intensità delle bande attribuibili alla frazione organica sia molto bassa.

FESEM

Il campione è stato sottoposto all'analisi micrografica FESEM, come evidenziato in **Micrografia 2**. Sono state scattate una serie di micrografie a diversi ingrandimenti. La morfologia del campione, come previsto, consiste in particelle di dimensioni eterogenee di decine di micron e di forma irregolare la cui formazione è attribuita alla frantumazione del materiale vetroso. Il processo di frantumazione al mortaio è infatti evidente dalla presenza di piani di clivaggio (micrografia a destra) derivanti da una frattura fragile del materiale.



Micrografia 2: Micrografie del campione **CDS1**: a sinistra un ingrandimento di 2 KX, mentre a destra un ingrandimento 20 KX.

In conclusione, la sintesi **CDS1** ha permesso di ottenere un ibrido CD-silice. L'analisi del campione in TGA, tuttavia, ha messo in evidenza come la quantità di CD incorporata nel "network" vetroso sia inferiore al 20% in peso. Per incrementare la quantità dell'oligosaccaride è stato deciso di ottimizzare la sintesi cambiando i rapporti tra i singoli costituenti.

5.2.2 CDS2 (β -Ciclodestrina-Silice 2° sintesi)

La solubilità della β -CD in acqua distillata, a temperatura ambiente, è pari a 18 g/l. Tale valore è assai inferiore rispetto ad altre forme di CDs e limita il contenuto massimo di CD incorporabile nella sintesi di tipo Polarz [51] (che viene effettuata al limite di solubilità). L'obiettivo della presente lavoro è, però, l'incorporazione di una quantità significativa di oligosaccaride nel vetro (circa 50 %) per ottenere un sistema ibrido che possa sfruttare le proprietà della ciclodestrina. L'approccio per aumentare il contenuto di CD nell'ibrido è stato quello mantenere inalterata la quantità di precursore siliceo (**TMOS**), moltiplicando invece l'acqua e, di conseguenza, la CD per un fattore moltiplicativo pari a 4, come schematizzato in **Tabella 6**.

β -CD	H ₂ O	HCl	TMOS
0,4 g	20,0 g	5/6 gocce	3,9 ml

Tabella 6: Tabella riassuntiva delle quantità dei reagenti della sintesi CDS2.

Procedure di sintesi

Il metodo di preparazione è pressoché equivalente a quello del campione CDS1.

Il metodo di preparazione prevede la dissoluzione di 0,4 g di β -CD in 20,0 g di acqua. La soluzione è stata sottoposta a mescolamento su piastra con velocità di agitazione di (circa) 300 rpm per 10 minuti. Successivamente sono aggiunte aggiunte 5/6 gocce di HCl fino ad un pH compreso tra 1 e 2. Dopo tale misura sono stati aggiunti 3,9 ml **TMOS**, con

inserimento goccia a goccia. Una volta interrotta l'agitazione la soluzione è stata mantenuta su piastra a 60°C per 2 ore; il tutto è poi trasferito in stufa a 60°C per 23 ore. Dopo il periodo di invecchiamento, il vetro è stato estratto dalla stufa, macinato al mortaio e infine caratterizzato.

Prima della macinazione, dall'analisi visiva è emerso, anche stavolta, qualche cristallo dal colore leggermente ambrato, ben evidente in **Figura 56**; la presenza di un elevato numero di particelle brune è indice di una degradazione durante la fase di invecchiamento.



Figura 56: Immagine relativa alla sintesi del campione CDS2: la sintesi con una serie di spot bruni viene inserita nel mortaio per essere finemente macinata e successivamente caratterizzata.

TGA

Dal termogravigramma del campione CDS2, presente in **Figura 57**, è possibile osservare come nel range compreso tra la temperatura ambiente e 150°C, il sistema perda circa un 10,7 % della massa, fenomeno attribuibile alla perdita d'acqua. Nel range compreso tra 150 e 800°C, si osserva una perdita di circa il 22,4% della massa totale, attribuibile alla degradazione e volatilizzazione della CD.

Rispetto al campione **CDS1**, è stata incorporata nel vetro una maggiore quantità di **CD** (22,4%), come è ben evidente nel confronto in **Figura 58**. Tuttavia, la quantità di **CD** in **CDS2** non è pari a quattro volte quella di **CDS1** (16,5%), come ci si aspettava dal momento che il quantitativo di CD introdotta nella miscela di sintesi è stato quadruplicato.

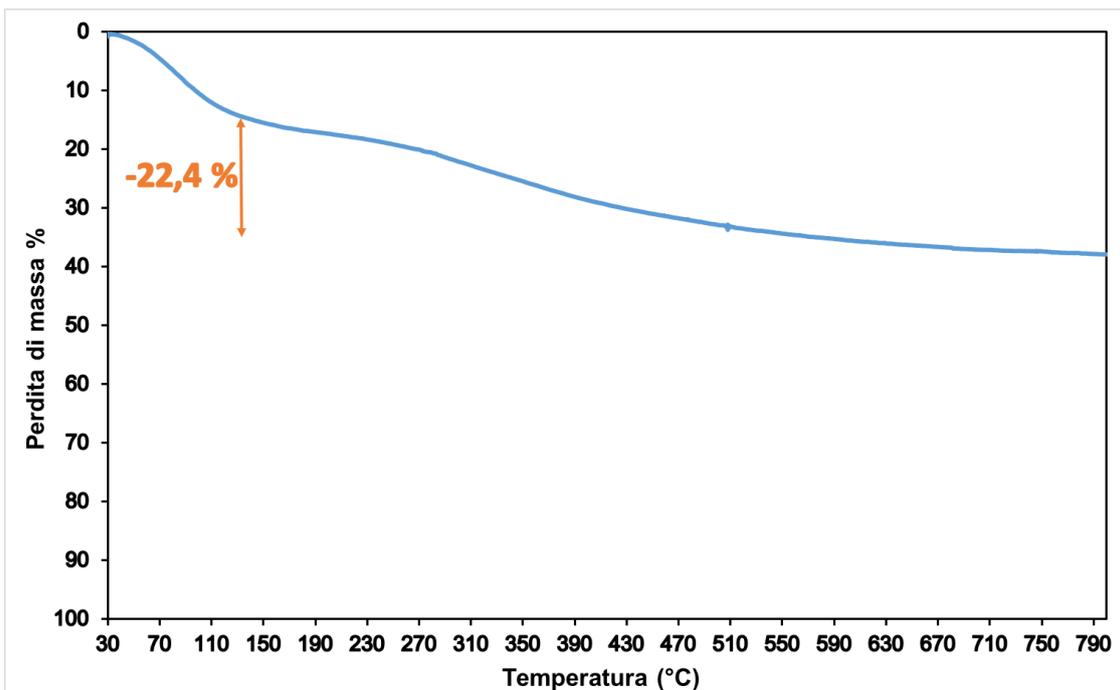


Figura 57: Termogravigramma in TGA del campione CDS2 in un range compreso tra 30 e 800°C.

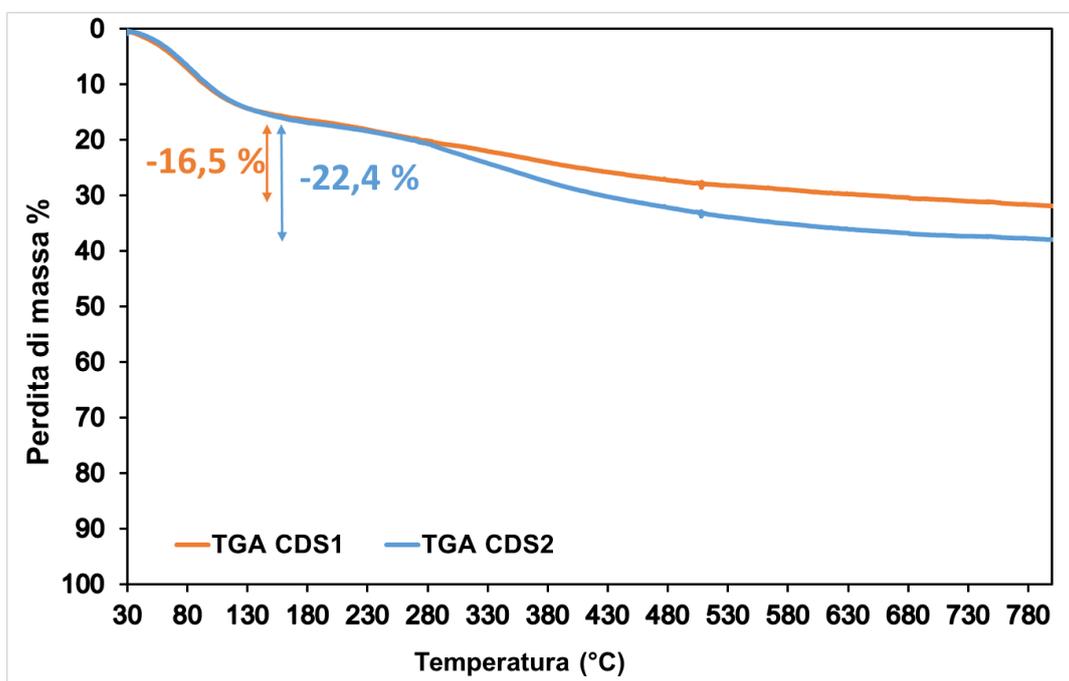


Figura 58: Confronto termogravigramma in TGA del campione CDS1(curva arancione) e CDS2(curva blu).

FTIR

Il confronto tra due campioni, rispettivamente **CDS1** e **CDS2**, è stato fatto sempre in riferimento allo spettro della **CD** pura, come emerge dalla lettura del grafico presente in **Figura 59**.

I due spettri dei campioni sono simili, a meno di una differenza nell'intensità (curva arancione vs curva azzurra). Come già osservato per il campione CDS1, anche nel

campione CDS2 è presente un picco intorno a 2900 cm^{-1} attribuibile ai gruppi $-\text{CH}_2$ della CD, a conferma della presenza dell'oligosaccaride all'interno dell'ibrido. Si nota, inoltre, come l'intensità relativa di tale picco sia più elevata di quella osservata per il campione CDS1; questo dato suggerisce la presenza di una quantità maggiore di CD nel materiale CDS2 rispetto a CDS1.

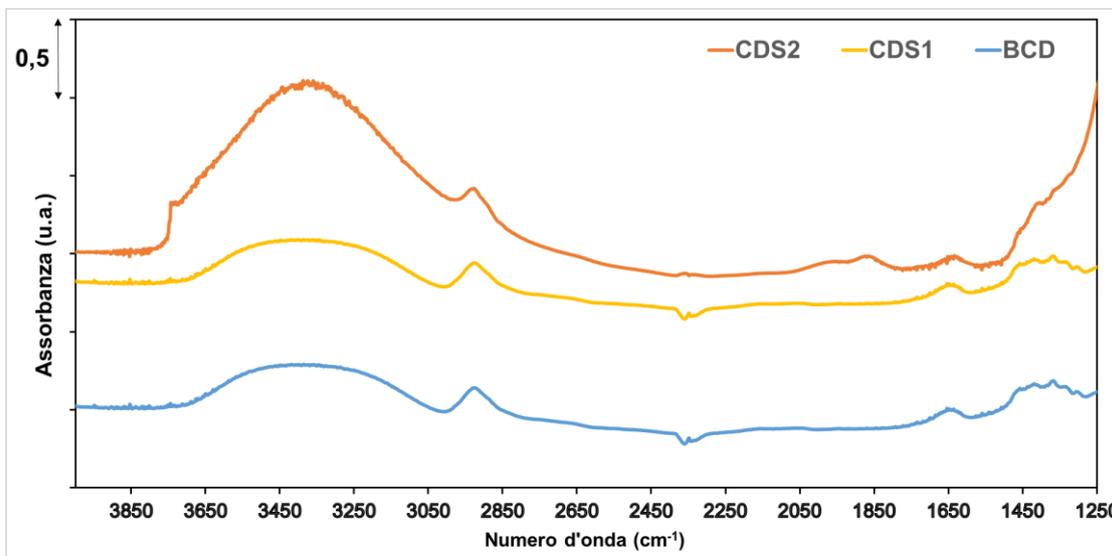


Figura 59: Spettri FTIR del campione CD in vuoto (curva gialla), del campione CDS1 in vuoto (curva arancione) e del campione CDS2 (curva in azzurro).

XRD

Nel caso invece dello spettro ad alti angoli, presentato in **Figura 60**, si osserva la presenza di alcuni picchi (2θ pari a $9,0 - 10,7 - 12,5 - 15,5$ e $20,9$) attribuibili alla fase cristallina della CD. Particolarmente evidente è la corrispondenza dei riflessi con 2θ pari $10,7$ e $12,5^\circ$ con lo spettro della CD cristallina (**Figura 45** nel **paragrafo 5.1.1**)

Tale osservazione suggerisce che ci sia stata una cristallizzazione della CD e che, quindi, non ci sia un'omogenea distribuzione della CD nella silice.

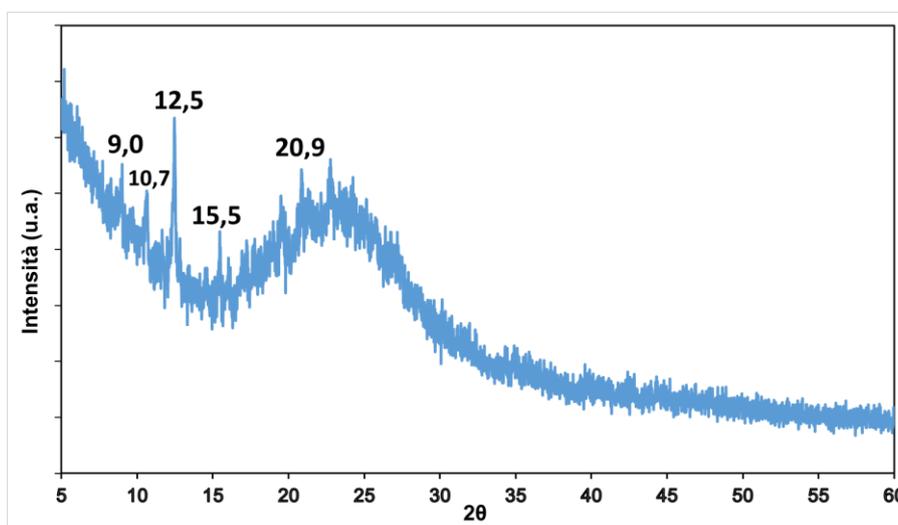


Figura 60: Spettro XRD del campione CDS2 ad alti angoli.

5.2.3 β -mCDS1 (β -metil-Ciclodestrina-Silice 1° sintesi)

Per superare il problema di un ridotto contenuto di oligosaccaride incorporato nella silice (come nel caso del campione CDS1), nonché della sua eventuale cristallinità (come riscontrato nel campione CDS2), è stato valutato un approccio di sintesi differente.

Dalla precedente caratterizzazione termogravimetrica è emerso che, anche incrementando considerevolmente la quantità di acqua e di β -CD nella miscela di sintesi, il contenuto di β -CD incorporata non è soddisfacente. Pertanto la β -CD è stata sostituita con una **β -metil-CD**, maggiormente solubile in acqua (la solubilità della **β -metil-CD** è infatti paria a 50 g/l). In **Tabella 7** sono presenti i quantitativi dei reagenti impiegati.

β -mCD	H ₂ O	HCl	TMOS
2,0 g	3,0 g	2/3 gocce	4,0 g

Tabella 7: Tabella riassuntiva delle quantità dei reagenti della sintesi β -mCDS1.

Procedure di sintesi

Il metodo di preparazione della sintesi prevede la dissoluzione di 2,0 g di **β -metil-CD** in 3,0 g di **acqua**. La soluzione è stata sottoposta a mescolamento su piastra con velocità di agitazione di circa 300 rpm per 10 minuti. Successivamente sono state aggiunte 3 gocce di **HCl**, fino ad un pH compreso tra 1 e 2. Dopo tale misura sono stati aggiunti, goccia a goccia, 3,9 ml di **TMOS**. Interrotta l'agitazione, la soluzione è stata mantenuta su piastra a 60°C per 2 ore, cui è seguito un invecchiamento in stufa a 60°C per ulteriori 23 ore. Dopo l'invecchiamento, il vetro è stato estratto dalla stufa, macinato finemente al mortaio ed è stata effettuata la completa caratterizzazione.

In **Figura 61** è possibile osservare alcune fasi del processo di sintesi. Questa volta risulta evidente un'estesa caramellizzazione di colore rosso, indice di una probabile degradazione dell'oligosaccaride durante la fase di trattamento termico e dipendente dalla formazione di composti cromofori.

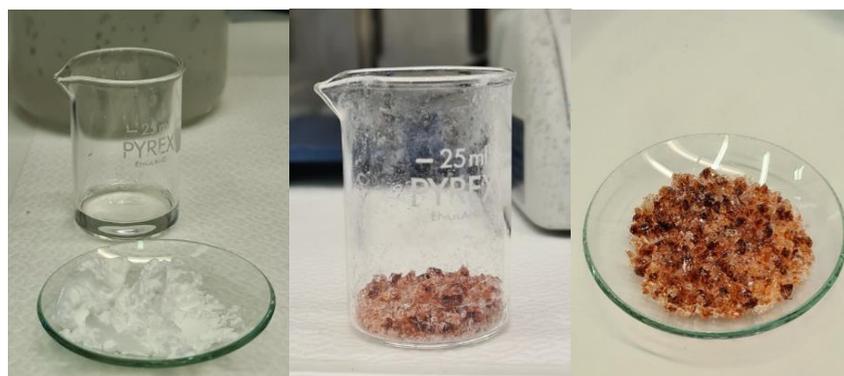


Figura 61: Rappresentazione di alcune delle fasi salienti della sintesi del campione β -mCDS1: a sinistra i singoli reagenti prima di essere miscelati, al centro la sintesi post-ageing, mentre a destra la sintesi prima di essere finemente macinata.

TGA

L'analisi del grafico, presente in **Figura 62**, conferma le ipotesi fatte in fase di progettazione in quanto, rispetto ai campioni CDS1 e CDS2, la perdita di massa nel range compreso tra 150-800°C è più alta e risulta pari a circa il 47,9 %. Per cui la maggiore solubilità della β -mCD ha permesso di incorporare una quantità superiore di oligosaccaride, ottimizzando così il processo di sintesi.

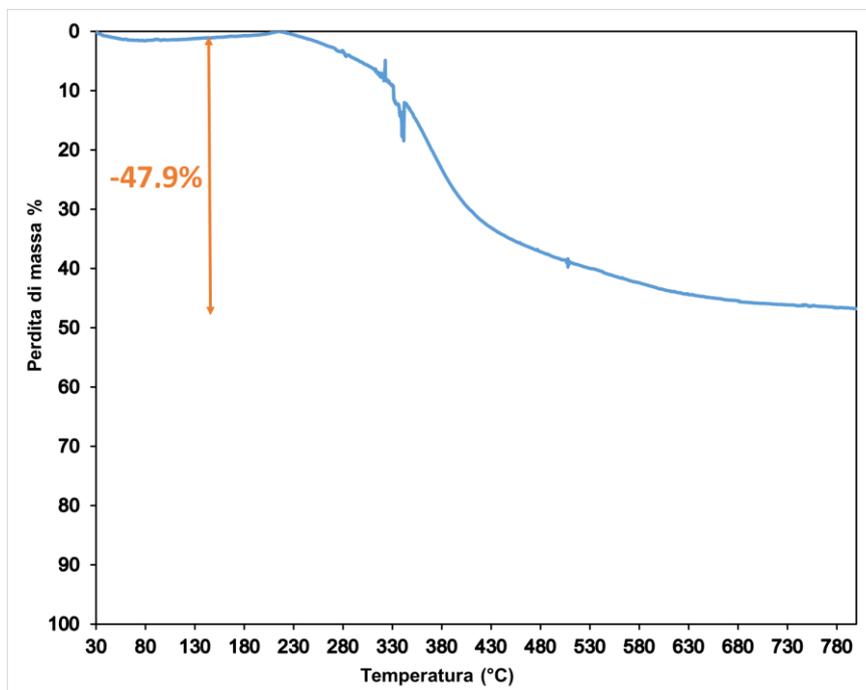


Figura 62: Termogravigramma in TGA del campione β -mCDS1 in un range compreso tra 30°C e 800°C.

XRD

Nel caso dello spettro ad alti angoli del campione β -mCDS1, riportato in **Figura 63**, non si osservano picchi attribuibili a fasi cristalline.

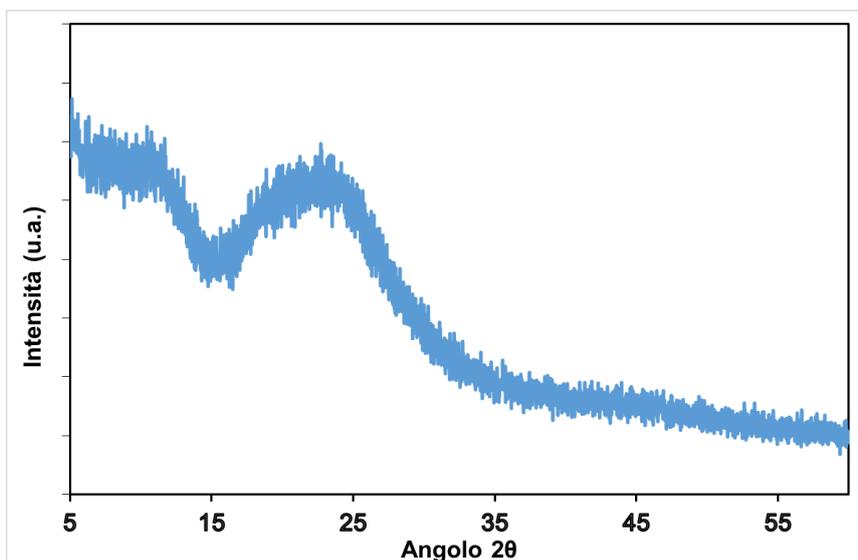


Figura 63: Spettro XRD del campione β -mCDS1 ad alti angoli.

Nello spettro XRD del campione β -mCDS1 a bassi angoli (**Figura 64**), si nota un segnale tra valori di 2θ pari a 2 e 3°, possibile indice di un certo ordine a lungo raggio nel materiale.

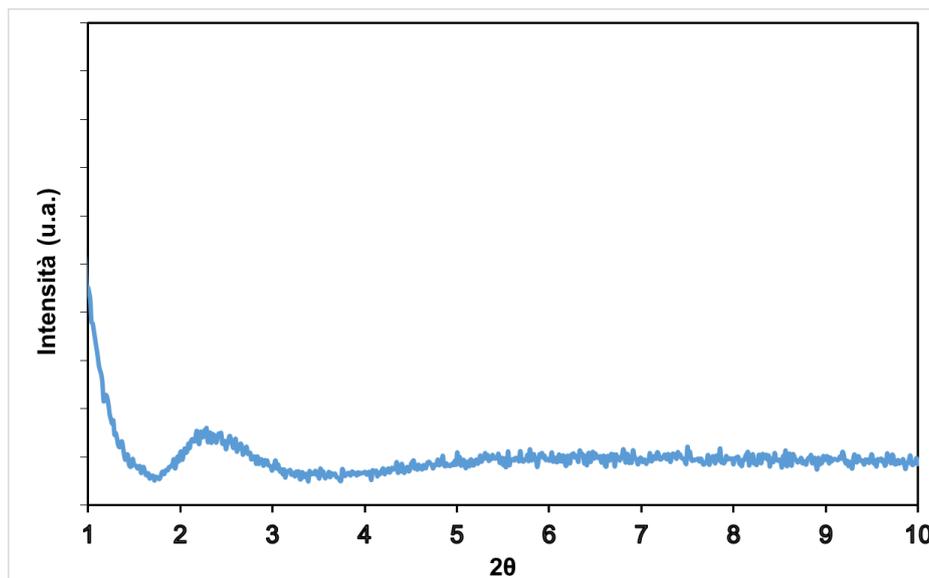


Figura 64: Spettro XRD del campione β -mCDS1 a bassi angoli.

FTIR

In **Figura 65** è possibile confrontare lo spettro del campione β -mCDS1 con quello della β -mCD pura. Come per i precedenti campioni, la banda intorno a 3400 cm^{-1} è attribuibile agli ossidrilici impegnati in legami a idrogeno. I picchi presenti a 2929 cm^{-1} e 2833 cm^{-1} sono dovuti allo stretching dei legami $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ e sono caratteristici della β -mCD.

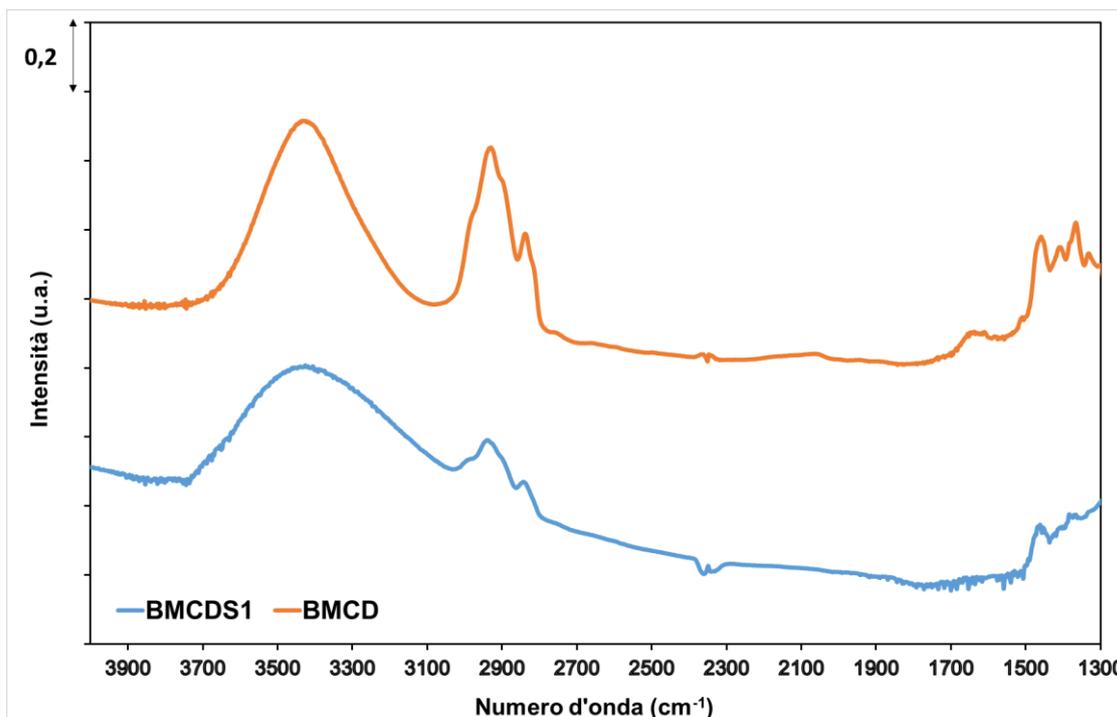


Figura 65: Spettri FTIR dei campioni β mCD in vuoto (curva arancione) e il campione β -mCDS1 in vuoto (curva azzurra).

5.2.4 β -mCDS2 (β -metil-Ciclodestrina-Silice 2° sintesi)

La sintesi β -mCDS2 è uguale alla sintesi β -mCDS1, per cui sono stati impiegati i medesimi reagenti presenti in **Tabella 7**. L'unica differenza è legata alla temperatura di mantenimento su piastra e successivo trattamento termico. È stata prevista una diminuzione di 20°C, quindi da 60°C a 40°C. Tale modifica è stata fatta nell'ottica di ottimizzare la sintesi precedente e prevenire la degradazione dell'oligosaccaride.

Procedure di sintesi

Il metodo di preparazione della sintesi prevede la dissoluzione di 2,0 g di β -metil-CD in 3,0 g di **acqua**. La soluzione è stata sottoposta a mescolamento su piastra con velocità di agitazione di circa 300 rpm per 10 minuti. Successivamente sono state aggiunte 2/3 gocce di **HCl**, fino ad un pH compreso tra 1 e 2. Dopo tale misura sono stati aggiunti 3,9 ml di **TMOS** goccia a goccia. Terminata l'agitazione, la soluzione è mantenuta su piastra a 40°C per 2 ore. Il tutto è poi trasferito in una stufa a 40°C per 23 ore (fase di invecchiamento). Dopo l'invecchiamento, il vetro è stato estratto dalla stufa, macinato al mortaio e sottoposto a caratterizzazione.

In **Figura 66** è possibile osservare due foto a confronto delle due sintesi a base di beta-metil-CD, ovvero la β -mCDS1 (a sinistra) e la β -mCDS2 (a destra). Dall'analisi visiva emerge l'assenza di spot colorati nella seconda sintesi, indice dell'assenza di degradazione dell'oligosaccaride.



Figura 66: Due fotografie a confronto delle sintesi β -mCDS1 (a sinistra) e β -mCDS2 (a destra).

L'ottimizzazione della sintesi, riducendo la temperatura di ageing da 40 a 60°C, ha consentito di prevenire la caramellizzazione dello zucchero nel vetro.

TGA

Dall'analisi del termogravigramma TGA del campione β -mCDS2, presente in **Figura 67**, è possibile osservare un andamento molto simile a quello ottenuto per la sintesi precedente β -mCDS1. Si osserva una perdita di massa minore (45,0%) rispetto a quella del campione β -mCDS1.

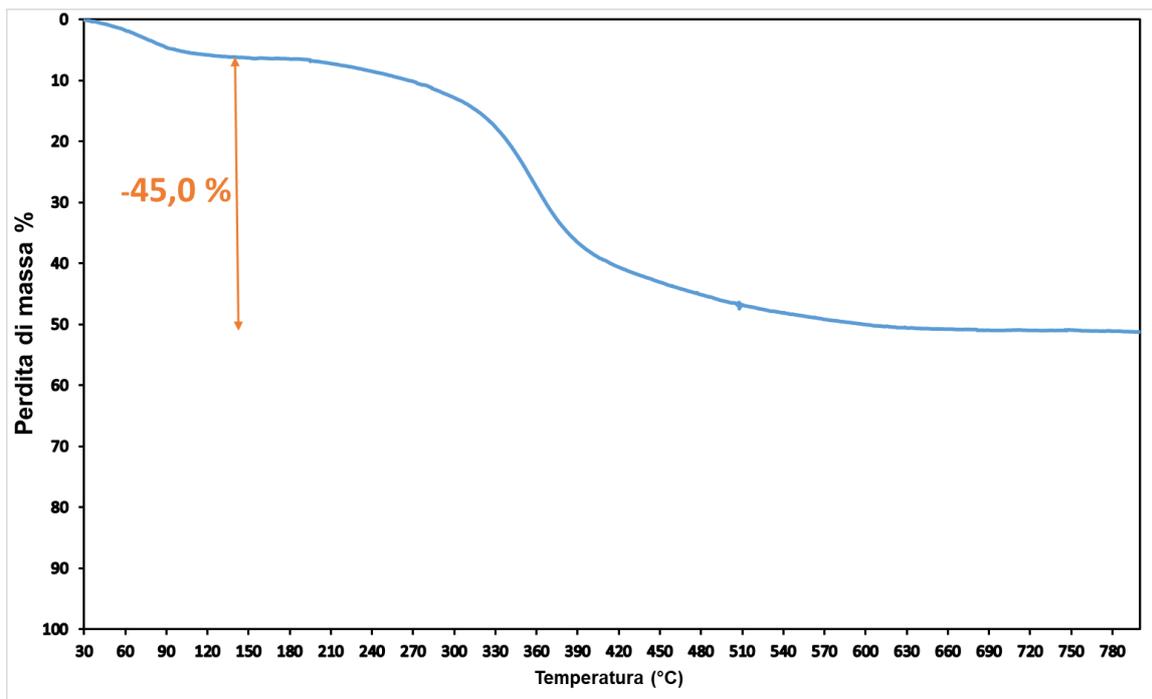


Figura 67: Termogravigramma in TGA del campione β -mCDS2 in un range compreso tra 30 e 800°C

XRD

Anche nel caso dello spettro XRD ad alti angoli del campione β -mCDS2, riportato in Figura 68, non si osservano picchi attribuibili a fasi cristalline.

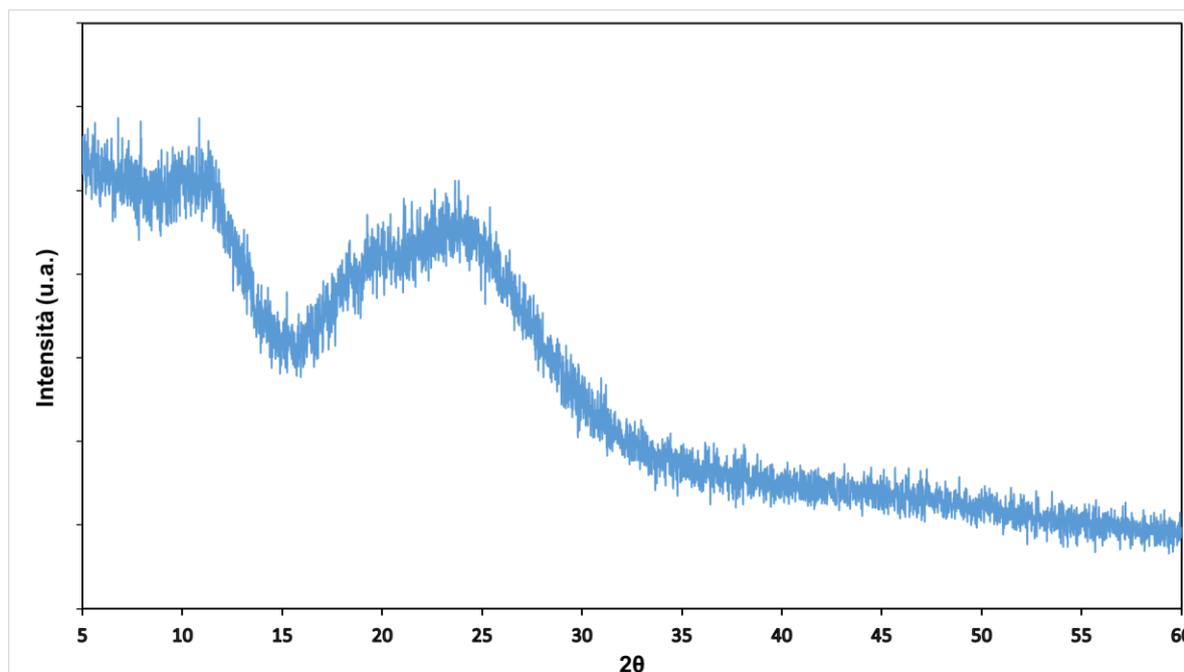


Figura 68: Spettro XRD del campione β -mCDS2 ad alti angoli.

Nello spettro XRD del campione β -mCDS2 a bassi angoli (**Figura 69**) è presente un debole segnale tra 2° e 3° dell'angolo 2θ .

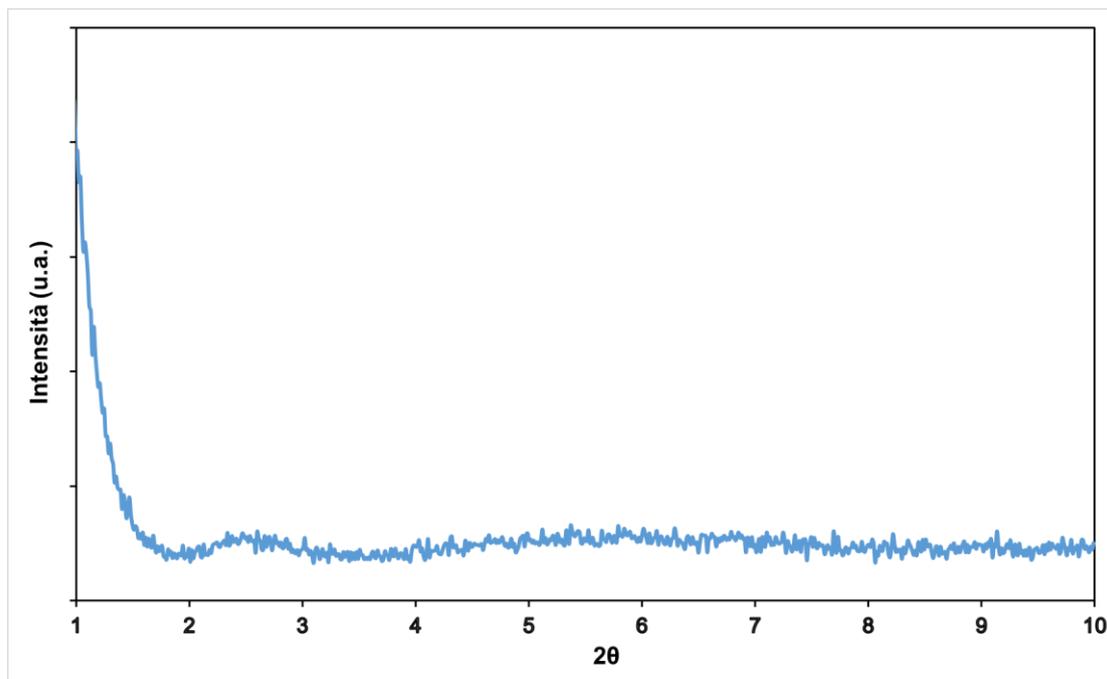


Figura 69: Spettro XRD del campione β -mCDS2 a bassi angoli

FTIR

In **Figura 70** è possibile confrontare lo spettro del campione β -mCDS2 con quello della β -mCD pura. Come per i precedenti campioni, la banda intorno a 3400 cm^{-1} è attribuibile agli ossidrilici interagenti per legami a idrogeno. I picchi presenti a 2929 cm^{-1} e 2833 cm^{-1} sono caratteristici della β -mCD.

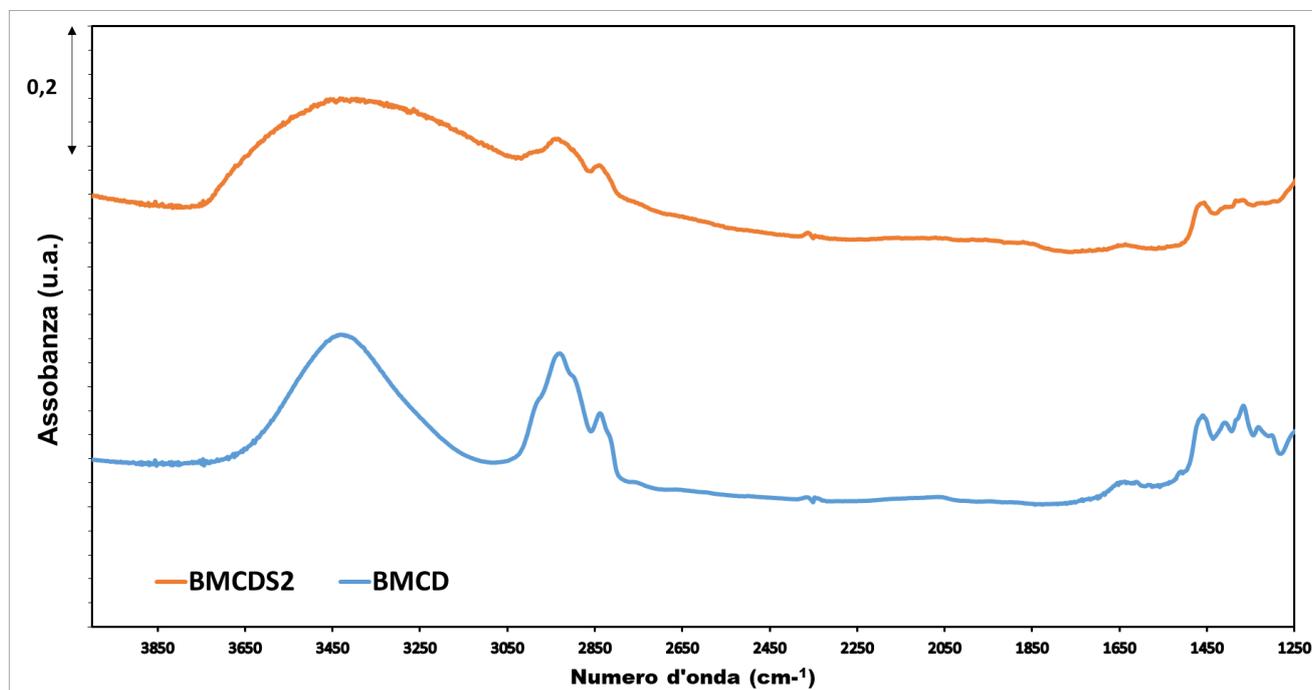
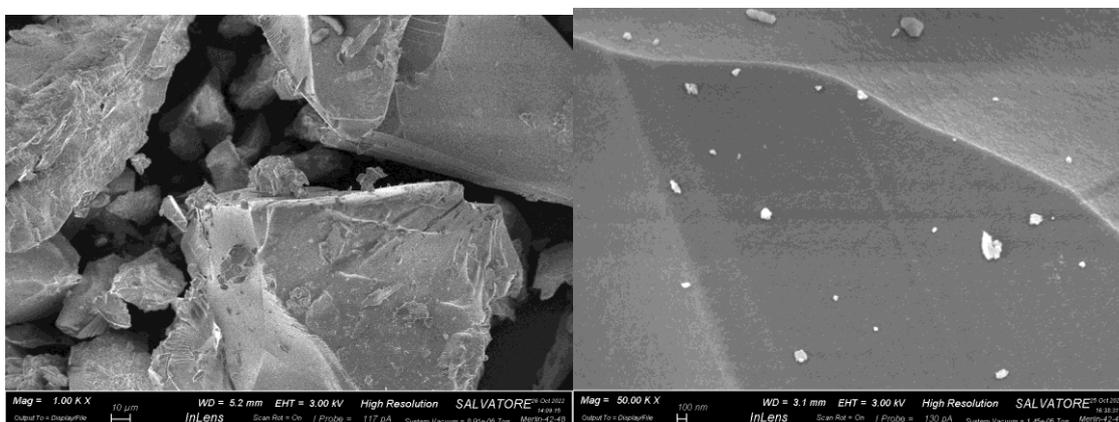


Figura 70: Grafico FTIR del campione β -mCDS2 in aria (arancione) e β -mCD in vuoto (azzurro)

FESEM

Il campione β -mCDS2 è stato sottoposto all'analisi micrografica FESEM, come evidenziato in **Micrografia 3**; sono state scattate una serie di micrografie, a diversi ingrandimenti. La morfologia è irregolare e le particelle presentano dimensioni eterogenee nell'ordine delle decine di micron. Il processo di frantumazione al mortaio è ancora evidente dalla presenza di piani di clivaggio (ben evidenti nella micrografia a sinistra), derivanti da una frattura fragile della materiale.



Micrografia 3: Micrografie del campione β -mCDS2: a sinistra un ingrandimento a 1KX, mentre a destra pari a 5 KX.

5.3 SINTESI IN AMBIENTE BASICO

Come mostrato nei precedenti paragrafi, le sintesi in ambiente acido hanno permesso di ottenere dei materiali ibridi massivi. Tuttavia, per le applicazioni biomedicali è preferibile ottenere dei materiali in forma particellare (possibilmente sferica). Per questo motivo è stata studiata un'altra tipologia di sintesi: quella in ambiente basico. Le sintesi ottenute hanno messo in luce la possibilità di ottenere dei materiali particellari. Prima di analizzare in dettaglio le due sintesi ottenute, è necessario presentare il metodo al quale si ispirano, ovvero il metodo Stöber [56].

5.3.1 Metodo di Stöber: in cosa consiste?

Il processo di Stöber viene così chiamato dal chimico Werner Stöber, che per primo lo studiò attorno al 1968. Si tratta di un processo sol-gel per il quale è stato messo a punto un sistema di reazioni chimiche che prevedono la formazione di particelle di silice sferiche. Tali reazioni avvengono con gli stessi meccanismi di idrolisi e condensazione, descritti nel capitolo delle silici nanoporose, in soluzione alcolica basica. L'ammoniaca è il catalizzatore "morfologico" impiegato. Le granulometrie ottenute in sospensione variano da poco meno di 0,05 micrometri a 2 micron di diametro. [56]

Queste reazioni avvengono con un meccanismo a catena, cui segue una reticolazione e la formazione di particelle colloidali di silice. [64] Dal processo Stöber si ottengono particelle non porose, con carica superficiale negativa che le stabilizza e ne riduce l'aggregazione [65]. Il metodo, poi, è stato sottoposto a numerose modifiche per ottenere particelle sempre

più piccole e monodisperse; in particolare, al fine di ottenere particelle dalle dimensioni uniformi, è necessario il controllo di molte variabili simultanee come pH, temperatura di reazione, concentrazione del precursore della silice ed eventuali co-solventi. [64]

È possibile analizzare più nel dettaglio le sintesi ottenute tramite tale metodo, nei paragrafi successivi.

5.3.2 Sintesi silice tipo van Blaaderen (VBS)

La prima sintesi effettuata ha costituito uno studio di fattibilità preliminare e si è ispirato al lavoro di van Blaaderen et al. [65] e Van Helden et al [66]. Il campione ottenuto, chiamato VBS, opportunamente caratterizzato, ha permesso di comprendere le condizioni necessarie affinché si potessero ottenere delle particelle di silice. Non solo, ma gli spettri caratteristici allo FTIR, XRD e TGA hanno costituito un riferimento per comprendere le variazioni degli spettri nella sintesi successiva.

Procedure di sintesi

I reagenti utilizzati sono riportati in **Tabella 8**. Il metodo di preparazione della sintesi, di cui alcune fasi sono documentate in **Figura 71**, prevede un'iniziale miscelazione di 2,7 ml di **acqua** e 26,7 g di **etanolo**. La soluzione è omogeneizzata (in un contenitore chiuso) tramite mescolamento su piastra con velocità di agitazione di 300 rpm per 10 minuti. Successivamente vengono aggiunti 3,6 ml di **ammoniaca**, continuando a mescolare. Dopo sono addizionati 2,0 ml di **TEOS**, goccia a goccia. La soluzione viene mantenuta in agitazione a 150 rpm per 18 ore a temperatura ambiente, sempre in un contenitore chiuso. In seguito la sintesi viene centrifugata a 4000 giri al minuto per 15 minuti. Successivamente viene sostituita l'acqua di reazione con acqua distillata e il tutto viene nuovamente centrifugato a 4000 giri al minuto per 10 minuti. Il precipitato viene trasferito in stufa dove rimane a 40°C fino a massa costante. Si procede infine con la macinazione della polvere essiccata e la successiva caratterizzazione.

Acqua	Etanolo	Ammoniaca (sol 33%)	TEOS
2,7 ml	26,7 g	3,6 ml	2,0 ml

Tabella 8: Quantità in volume e/o in massa dei reagenti impiegati per la sintesi del campione VBS

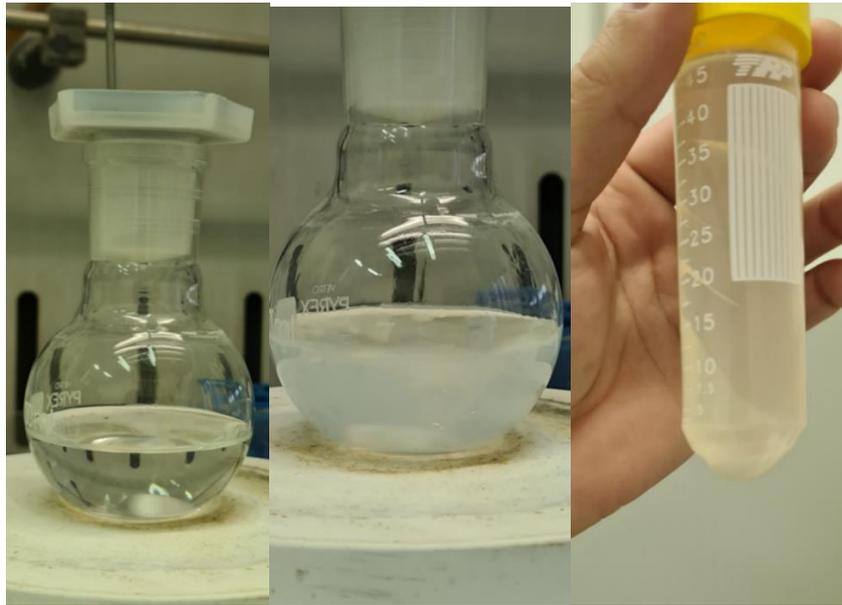


Figura 71: Rappresentazione di alcune delle fasi salienti della sintesi del campione **VBS**: a sinistra i singoli reagenti (acqua, etanolo e ammoniaca) prima di essere miscelati; al centro la sintesi dopo l'aggiunta del TEOS, mentre a destra la sintesi post processo di centrifuga.

TGA

L'analisi del termogravigramma del campione **VBS**, presente in **Figura 72**, mette in evidenza che nel range compreso tra la temperatura ambiente e 150°C, il sistema perde circa l'8,9 % della massa, a causa della perdita d'acqua contenuta nel campione. Nel range compreso tra 150 e 800°C, invece, si ha la perdita del 3,2% in massa del campione, attribuibile alla condensazione dei silanoli vicinali. [69]

È possibile confrontare il termogravigramma ottenuto con uno simile tratto dalla letteratura, presente in **Figura 73**. Dal confronto emerge una congruenza tra prove sperimentali e curve di letteratura. A meno di incertezze legate allo strumento, infatti, in entrambi i casi si assiste ad una perdita contenuta d'acqua, inferiore comunque al 10,0 % (sia osservando la curva A di silice pura, che quella B relativa alla struttura particellare).

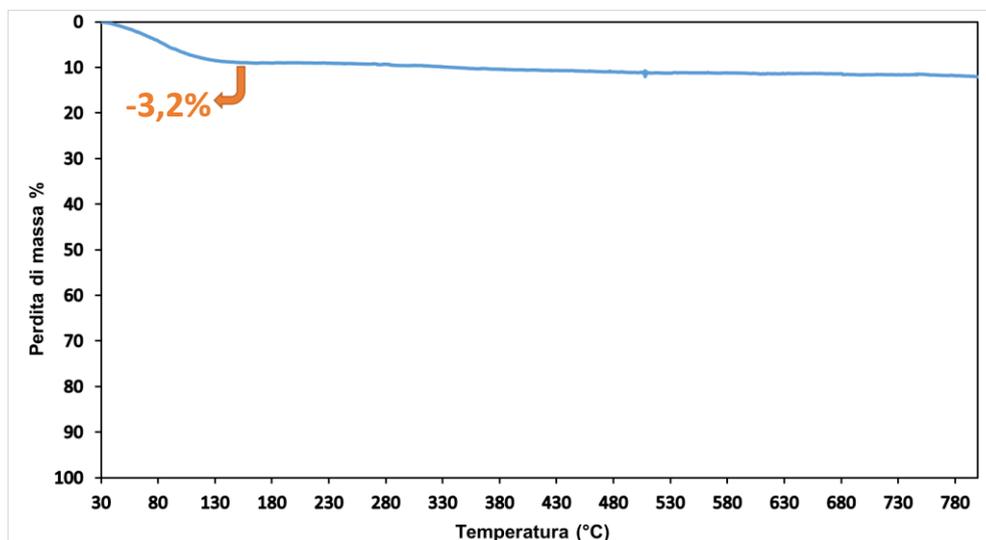


Figura 72: Termogravigramma in TGA del campione VBS in un range compreso tra 30 e 800°C

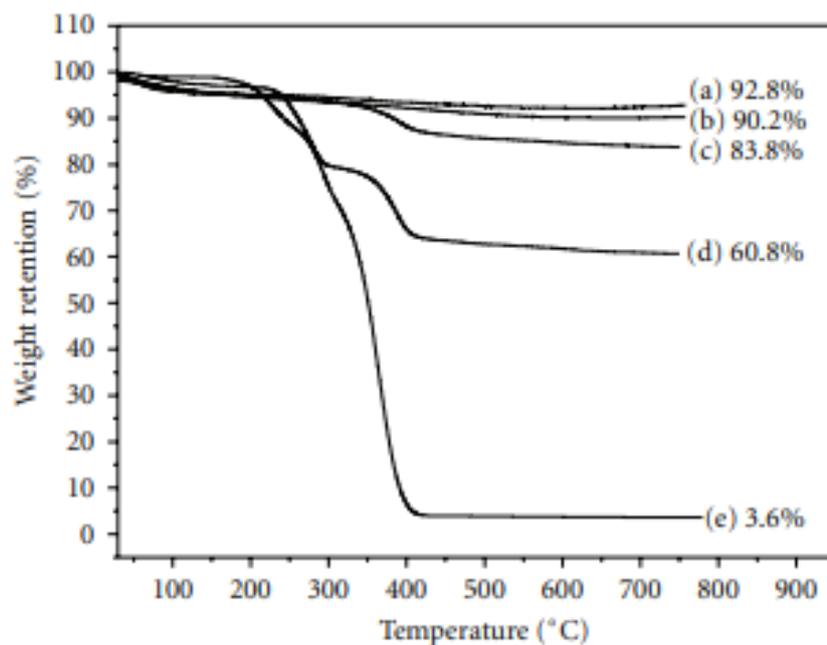


Figura 73: Analisi termogravimetrica in TGA di silice pura (curva a), di particelle SiO₂ MPTS (curva b) e di particelle di SiO₂ con PMMA in diverse concentrazioni (curve c-d-e). La prova è condotta in azoto ad una velocità di riscaldamento di 10 C/min. [70]

FTIR

Il campione è stato analizzato mediante spettroscopia infrarossa e lo spettro ottenuto è riportato in **Figura 74**. Lo spettro presenta un ampio e intenso assorbimento sopra 3000 cm⁻¹ dovuto a ossidrilici interagenti per legame a idrogeno. Lo spettro in esame è coerente con uno spettro presente in letteratura, riportato in **Figura 75**.

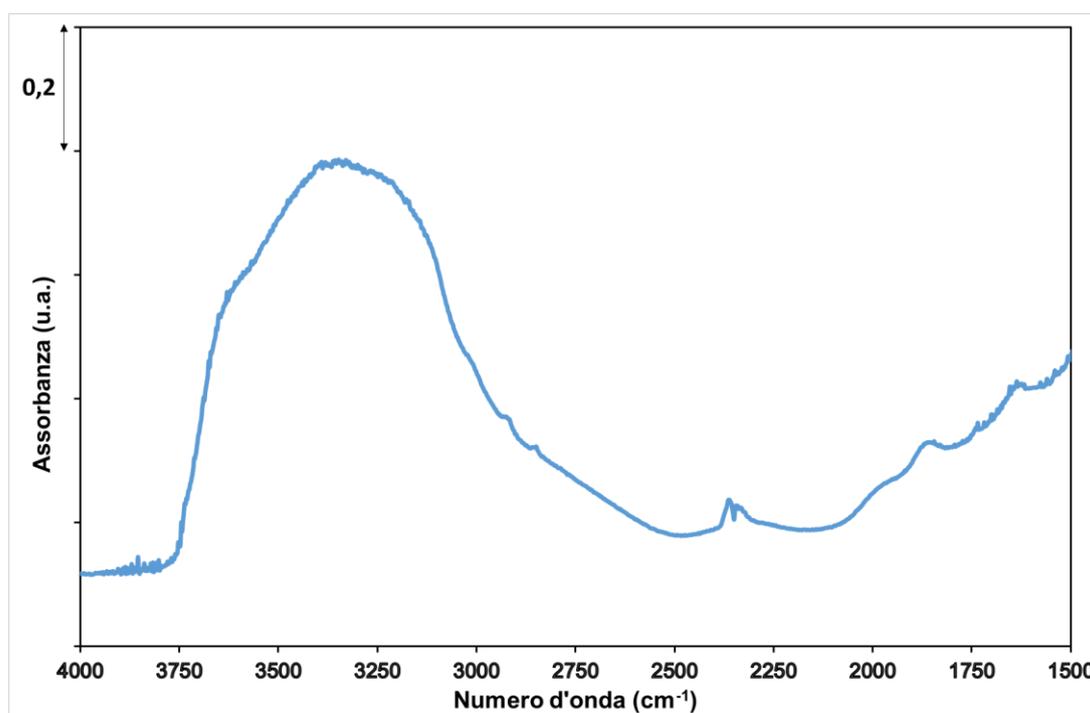


Figura 74: Spettro FTIR del campione VBS in vuoto.

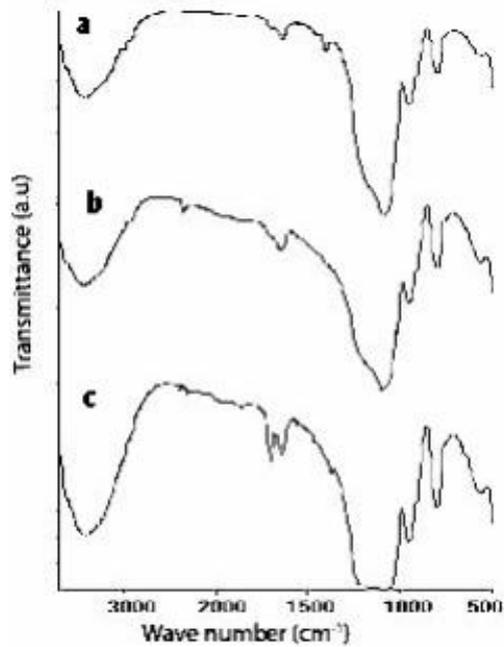


Figura 75: Spettri FTIR delle particelle di silice ottenute dalla reazione miscela $C_2H_5OH : NH_3 : H_2O : TEOS$ 15.40 : 2.40 : 1.0 (mol) a diversi tempi di invecchiamento: a - 1 giorno, b - 5 giorni, c - 13 giorni. [68]

XRD

Nel caso dello spettro ad alti angoli del campione **VBS**, riportato in **Figura 76**, non si osservano picchi attribuibili a fasi cristalline

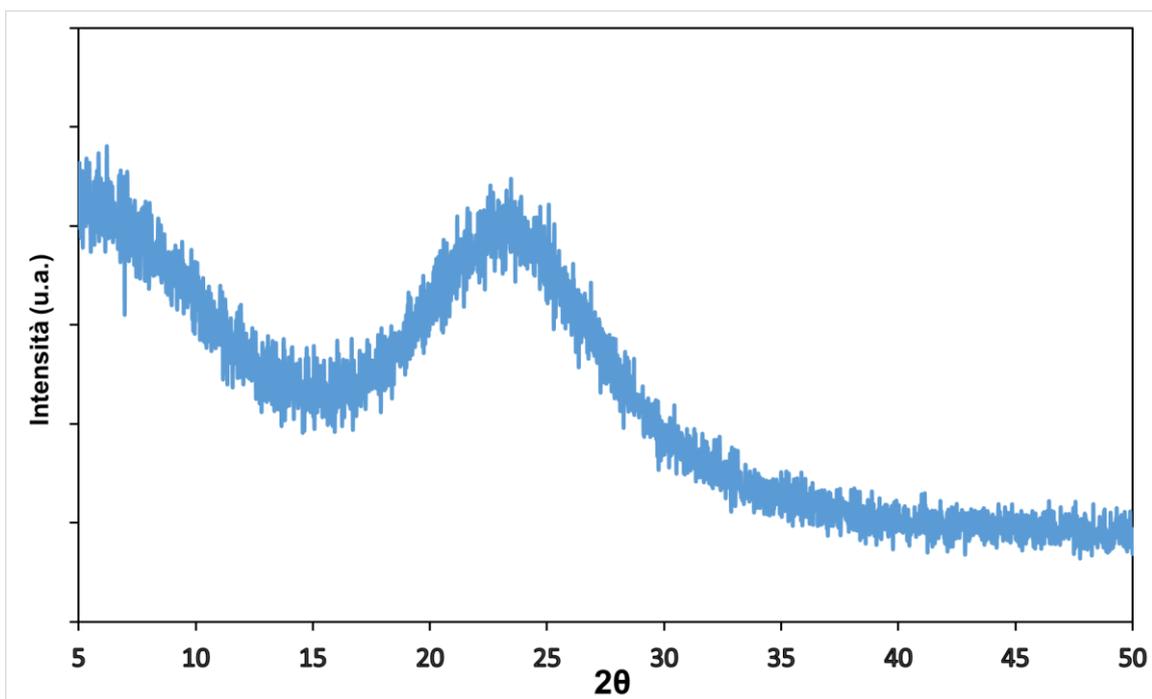


Figura 76: Spettro XRD del campione VBS ad alti angoli.

Nello spettro XRD del campione **VBCDS** a bassi angoli (**Figura 77**) è presente un debole segnale tra i valori dell'angolo 2θ compreso tra 2° e 3° .

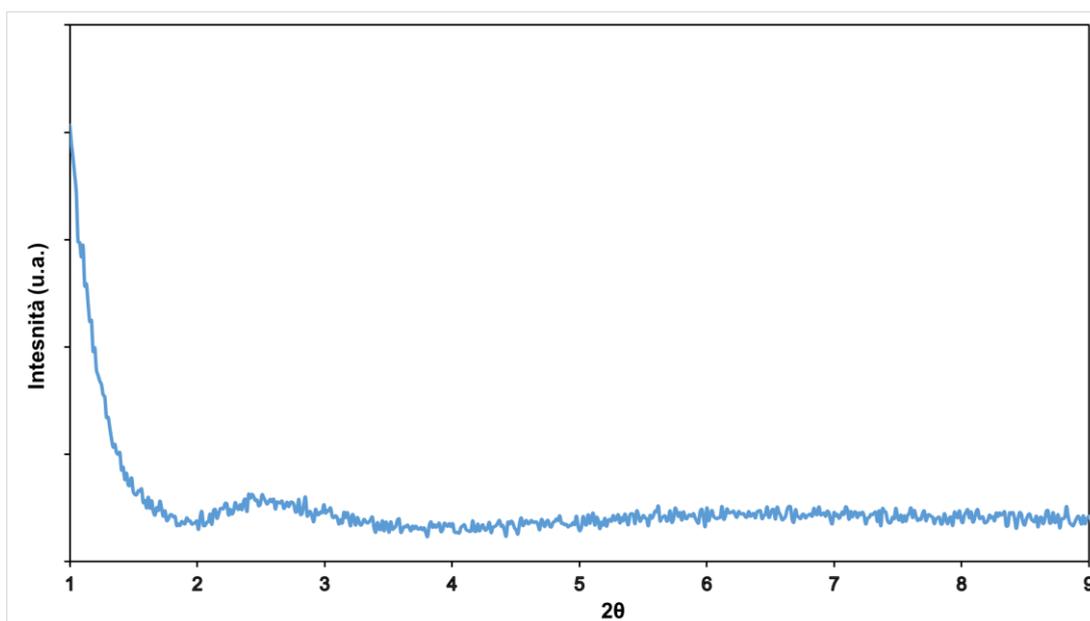
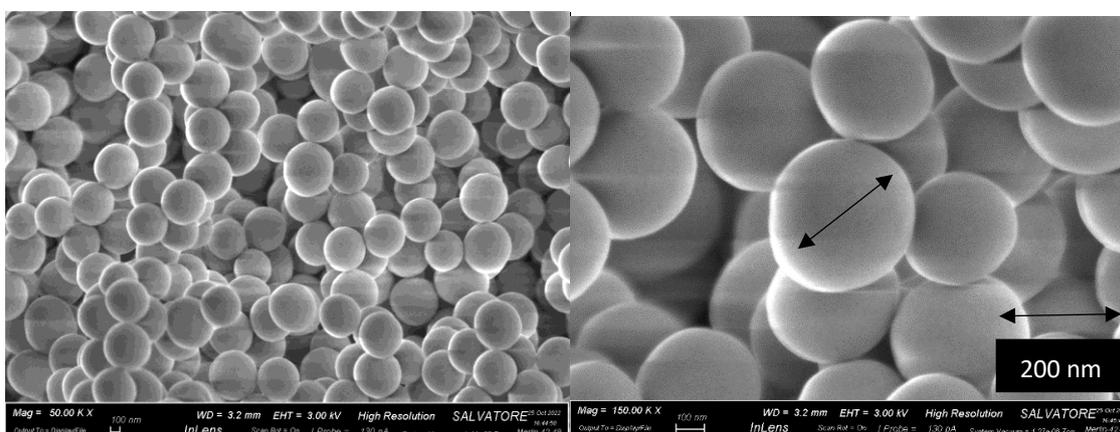


Figura 77: Spettro XRD del campione VBS a bassi angoli.

FESEM

Il campione VBS è stato sottoposto all'analisi micrografica FESEM, come mostrato in **Micrografia 4**. La morfologia evidenzia la presenza di particelle di forma sferica, integre e con dimensioni regolari. Confrontando il marker della micrografia con la dimensione media di una particella, si nota come questa si aggiri attorno 200 nm. Ciò è coerente con i materiali ottenuti con sintesi tipo Stöber, come accennato all'inizio del paragrafo.



Micrografia 4: Micrografie del campione VBS; a sinistra si osserva un ingrandimento a 50 KX, mentre a destra un ingrandimento pari a 150 K X.

5.3.3 Sintesi silice tipo van Blaaderen con ciclodestrina (VBCDS)

La seconda sintesi è stata progettata con l'obiettivo di incorporare l'oligosaccaride all'interno delle particelle vetrose, ottenute con il metodo "Van Blaaderen" mostrato nel paragrafo

precedente. Il campione ottenuto, chiamato **VBCDS**, è stato opportunamente caratterizzato, come mostrato qui di seguito.

Procedure di sintesi

Il metodo di preparazione della sintesi è pressoché uguale a quello relativo al campione VBS, se non per l'aggiunta della CD nella fase iniziale (**Tabella 9**).

Acqua	β -mCD	Etanolo	Ammoniaca (sol 33%)	TEOS
2,7 ml	0,1 g	26,7 g	3,6 ml	2,0 ml

Tabella 9: Quantità in volume e/o in massa dei reagenti impiegati per la sintesi del campione VBCDS

La sintesi prevede un'iniziale miscelazione di 2,7 ml di **acqua** e 0,1 g di **β -mCD** seguita dall'aggiunta di 26,7 g di **etanolo** in un contenitore chiuso. La soluzione è stata omogeneizzata tramite mescolamento su piastra con velocità di agitazione di 300 rpm per 10 minuti. Successivamente è stata aggiunta l'ammoniaca, continuando a mescolare; seguita dall'introduzione di 2,0 ml di **TEOS**, goccia a goccia. Quindi la soluzione è stata lasciata in agitazione a 150 giri al minuto a temperatura ambiente per 18 ore, sempre in contenitore chiuso. La soluzione è stata poi trasferita in una centrifuga dove è stata sottoposta ad un ciclo di rotazione a 4000 giri al minuto per 15 minuti. Successivamente dopo aver sostituito l'acqua di reazione con acqua distillata, il campione è stato nuovamente centrifugato a 4000 giri al minuto per 10 minuti. Il materiale così ottenuto è stato trasferito in stufa dove è rimasto a 40°C fino al raggiungimento di un valore di massa costante. Si è proceduto infine con la macinazione della polvere essiccata e la successiva caratterizzazione.

TGA

L'analisi del termogravigramma del campione **VBCS**, presente in **Figura 78**, mette in evidenza che nel range compreso tra temperatura ambiente e 150°C, il sistema perde circa il 12,0 % della massa, fenomeno attribuibile alla perdita d'acqua. Nel range compreso tra 150 e 800°C, invece, si ha la perdita del 6,0 % in massa del campione dovuto alla condensazione dei silanoli e alla degradazione dell'eventuale β -mCD incorporata.

È possibile confrontare il termogravigramma ottenuto con quello della sintesi analizzata in precedenza (**Figura 77**). Dal confronto emerge che il campione VBCDS perde circa il 3,0% in massa in più rispetto al campione VBS. Tale differenza può essere imputata alla presenza di una esigua quantità di CD (3,0%) oppure all'incertezza di misura dello strumento.

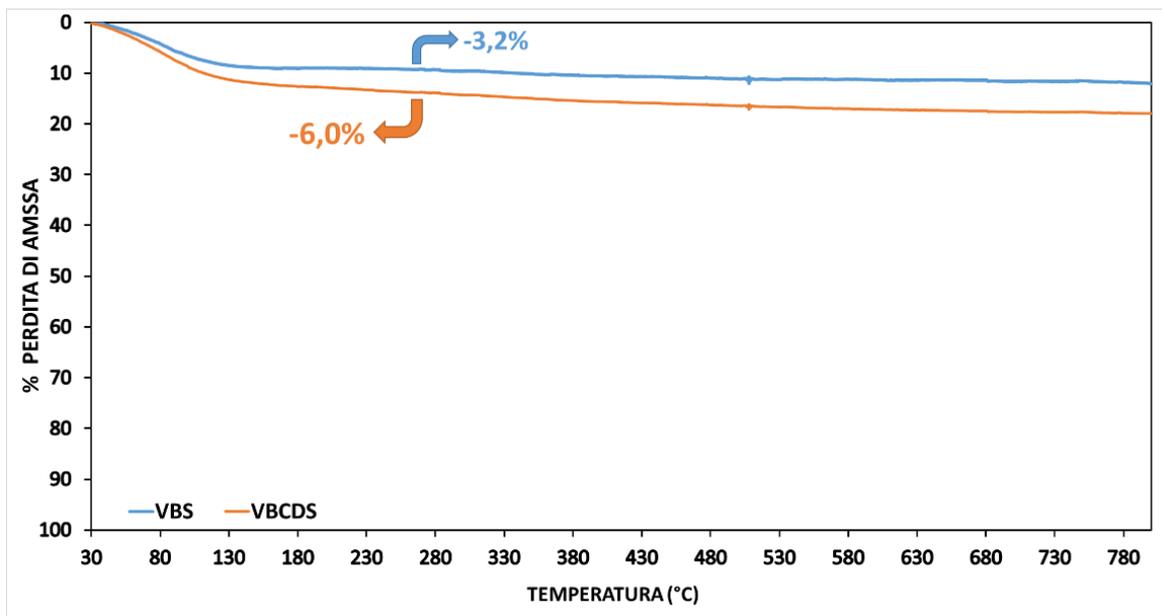


Figura 78: Termogravigramma in TGA del campione VBCDS (curva arancione) e del campione VBS (curva blu) in un range compreso tra 30 e 800°C.

FTIR

Il campione viene analizzato tramite spettroscopia infrarossa. Lo spettro FTIR della silice sintetizzata in presenza di CD, è simile a quello della silice pura. L'unica differenza, osservabile in **Figura 79**, è legata all'intensità dello spettro; probabilmente a seguito del contenuto di KBr o dello spessore della pastiglia. Non si osservano bande tipiche della CD.

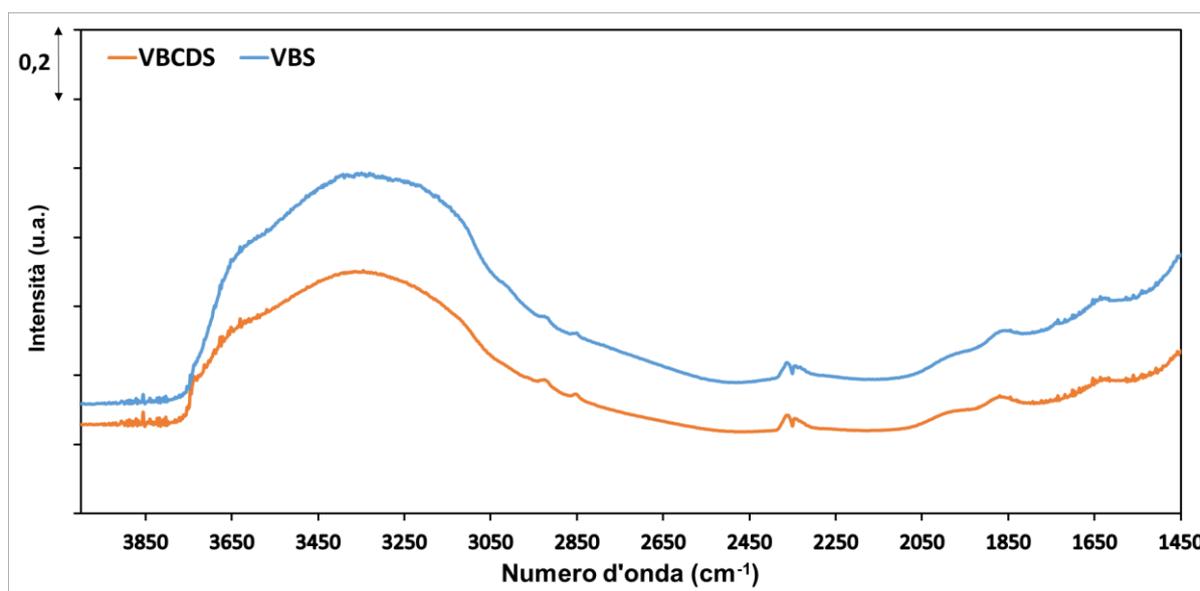


Figura 79: Spettri FTIR dei campioni VBCDS (curva arancione) in vuoto e del campione VBS (in blu).

XRD

In **Figura 80** è presente lo spettro ad alti angoli del campione VBCDS. Come il campione VBS, non si osservano picchi attribuibili a fasi cristalline. Lo spettro XRD del campione VBS a bassi angoli, presente in **Figura 81**, si presenta simile a quello del campione VBS.

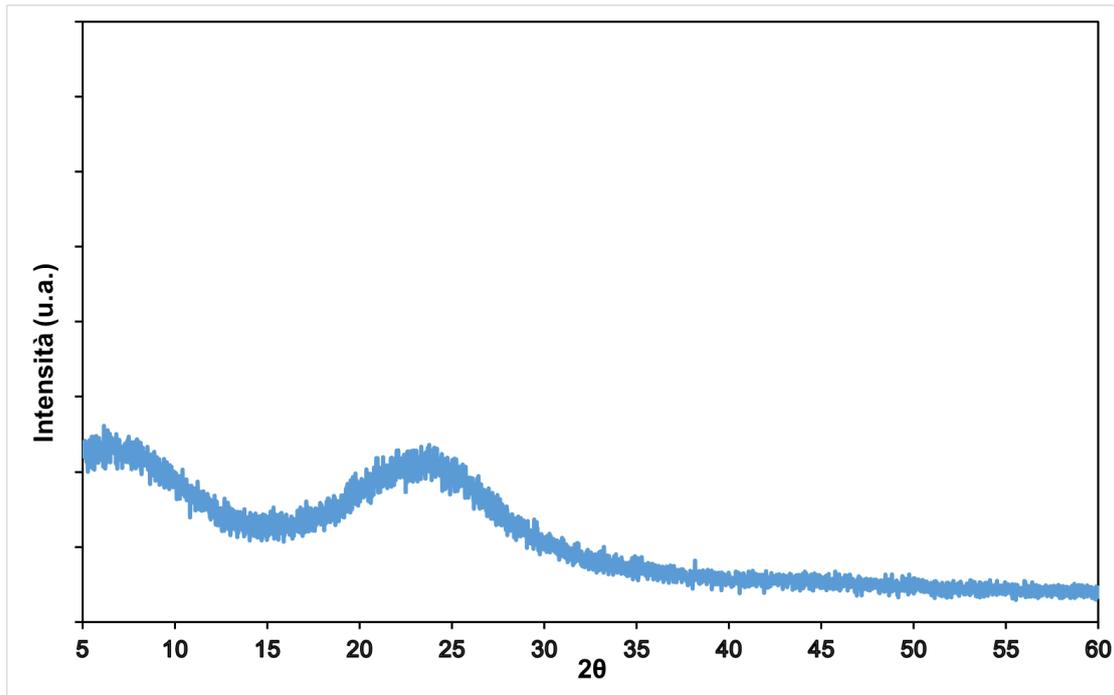


Figura 80: Spettro XRD del campione VBCDS ad alti angoli.

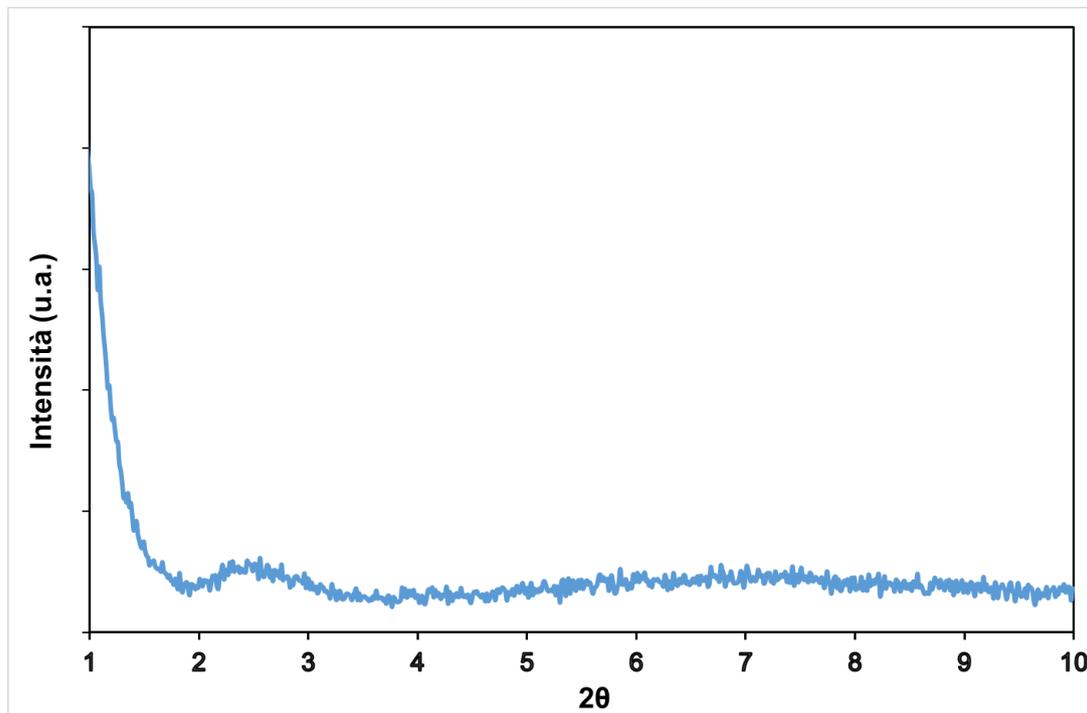
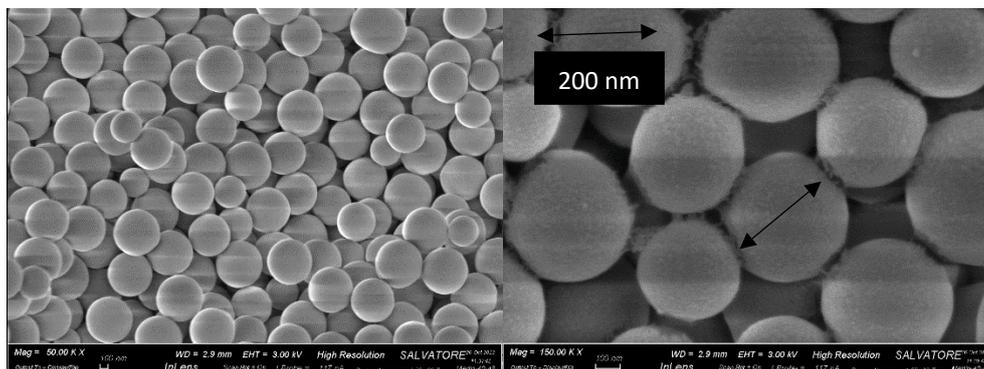


Figura 81: Spettro XRD del campione VBCDS a bassi angoli

FESEM

Il campione **VBCDS** è stato sottoposto all'analisi micrografica FESEM, come mostrato in **Micrografia 5**; sono state scattate una serie di micrografie, a vari ingrandimenti. Come per il campione precedente, la morfologia evidenzia la presenza di particelle sferiche, perfettamente integre e dalle dimensioni regolari. Confrontando il marker della micrografia con la dimensione media di una particella, si apprende che essa si aggira attorno 200 nm.

Ciò che differenzia, almeno in parte, la micrografia del campione **VBCDS (Micrografia 5)** con quella del campione VBS (**Micrografia 4**), è la presenza di una fase ignota che ingloba le particelle, dovuto a residui del processo di sintesi o a contaminazione in fase di preparazione dei campioni.



Micrografia 5 : Micrografia del campione VBCDS. A sinistra un ingrandimento a 50 KX, mentre a destra pari a 200 KX

In conclusione, quindi, la sintesi di tipo Van Blaaderen permette di ottenere delle particelle sferiche come desiderato; tuttavia, per il momento, non è stato possibile incorporare la CD all'interno delle particelle.

5.4 CAMPIONI TRATTATI IN CO₂ SUPERCRITICA

Per concludere il capitolo sul lavoro sperimentale, viene presentato uno studio preliminare di impregnazione di CD con vitamina D. Come anticipato, lo scopo di questa tesi è quello di ottenere degli ibridi CD-silice che possano essere impiegati per veicolare la vitamina D in ambito topico. In previsione di tale sviluppo, sono state effettuate delle prove per impregnare la CD con vitamina D tramite trattamento in CO₂ supercritica. Dagli studi presenti in letteratura [25], [71] e [72], emergono una serie di vantaggi nell'uso del solvente supercritico rispetto ai trattamenti tradizionali. Le tecniche convenzionali di complessazione della ciclodestrina/farmaco presentano molti svantaggi, tra i quali figurano: il possibile contenuto residuo di solventi tossici, la degradazione di farmaci termolabili e la difficoltà nel controllare la dimensione e la morfologia delle particelle [GH]. Tali problematiche possono essere superate con la l'innovativa tecnologia di impregnazione che sfrutta le proprietà della CO₂ supercritica (scCO₂). Tali proprietà si possono brevemente riassumere nel fatto che la CO₂ possiede un punto critico a pressione e temperatura relativamente blande e quindi facilmente raggiungibili dal punto di vista tecnologico, nonché in un potere solvente regolabile tramite una semplice variazione di temperatura e pressione, oltre al grande vantaggio di non presentare residui di solvente nei campioni dopo la sua semplice depressurizzazione alle condizioni ambientali. [71]

5.4.1 Trattamento in CO₂ supercritica (scCO₂): nozioni generali

L'impregnazione tramite CO₂ supercritica è un particolare trattamento di impregnazione che consente di evitare l'utilizzo dei tradizionali solventi organici e può essere annoverata come una nuova tecnologia sostenibile che consente di incorporare farmaci, dissolvendoli in fluidi compressi altamente volatili. Il trattamento in scCO₂ in realtà ha molteplici campi di

applicazione: estrazione del burro di cacao, reazioni di natura catalitica ed enzimatica [73] ed estrazione sequenziale di caffeina e catechina dal tè [74].

Al di sopra di una certa temperatura e pressione, un fluido si comporta come un fluido supercritico (SCF). Nel caso specifico della CO₂, i valori di riferimento sono pari a **31,1°C** per la temperatura e **73,8 bar** per la pressione, come riportato in **Tabella 10**.

Solvents	Critical Temperature (°C)	Critical Pressure (bar)
Carbon dioxide	31.1	73.8
Ethane	32.2	48.8
Ethylene	9.3	50.4
Propane	96.7	42.5
Propylene	91.9	46.2
Cyclohexane	280.3	40.7
Isopropanol	235.2	47.6
Benzene	289.0	48.9
Toluene	318.6	41.1
<i>p</i> -Xylene	343.1	35.2
Chlorotrifluoromethane	28.9	39.2
Trichlorofluoromethane	198.1	44.1
Ammonia	132.5	112.8
Water	374.2	220.5

Tabella 10: Valori critici di pressione e temperatura per vari fluidi. [75]

Al di sopra del punto critico, esiste un'unica fase con caratteristiche intermedie tra un liquido e un gas: la viscosità e il trasferimento di materiale sono simili a quelle di un gas, ma la densità e le caratteristiche di solvatazione sono simili a quelle di un solvente liquido, come evidenziato in **Figura 82**.

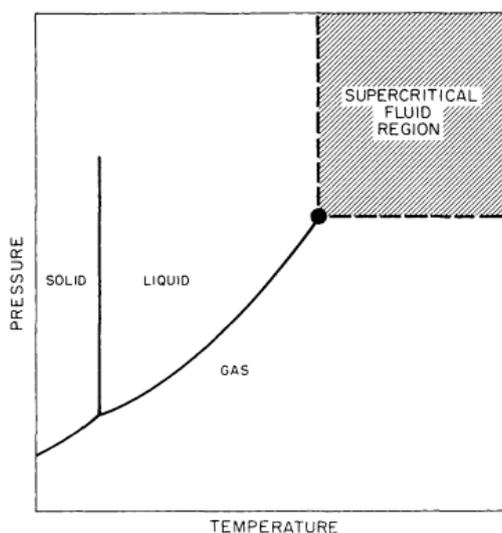


Figura 82: Diagramma di solido-liquido-vapore (SLV) in cui viene rappresentata la variazione della pressione in funzione della temperatura per le trasformazioni di fase) [75]

Nella pratica, la scCO₂ è uno dei fluidi supercritici maggiormente utilizzati poiché è inodore, incolore, non tossico, non infiammabile, non corrosivo, riciclabile, poco costoso e facile da maneggiare [76]. Inoltre, come è stato accennato in precedenza, il suo potere solvente può essere facilmente modulato attraverso la variazione di densità, semplicemente variando la pressione o la temperatura. [71]. Inoltre, abbassando la pressione a condizioni ambientali CO₂ è un gas, condizione che lo rende facilmente separabile dal soluto. Tutti questi vantaggi rendono la scCO₂ interessante per l'incorporazione di farmaci, ma anche per l'estrazione di

molecole da matrici solide, in quanto rappresenta un'alternativa promettente per separare i componenti termicamente sensibili.

Tuttavia, la $scCO_2$ presenta alcune limitazioni, legate alla sua struttura molecolare. L'anidride carbonica, infatti, è una molecola lineare senza alcun momento dipolare netto; essa possiede un potere solvente piuttosto limitato verso specie polari e ioniche [77]. Di conseguenza, non è utilizzabile come unico solvente con tutti i composti, ma è possibile aumentarne la polarità aggiungendo un co-solvente. Per tale scopo, l'etanolo e il metanolo sono i co-solventi maggiormente utilizzati. [77]

Come chiarisce l'elaborato redatto da Gurikov e Smirnova [78], esistono soluti più o meno solubili in anidride carbonica supercritica che si possono così classificare:

- **Altamente solubili** (solubilità $\geq 10^{-3}$ mol) come l'ibuprofene
- **Moderatamente solubili** ($10^{-5} \leq$ solubilità $< 10^{-3}$ mol), come la vitamina D₃
- **Scarsamente solubili** (solubilità $\leq 10^{-6}$ mol) come l'idrocortisone

In generale, l'impregnazione tramite fluidi supercritici prevede tre fasi, mostrate in **Figura 83**: nella prima avviene la dissoluzione del farmaco nel solvente in condizioni supercritiche, nella seconda avviene l'assorbimento e l'impregnazione del farmaco all'interno del supporto prestabilito; infine nella terza avviene la depressurizzazione del sistema e l'estrazione del campione. [76]

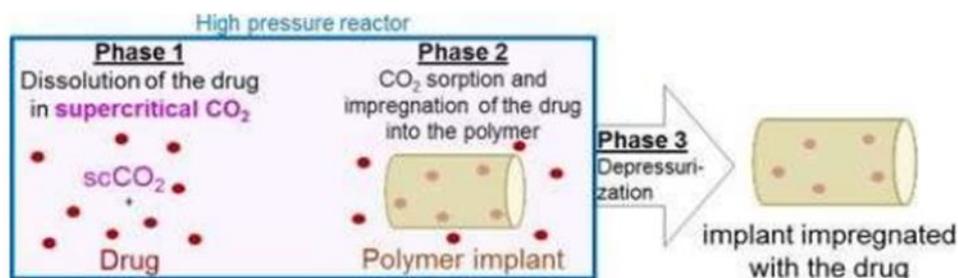


Figura 83: Rappresentazione schematica di un processo di estrazione di CO_2 supercritica. [79]

5.4.2 $ScCO_2$ e CD

Non tutte le CDs possiedono la medesima solubilità in CO_2 supercritica. Proprio per questo motivo è possibile categorizzare due tipi di sistemi ovvero quelli solubili $scCO_2$ e quelli insolubili in $scCO_2$. In **Figura 84** viene rappresentata una tabella che racchiude in modo schematico la suddivisione dei vari tipi di **CDs** al variare della solubilità. L'elenco comprende le tre ciclodestrine presenti in natura (α -CD, β -CD e γ -CD) e alcuni derivati modificati tramite reazioni successive. La motivazione per cui esse sono insolubili in CO_2 supercritica è legata al carattere più o meno idrofilico della molecola. [71]

	Cyclodextrin	Acronym
ScCO ₂ -insoluble	α-cyclodextrin	αCD
	β-cyclodextrin	βCD
	γ-cyclodextrin	γCD
	hydroxypropyl-β-cyclodextrin	HPβCD
	hydroxypropyl-γ-cyclodextrin	HPγCD
	methyl-β-cyclodextrin	βCD
ScCO ₂ -soluble	dimethyl-β-cyclodextrin	DMβCD
	trimethyl-β-cyclodextrin	TMβCD
	perfluorobutanoyl-γ-cyclodextrin	FAγCD
	peracetylated-β-cyclodextrin	PAβCD
	triacetyl-β-cyclodextrin	TAβCD

Figura 84: Tabella riassuntiva della solubilità al trattamento di CO₂ supercritica: nella prima metà tutte quelle insolubili, nella seconda tutte quelle solubili [71]

5.4.3 Principi di funzionamento impregnazione CO₂ supercritica

Le tecniche di impregnazione con solvente supercritico (**SSI**) mirano a raggiungere la complessazione host-guest del sistema farmaco/CD in condizioni supercritiche prima della depressurizzazione. Il farmaco e la CD posizionati sotto forma di pastiglie nel vessel, chiuso tra le valvole V1 e V2, sono messi in contatto con scCO₂ in un reattore posizionato in un'autoclave, in condizioni di temperatura e pressione costante per un certo periodo di tempo. La procedura viene terminata tramite una rapida decompressione fino alla pressione atmosferica, che comporta la gassificazione di CO₂ e la sua separazione dal complesso ottenuto. Le diverse configurazioni disponibili nella letteratura differiscono per il tipo e modalità di funzionamento del recipiente di impregnazione, come rappresentato in **Figura 85** (a destra).

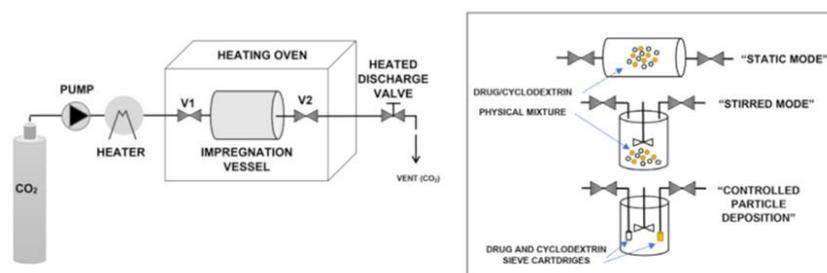


Figura 85: Rappresentazione schematica di un impianto caratteristico per l'impregnazione del campione con CO₂ supercritica a sinistra. A destra invece rappresentazione delle tre modalità di impiego del solvente con modalità statica, in agitazione o deposizione particellare controllata. [71]

La configurazione più semplice, che è tra l'altro anche quella impiegata nel presente lavoro di tesi, è la "modalità statica". Questa procedura è stata anche nominata da alcuni autori come "maturazione" supercritica o, più in generale, "maturazione" [80]. L'autoclave viene prima purificata con CO₂ gassosa per rimuovere l'aria residua, dopodiché il sistema viene riscaldato e pressurizzato fino al raggiungimento delle condizioni desiderate, e ivi mantenuto in condizioni statiche per un tempo prefissato. Le condizioni impiegate, nel caso specifico del presente lavoro, sono mostrate in **Tabella 11**.

TEMPERATURA	PRESSIONE	TEMPO
50°C	8 Mpa	8 h

Tabella 11: Condizioni operative per impregnazione con CO₂ supercritica [76]

La scelta dei parametri è stata fatta in base ai dati presenti in letteratura. [71]

5.4.4 Descrizione delle varie prove di impregnazione

La tecnica prevede che in un cilindro in quarzo venga alloggiata una pastiglia di **Fase 1** (il campione impregnante) dal peso di circa 200 mg. All'interno del "vessel" viene introdotta una pastiglia di **Fase 2** (la CD da impregnare) separata dalla prima tramite un filtro di carta dello stesso diametro del cilindro. Durante il processo d'impregnazione la **Fase 1**, solubile in scCO₂, diffonde tramite i pori del filtro, impregnando la **Fase 2**, insolubile in scCO₂. Tutto il sistema è rappresentato come mostrato in **Figura 86**. Alle estremità del "vessel" viene posizionata della lana di vetro per evitare contaminazioni esterne e dispersione delle polveri nel reattore.

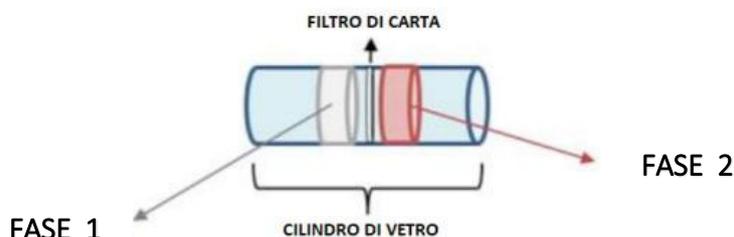


Figura 86: Schematizzazione dell'autoclave adoperato nel reattore d'impregnazione di CO₂ supercritica: nel cilindro in quarzo viene inserito un sottile strato di carta che fa da tramite tra due pastiglie di materiale selezionato [76]

La tecnica di impregnazione, è stata eseguita su tre campioni differenti, denominati **β-CDV**, **βCD_sc_CO₂** e **β-mCDV**. Come verrà analizzato per ogni specifico caso, il trattamento in alcuni casi è stato condotto tra due fasi così schematizzabili:

- **β-CDV:** Una pastiglia di vitamina D (**Fase 1**) ed una di β-CD (**Fase 2**)
- **β-mCDV:** Una pastiglia di vitamina D (**Fase 1**) ed una di β-metil-CD (**Fase 2**)

Oltre i due campioni descritti, è stato realizzato un campione denominato **βCD_sc_CO₂**, ottenuto tramite impregnazione in CO₂ supercritica di due pastiglie identiche di β-CD. La sua successiva caratterizzazione ha permesso di comprendere come il trattamento influenzi eventualmente le caratteristiche dell'oligosaccaride.

Una volta ottenuta la polvere impregnata, in tutti e tre i casi essa è stata finemente macinata e successivamente caratterizzata. Gli strumenti analitici comunemente usati includono la calorimetria a scansione differenziale (**DSC**), la diffrazione a raggi X e la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (**FTIR**) [81].

I risultati delle caratterizzazioni dei campioni impregnati tramite scCO₂ vengono presentati qui di seguito unitamente alla caratterizzazione della vitamina D (usata come confronto).

5.4.5 Vitamina D

FTIR

Lo spettro infrarosso in **Figura 87** mostra le bande di assorbimento caratteristiche della vitamina D. Si può osservare un ampio picco intorno alla lunghezza d'onda di 3400 cm^{-1} attribuibile allo stretching del legame O-H. Lo spettro mostra gli stretching dei gruppi $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ a 2925 cm^{-1} [82]. Inoltre, si osservano tre picchi, con il principale a 1647 cm^{-1} dovuto allo stretching C=C e bande nell'intervallo dai 1440 cm^{-1} ai 1460 cm^{-1} dovute ai modi di bending dei legami C-H.

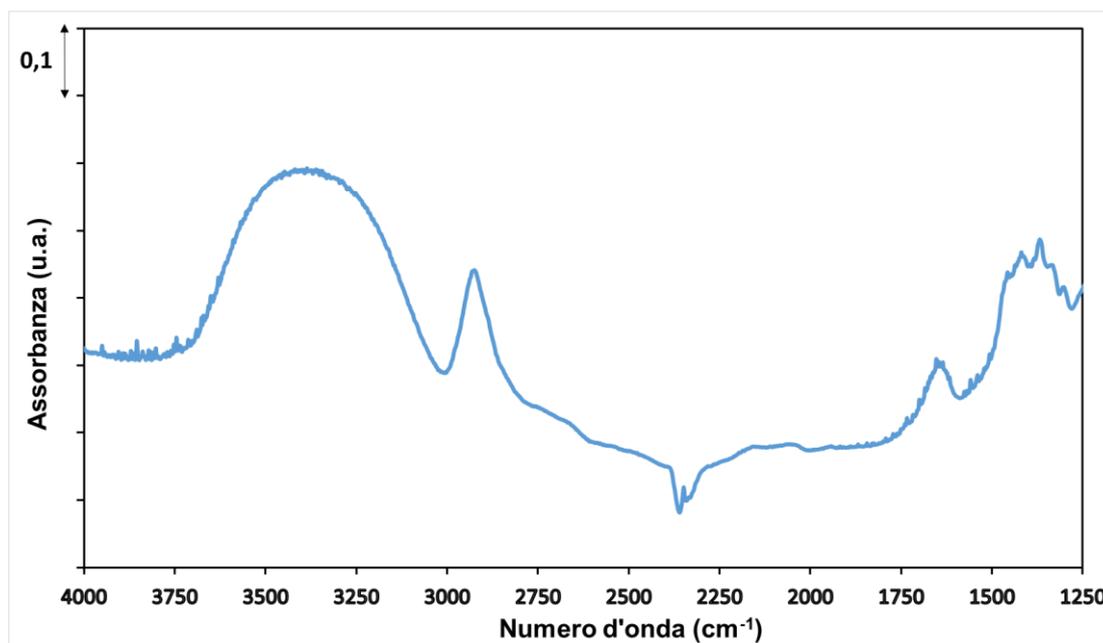


Figura 87: Spettro FTIR del campione Vitamina D in vuoto.

TGA

L'analisi termica sul campione Vitamina D mostra un andamento monotono decrescente in tutto il range di temperatura osservato. Dal termogravigramma in **Figura 88** è possibile valutare che nel range compreso tra la temperatura ambiente e 150°C , il sistema perde circa il 4,0 % della massa, fenomeno attribuibile alla perdita d'acqua contenuta nel campione. Nel range compreso tra 150 e 800°C , invece, si osserva una perdita della totalità della massa iniziale (96,0 %); ciò è attribuibile alla degradazione e volatilizzazione della colecalciferolo.

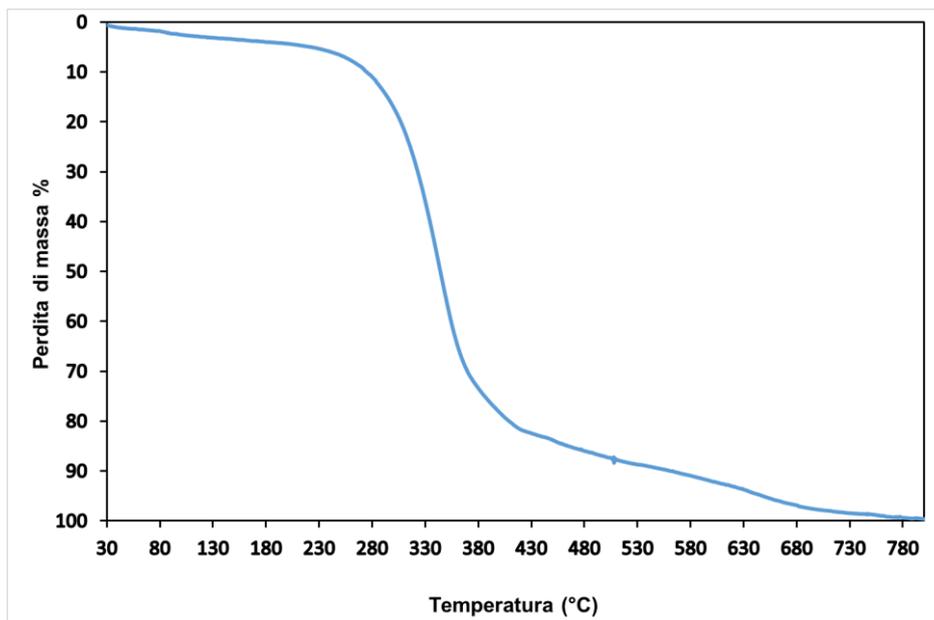


Figura 88: Termogravigramma relativo alla singola Vitamina D. Si nota la presenza di una combustione totale, con la perdita di massa del 10,0 % circa fino a 200 gradi e alla temperatura di 300°C una perdita di massa totale.

DSC

Preventivamente è stata realizzata una caratterizzazione termogravimetrica in DSC della singola Vitamina D, presente in **Figura 89**. I due spettri sono stati confrontati con un lavoro presente di letteratura redatto da J Szejtli e al. (**Figura 90**) [83]. Lo spettro in DSC presenta un'equivalenza di picchi rispetto alla curva presente in letteratura.

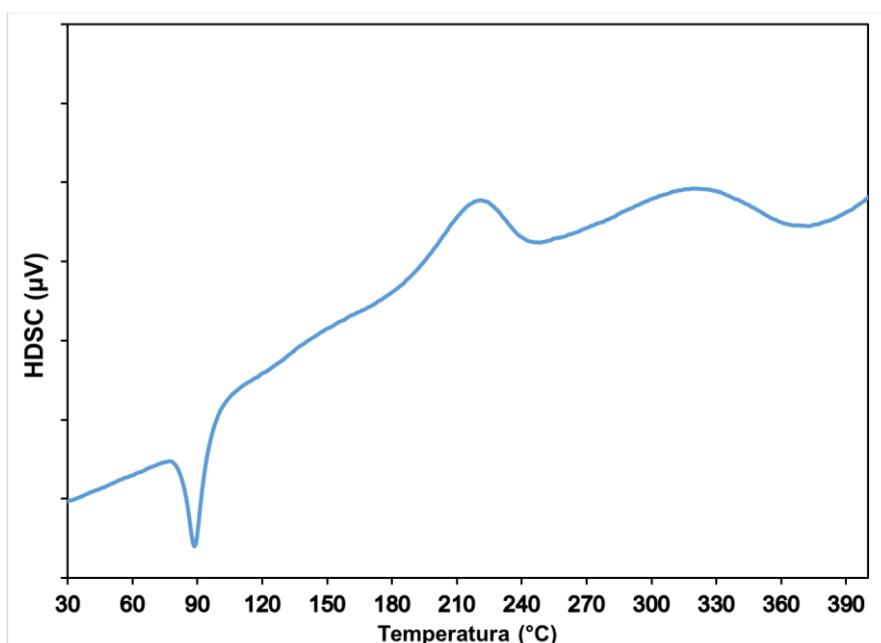


Figura 89: Termogravigramma relativo alla Vitamina D con un segnale in DSC registrato nel range compreso tra 30 e 800°C

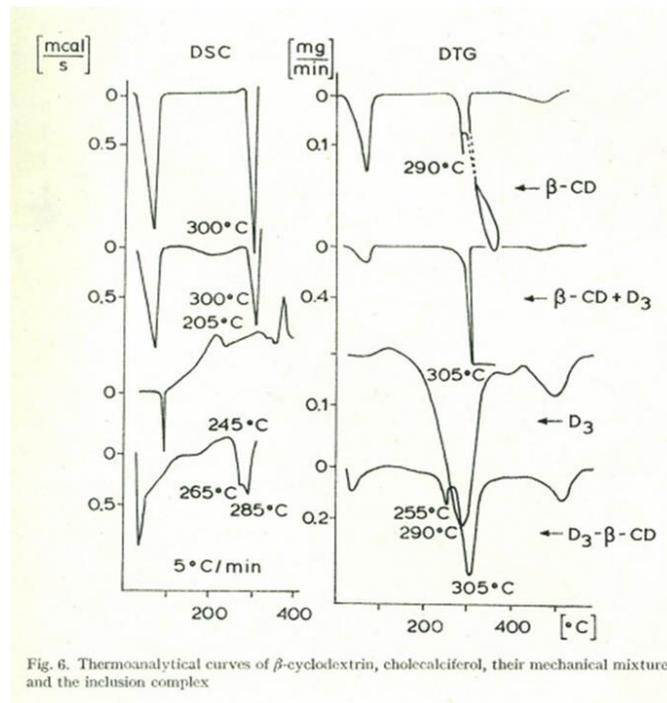


FIGURA 90: Curve termoanalitiche di CD, Vitamina D (colecalfiferolo), una loro miscela meccanica ed un complesso di inclusione. [83]

5.4.6 β -CDV

Il trattamento in CO₂ supercritica ha coinvolto una pastiglia di vitamina D ed una di β -CD. Dopo l'impregnazione, il campione è stato finemente macinato ed è stata effettuata la caratterizzazione completa del sistema, secondo le metodologie riportate nella parte materiali e metodi.

FTIR

Confrontando gli spettri dei campioni di CD, Vitamina D e β -CDV, presenti in **Figura 91**, non si osservano particolari differenze, se non un'inflexione nello spettro del campione β -CDV (probabilmente legato al trattamento in scCO₂) ad un numero d'onda di 2334 cm⁻¹. Si nota nel campione β -CDV un picco caratteristico a circa 2922 cm⁻¹, in un range caratteristico proprio dei modi vibrazionali di stretching dei legami -CH₂ e -CH₃. Tale picco può essere attribuito sia alla CD che alla Vitamina D e, quindi, non conferma la presenza di Vitamina D nel campione β -CDV.

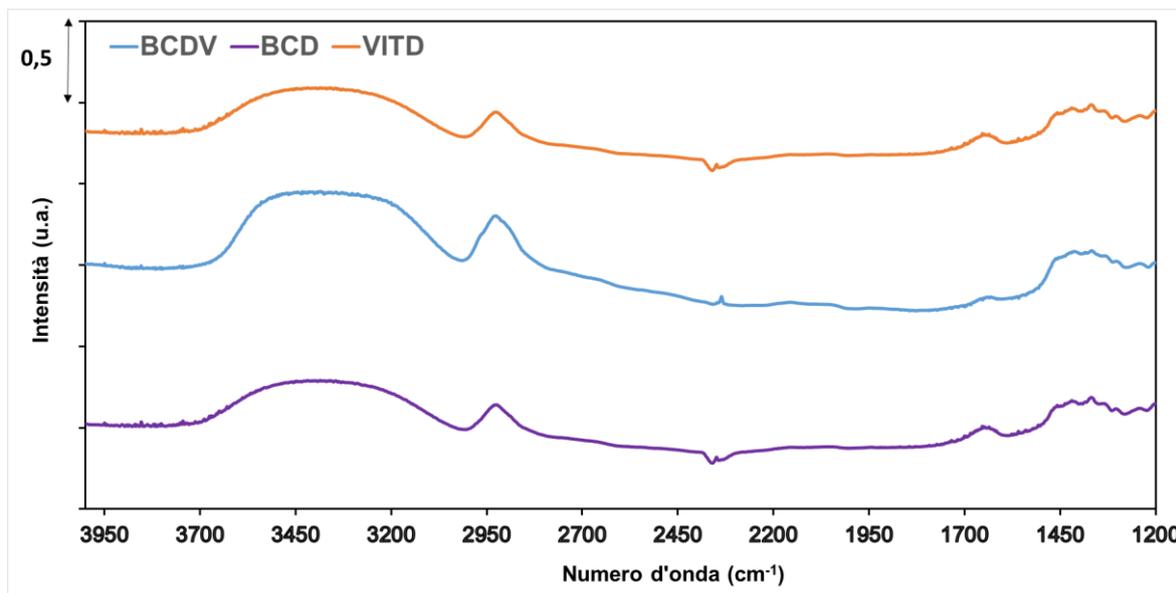


Figura 91: Le due curve caratteristiche dello spettro FTIR del campione CD in vuoto (curva viola), del campione β -CDV in vuoto (curva in azzurro), e del colecalciferolo (curva arancione).

TGA

Dal confronto delle due curve TGA di CD e β -CDV (**Figura 92**) non emerge alcun tipo di differenza nella perdita di massa in funzione della temperatura nel range osservato, se non per una velocità differente tra 150 e 250°C. Entrambe le curve vanno a zero a circa 600°C, poiché i costituenti sono entrambi a base organica, con lo stesso tipo di legami, e quindi degradano nello stesso modo.

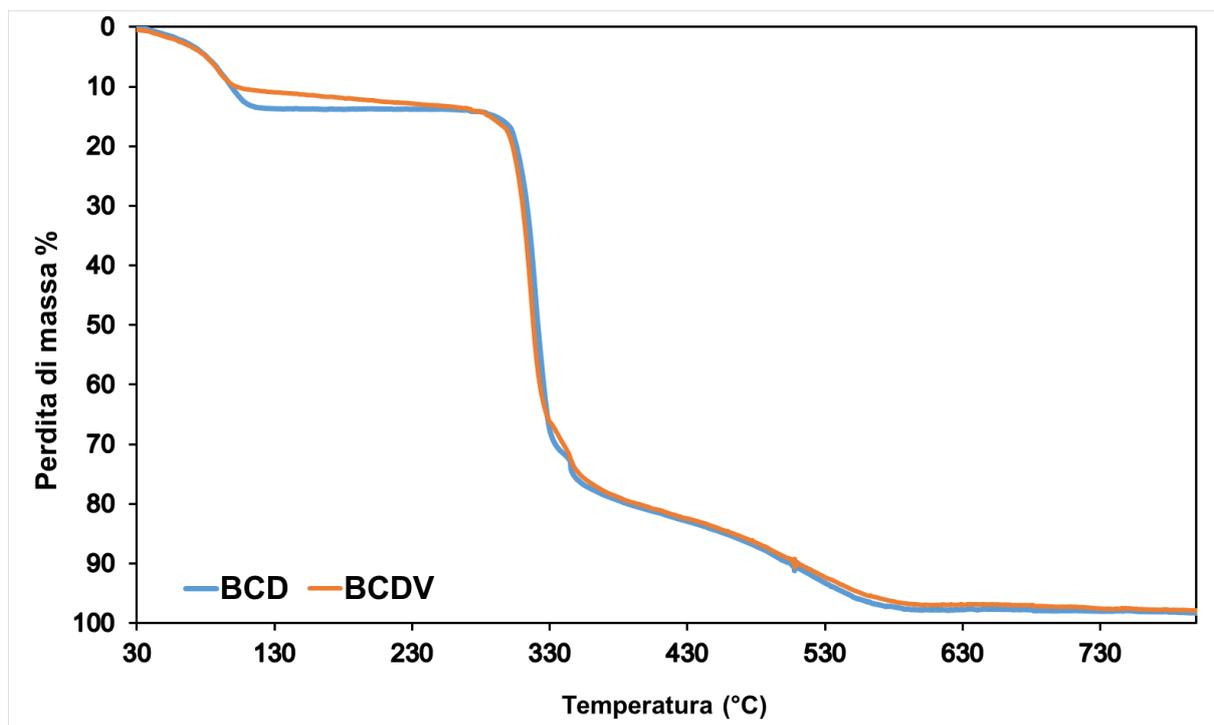


Figura 92: Confronto tra i termogravigrammi in TGA del campione β -CDV (curva arancione) e della singola CD (curva in azzurro) in un range compreso tra 30 e 800°C.

DTGA

Le curve in DTGA (derivata del segnale TGA) dei sistemi CD e β -CDV, sono molto simili (**Figura 93**). Presentano un identico picco endotermico, ad una temperatura di circa 100°C, probabilmente legato al desorbimento dell'acqua. In un range compreso tra 330 e 430°C si evince la presenza di due picchi endotermici, molto ravvicinati in entrambe le curve. Nel caso del campione β -CDV i due picchi sono di intensità differente: il primo più intenso, il secondo meno. Nel caso della singola CD si osserva, per il secondo picco, un'impennata della curva. Tale andamento risulta coerente con quanto riportato in letteratura (**Figura 94**) e potrebbe essere interpretato con il fatto che a quella temperatura possa essere avvenuta una vera e propria reazione di combustione del costituente organico della CD, con generazione di uno spot di calore e un distacco del campione del crogiolo dove è alloggiato.

In letteratura (**Figura 94**) si possono osservare le misure relative alla CD pura e ad un complesso inclusionale CD-Vitamina D. La differenza risiede nelle differenti temperature, in particolare la curva del complesso presenta un picco a temperatura inferiore. Anche la curva β -CDV presenta un picco ad una temperatura inferiore a quella di CD, ma solo di pochi gradi. Di conseguenza, è probabile che il trattamento non abbia fatto inglobare una quantità significativa di Vitamina D nella CD.

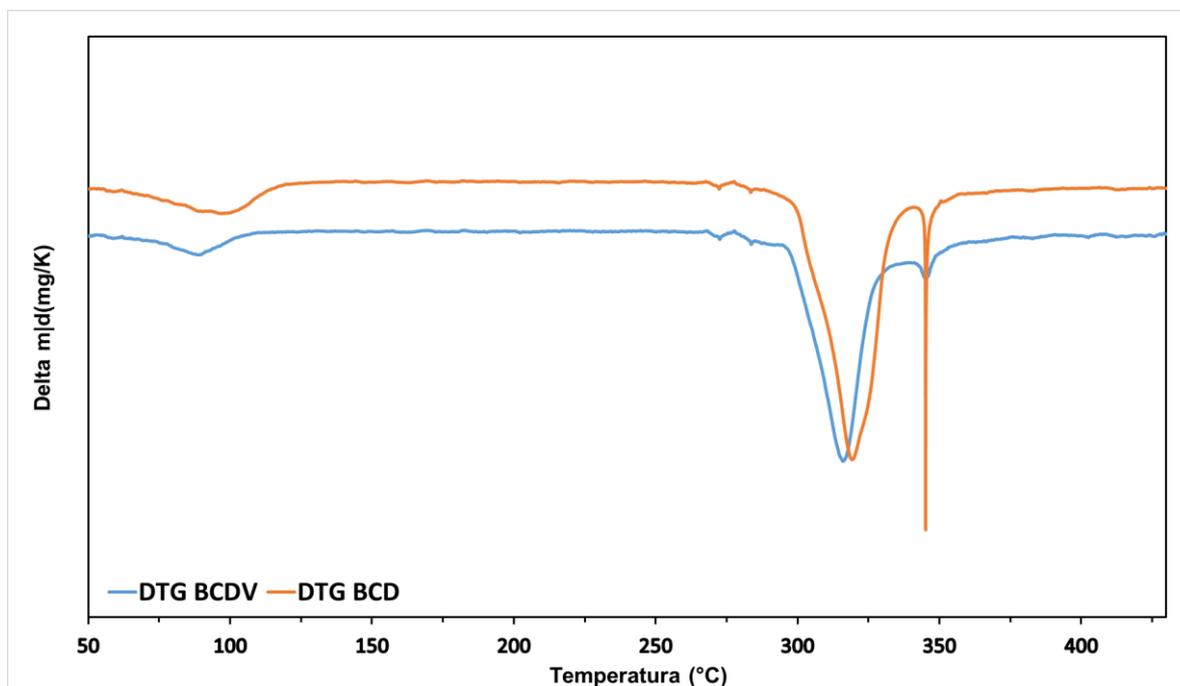


Figura 93: Confronto termogravigramma in dTGA del campione β -CDV (curva in azzurro) e della singola CD (curva in arancione) in un range compreso tra 30 e 800°C.

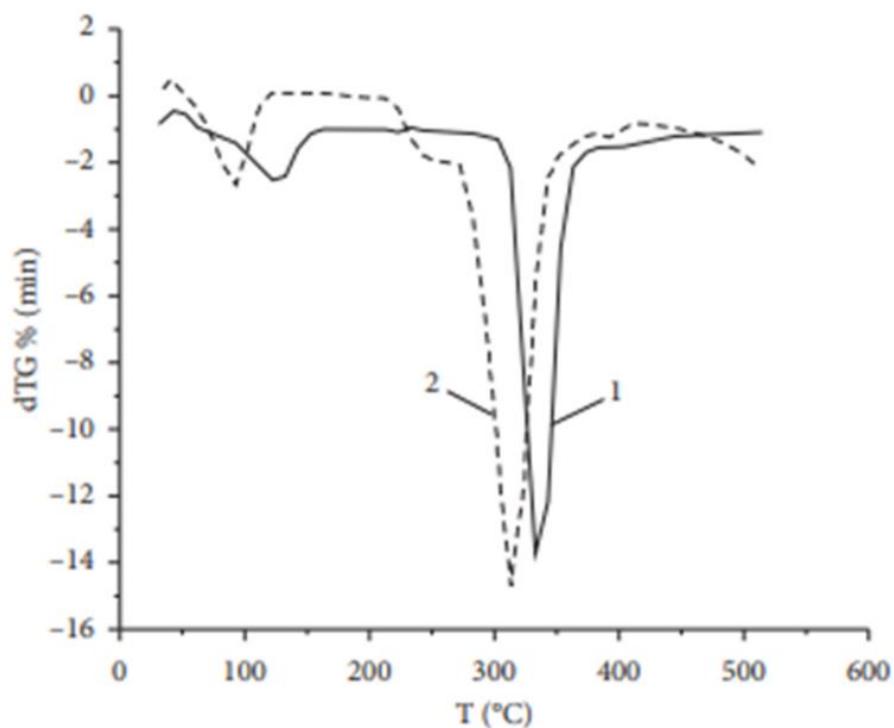


Figura 94: Confronto tra i due termogravigrammi in DTGA relativi ad una singola CD (curva 1) ed ad una miscela fisica di β -CD:Vitamina D_3 in rapporto stechiometrico 2:1 (curva 2) presente nel paper di J. SZEJTLI e al. [63]

XRD

Sul campione β -CDV è stata condotta un'analisi XRD ad alti angoli; lo spettro è stato messo a confronto con quello relativo alla singola CD come presente in **Figura 95**. La posizione dei picchi tra i due spettri è paragonabile, ma le intensità relative sono leggermente diverse. Si può ipotizzare che questa differenza sia dovuta ad un cambiamento dello stato di aggregazione dell'oligosaccaride, indotto dal trattamento in $scCO_2$.

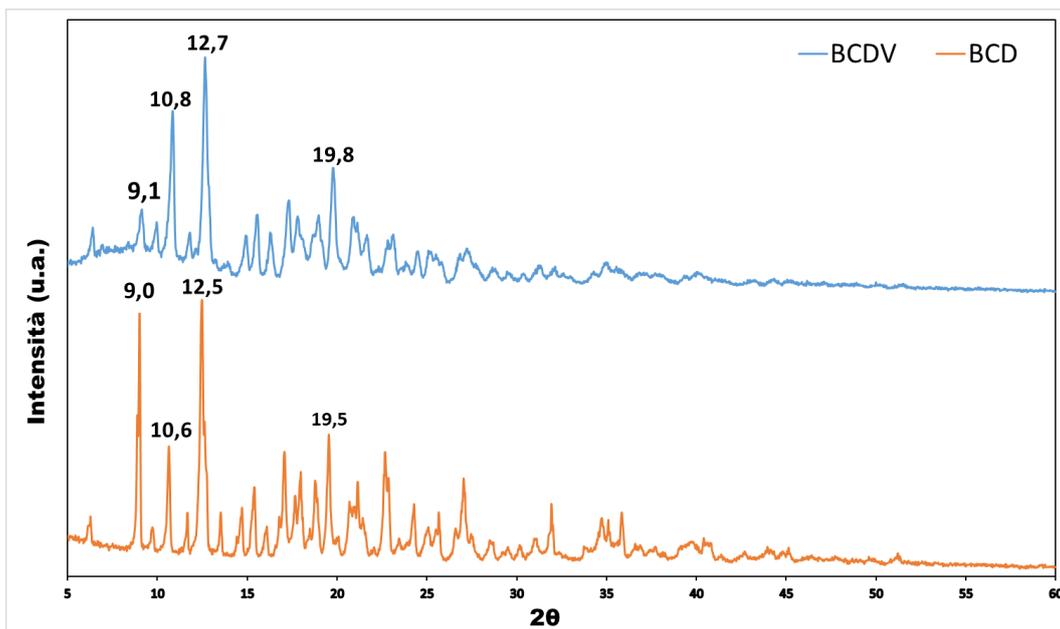


Figura 95: Confronto tra gli spettri XRD del campione β -CDV (curva azzurra) e della CD pura (curva arancione)

5.4.7 β CD_sc_CO₂

Come accennato in precedenza, l'acronimo β CD_sc_CO₂ indica un campione di β -CD che è stato trattato con CO₂ supercritica, nelle medesime condizioni di impregnazione ma senza l'aggiunta di Vitamina D. Tale tipo di campione è stato preparato nell'ottica di capire se, e in che modo, il trattamento scCO₂ influisca sull'oligosaccaride.

FTIR

Il confronto tra gli spettri FTIR della singola CD e della β CD_sc_CO₂ (Figura 96) mette in evidenza una certa sovrapposizione tra i due spettri, sia a livello di intensità che a livello dei picchi caratteristici. L'unica differenza si nota in corrispondenza dell'inflessione presente a 2334 cm⁻¹. Tale inflessione ha due origini differenti che possono essere così riassunte:

- **CD:** inflessione verso il basso legata alla compensazione della CO₂ dello strumento
- **β CD_sc_CO₂:** inflessione rivolta verso l'alto, indice di una possibile contaminazione e presenza di un residuo della CO₂ nel campione di CD.

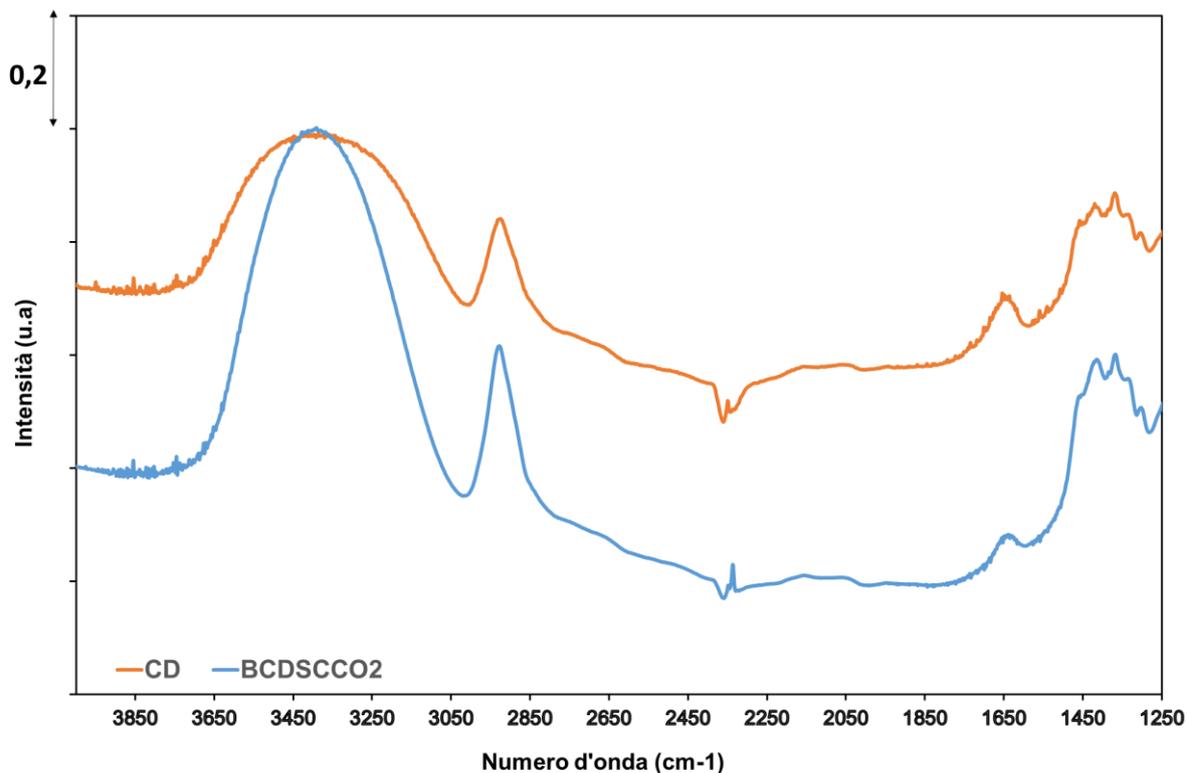


Figura 96: Le due curve caratteristiche dello spettro FTIR del campione CD (curva arancione) e del campione β CD_sc_CO₂ (curva in azzurro).

XRD

Dal confronto degli spettri XRD della singola CD rispetto al campione β CD_sc_CO₂ trattata scCO₂, presenti in **Figura 97** si notano delle differenze ovvero delle variazioni di intensità dei picchi cristallini ma non del relativo valore dell'angolo. Probabilmente il trattamento non altera l'abito cristallino della CD, ma ne cambia solo lo stato di aggregazione.

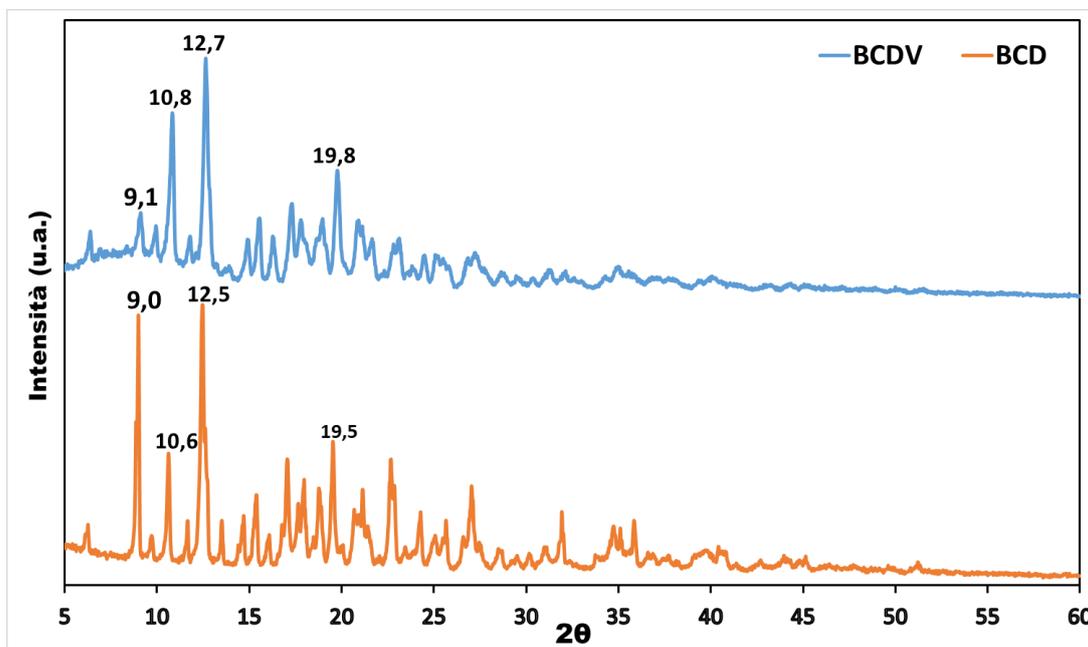


Figura 97: Confronto fra gli spettri XRD dei campioni CD (curva in arancione) e del campione β CD_sc_CO₂ (curva in blu).

5.4.8 β -mCDV

Il trattamento in CO₂ supercritica ha coinvolto una pastiglia di Vitamina D ed una di β -metil-CD. Dopo l'estrazione l'impregnazione, il campione è stato finemente macinato ed è stata effettuata la caratterizzazione completa, secondo le metodologie riportate nella parte materiali e metodi.

FTIR

Al fine di comprendere la differenza tra i vari campioni, in **Figura 98** è presente un confronto tra i quattro spettri allo FTIR, relativi ai singoli oligosaccaridi (β -CD E β -mCD) ed ai campioni sottoposti a impregnazione con CO₂ supercritica (β -CDV e β -mCDV). Da un'analisi dettagliata, emerge quanto segue:

- **β -CD/ β -CDV**: Il confronto, tra gli spettri di colore rosso e verde, mostra lo stesso andamento di variazione dell'assorbanza in funzione del numero d'onda. L'unica differenza sussiste sempre nell'inflessione presente a 2333 cm⁻¹: nel primo caso legato alla compensazione della CO₂ dello strumento, nel secondo caso indice di una possibile contaminazione e presenza di un residuo della CO₂ nel campione di CD.
- **β -mCD/ β -mCDV**: Il confronto tra gli spettri rispettivamente di colore blu e arancione mostra le medesime differenze trattate nel caso β -CD/ β -CDV.

Un ulteriore confronto può esser fatto tra i campioni base di β -CD e di β -mCD: il primo ha un picco poco sotto 2900 cm⁻¹ che, invece, nella β -CD non è presente. Questa differenza è dovuta al fatto che la β -mCD ha sia gruppi -CH₂, che -CH₃ (questi ultimi provenienti dal processo di metilazione) mentre la β -CD ha solo gruppi -CH₂.

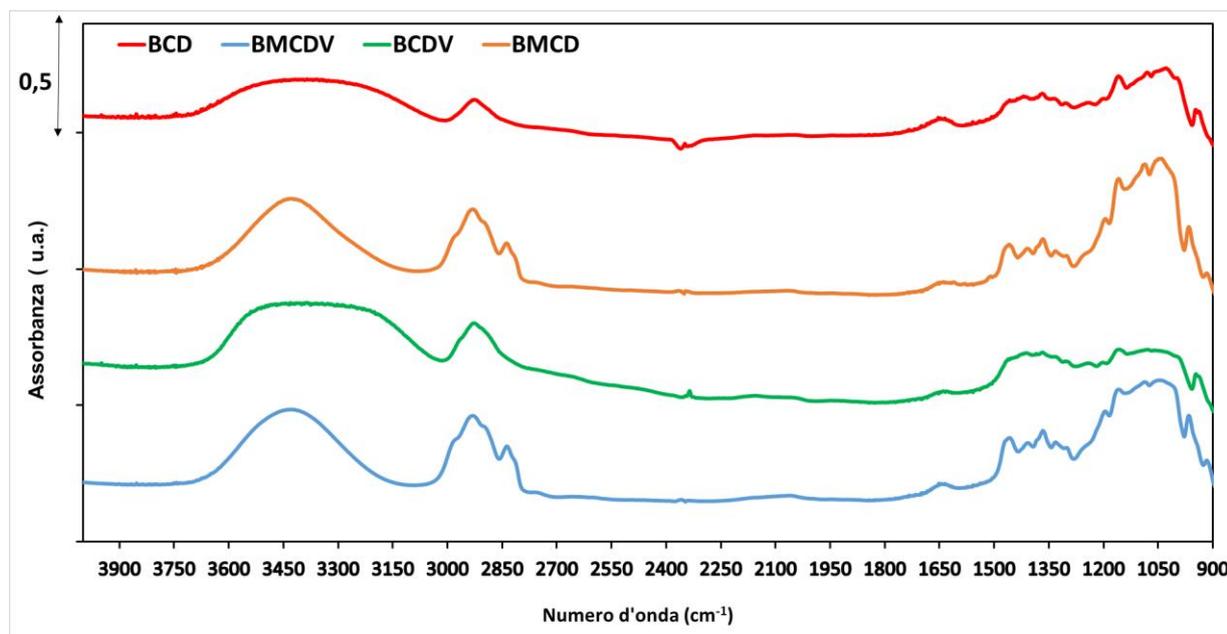


Figura 98: I quattro spettri caratteristici allo FTIR del campione β -mCD (curva verde), β -mCDV (curva in azzurro), β CD (curva rossa), e β -mCD (curva arancione).

XRD

Sul campione β -mCDV è stata condotta un'analisi XRD ad alti angoli; lo spettro è stato messo a confronto con quello relativo alla singola β -mCD, come mostrato in **Figura 99**. Entrambi i campioni mostrano un alone amorfo, con un accenno di due picchi a (circa) 10 e 17°. La differenza principale risiede nel fatto che nel campione β -mCDV sono presenti altri due accenni di picchi a circa 32 e 37°. Tale fenomeno potrebbe essere attribuibile ad una possibile cristallizzazione del campione. Confrontando lo spettro ottenuto in laboratorio con lo spettro nel paper di Ren e al. [84], si osserva come la β -mCD del presente lavoro presenti un ordine diverso da quello del lavoro in esame. (**Figura 100**)

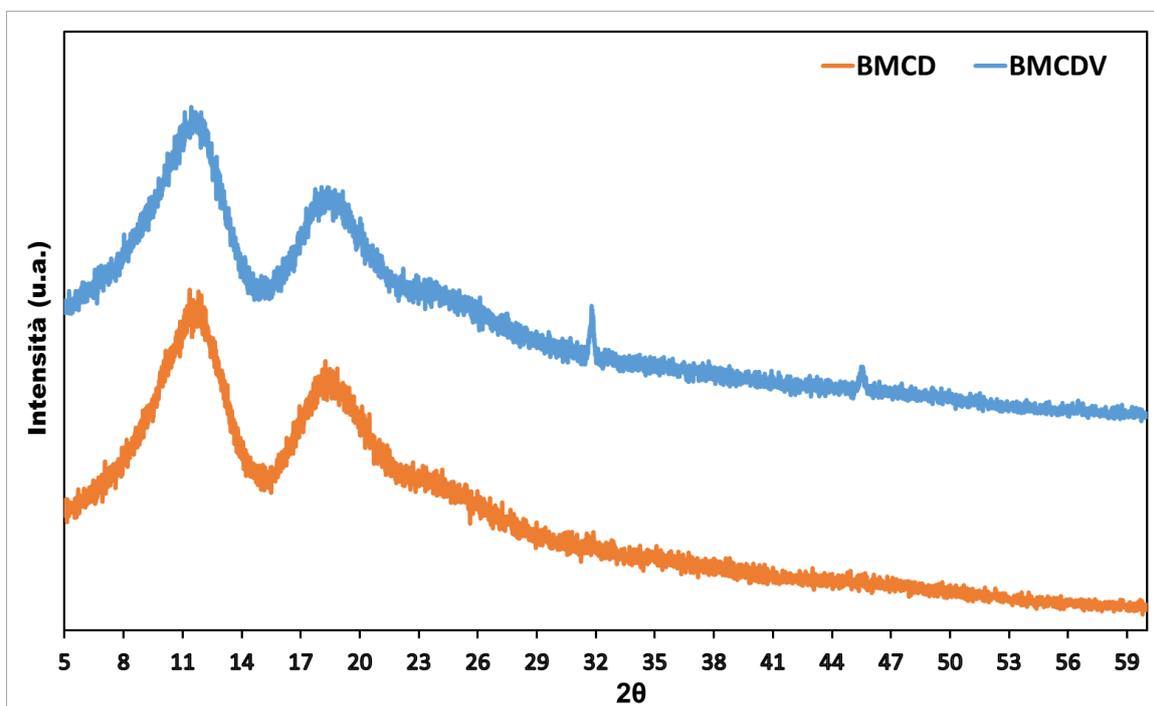


Figura 99: Spettri XRD ad alti angoli dei campioni β -mCDV (curva in azzurro) e β -mCD (curva in arancione).

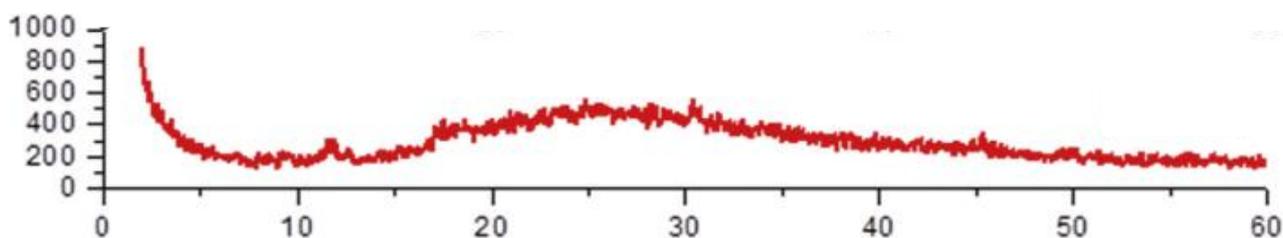


Figura 100: Spettro XRD del singolo campione β -mCD ad alti angoli presente nel paper di Ren e al. [84]

Lo spettro caratteristico presente in **Figura 101** mostra invece l'assenza di nanostrutture nel campione sottoposto al processo di impregnazione con scCO_2 .

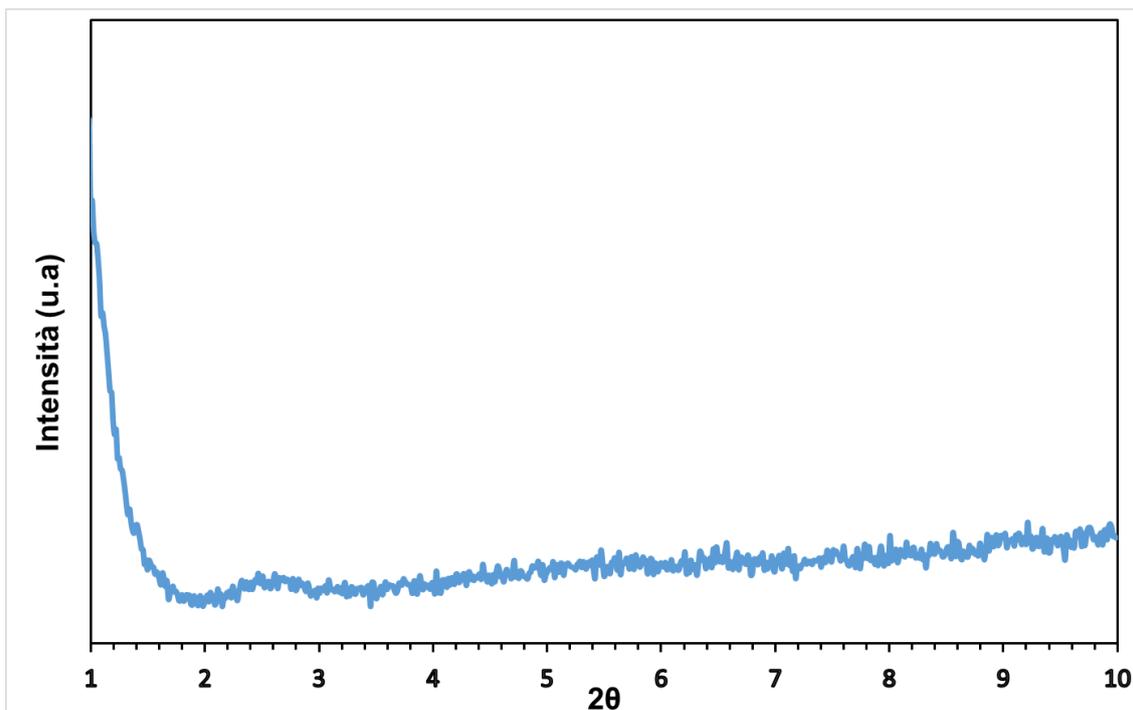


Figura 101: Spettro XRD del campione a bassi angoli.

5.4.9 Test di rilascio in etanolo e acqua dei campioni impregnati con scCO_2

Al fine di quantificare il contenuto di Vitamina D₃ incorporata nella CD e valutare l'efficienza di rilascio del principio attivo, sono stati effettuati dei test preliminari di rilascio in etanolo e acqua.

La vitamina D, come accennato, è un principio attivo liposolubile, per cui ci si aspetta che venga rilasciato in soluzioni non polari, come ad esempio l'etanolo. In aggiunta, visto che il campo finale di applicazione dei materiali prodotti in questo lavoro è quello biomedico, sono stati effettuati dei test in acqua, poiché le soluzioni fisiologiche sono tutte a base acquosa.

Per questo motivo i campioni sono stati immersi sia in etanolo che in acqua e le soluzioni così ottenute sono state analizzate allo spettrofotometro UV/visibile. Questa tecnica sfrutta la solubilità del principio attivo, ovvero la Vitamina D, nei due solventi, responsabili dell'estrazione del principio attivo dalla cavità della CD. Il campione viene disciolto nel solvente scelto e si ottengono successivamente gli spettri UV/visibile delle soluzioni, rispettivamente dopo 5 minuti e 1 ora.

Da un precedente lavoro di tesi [55] con la stessa molecola si evince che 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 alla medesima lunghezza d'onda (**Figura 102**). [55]

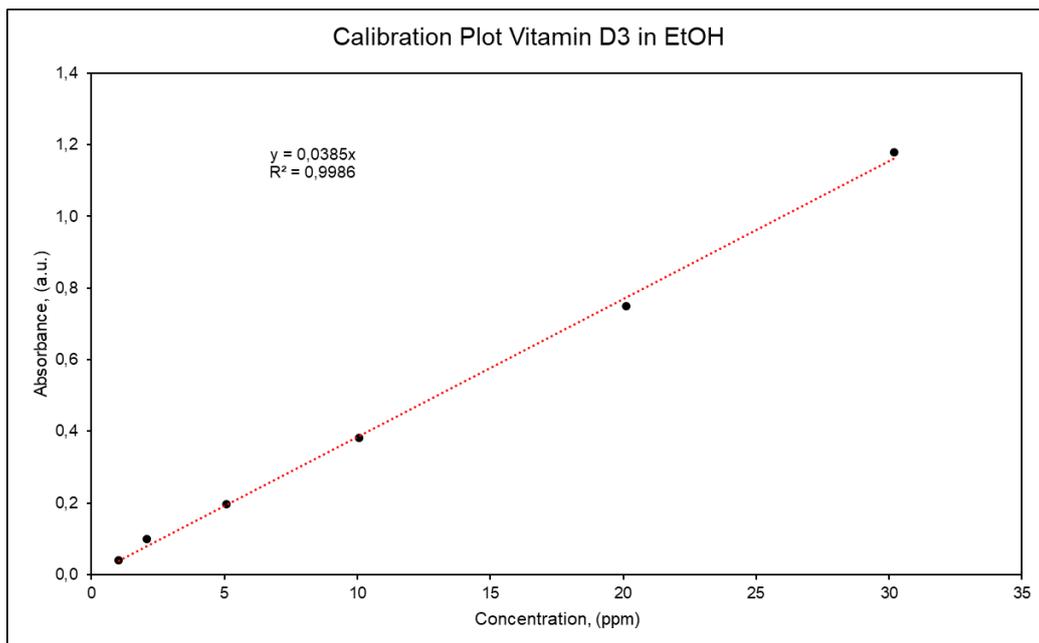


Figura 102: Retta di taratura della Vitamina D in etanolo [55]

5.4.9.1 β -CD in etanolo

Le prime caratterizzazioni effettuate sono state quelle della singola CD in etanolo, dopo 5 minuti e dopo 1 h, mostrate in **Figura 103**. Dall'analisi delle curve non viene messo in evidenza alcun picco caratteristico. Le curve sono state comunque effettuate nell'ottica di costituire un eventuale bianco, utile per il rilascio dei successivi campioni.

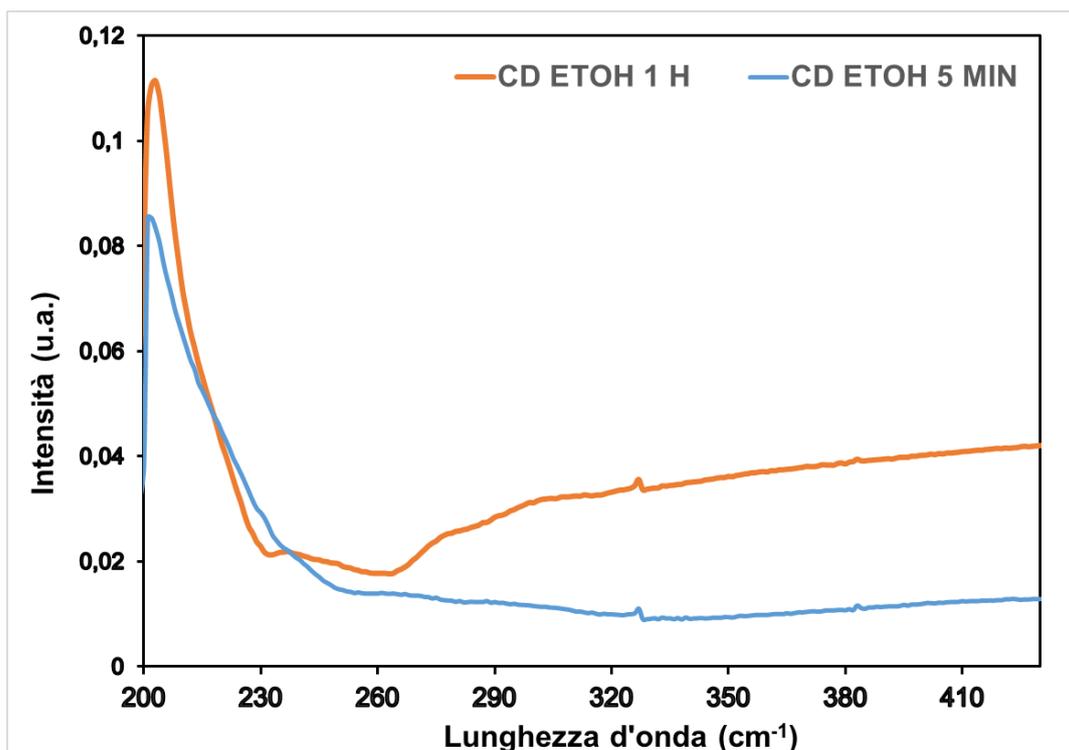


Figura 103: Spettro UV/visibile del campione β -CD in etanolo dopo 5 minuti e dopo un'ora.

5.4.9.2 β -CDV in etanolo

Differente è il caso relativo al campione β -CDV in etanolo, dopo 5 minuti e un'ora in soluzione, come mostrato in **Figura 104**. Per il campione impregnato si osservano due picchi caratteristici, rispettivamente a 254 cm^{-1} (5 minuti) e 252 cm^{-1} (60 min). Tali valori si avvicinano di molto al picco caratteristico della Vitamina D, presente nel lavoro sopra citato di tesi [55]. Per tale motivo è stato quindi possibile utilizzare la relativa retta di taratura, presente in **Figura 105**. Da calcoli effettuati si evidenzia come il rilascio per tempi così brevi si aggiri a valori molto contenuti (al massimo dello **0.45 %** in massa dopo 60 minuti).

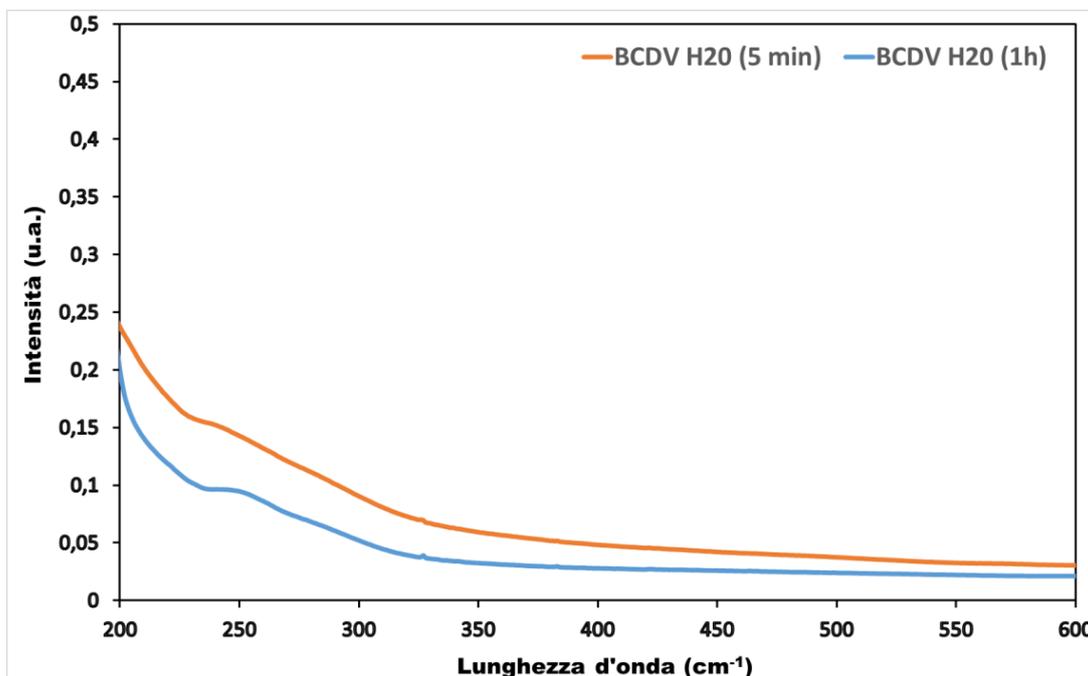


Figura 104: Spettro UV/visibile del campione β -CDV in etanolo dopo 5 minuti e dopo un'ora.

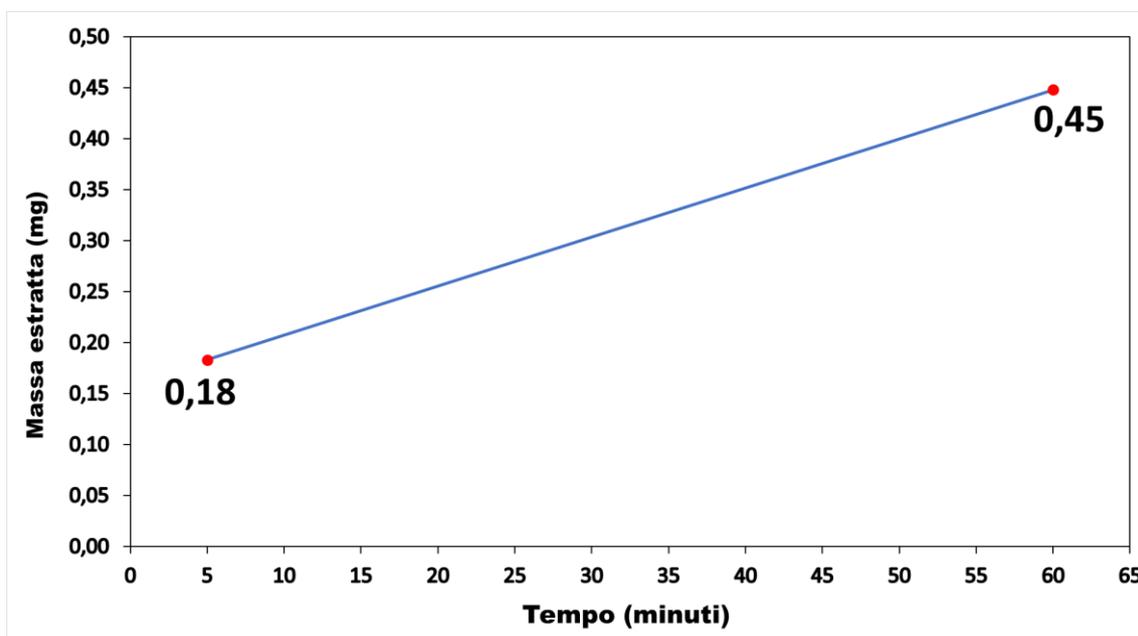


Figura 105: Percentuale in massa di Vitamina D_3 estratta dal campione β -CDV in etanolo.

Per comprendere il meccanismo di protezione e rilascio della CD sul principio attivo, sono state messe a confronto le curve ottenute con precedenti lavori, come mostrato in **Figura 106**. In tale grafico vengono riportate le curve di assorbanza della vitamina D pura in etanolo e di due campioni (*SBA_IWI* e *SBA_scCO₂*) dai quali viene rilasciata vitamina D in forma degradata. È possibile notare come gli spettri del campione β -CDV (rispettivamente curva azzurra (5 minuti) e curva azzurra rossa (60 minuti)) presentino un picco, proteso verso destra rispetto a quelli dei campioni *SBA_IWI* e *SBA_scCO₂* e più vicino, quindi, allo spettro della Vitamina D pura.

Tale misura dimostra quindi la presenza del principio attivo nel complesso, nonché l'assenza di degradazione marcata.

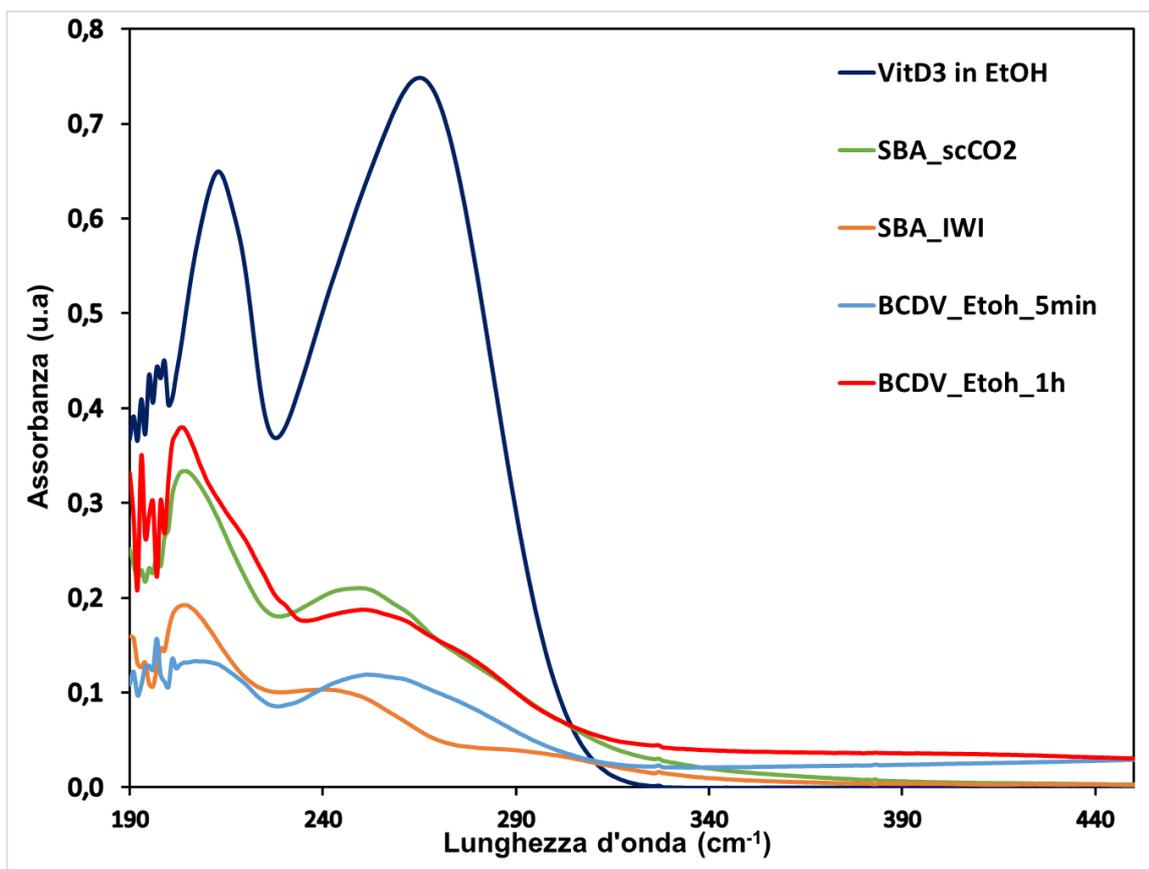


Figura 106: Spettro UV/visibile del campione β -CDV in etanolo dopo 5 minuti e dopo un'ora, a confronto con precedenti ricerche. [35] – [55]

5.4.9.3 β -CDV in acqua

In **Figura 107** e **Figura 108** vengono proposte le curve relative al rilascio, rispettivamente della singola CD e del campione β -CDV, in acqua distillata. Dall'analisi di entrambi gli spettri emerge, l'assenza di rilascio. Tale conclusione è supportata dall'assenza di picchi negli spettri.

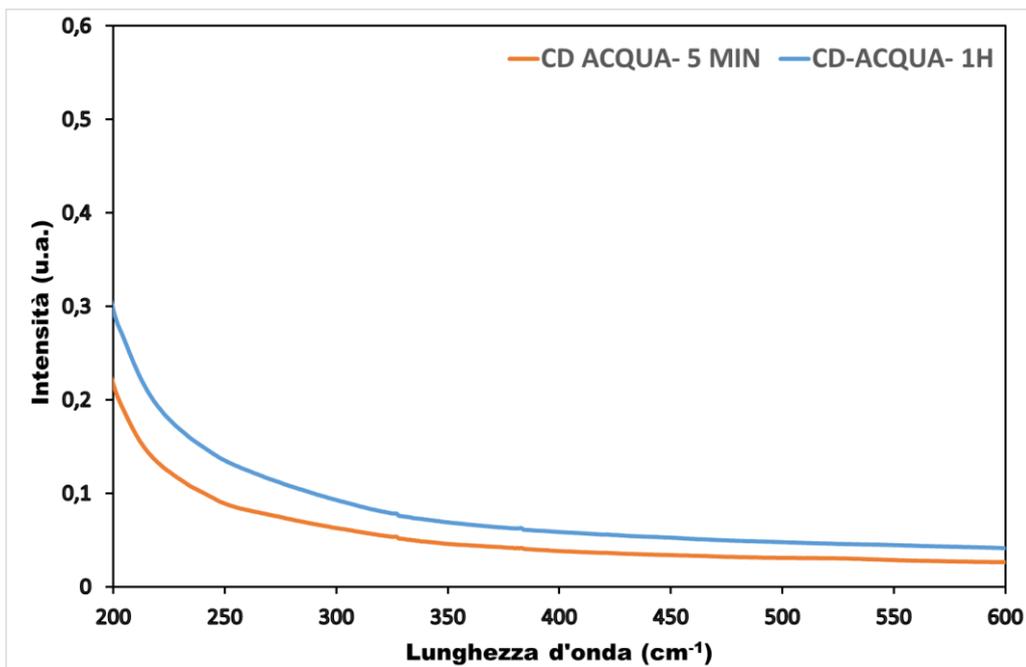


Figura 107: Spettri UV/visibile del campione CD in acqua dopo 5 minuti e dopo un'ora.

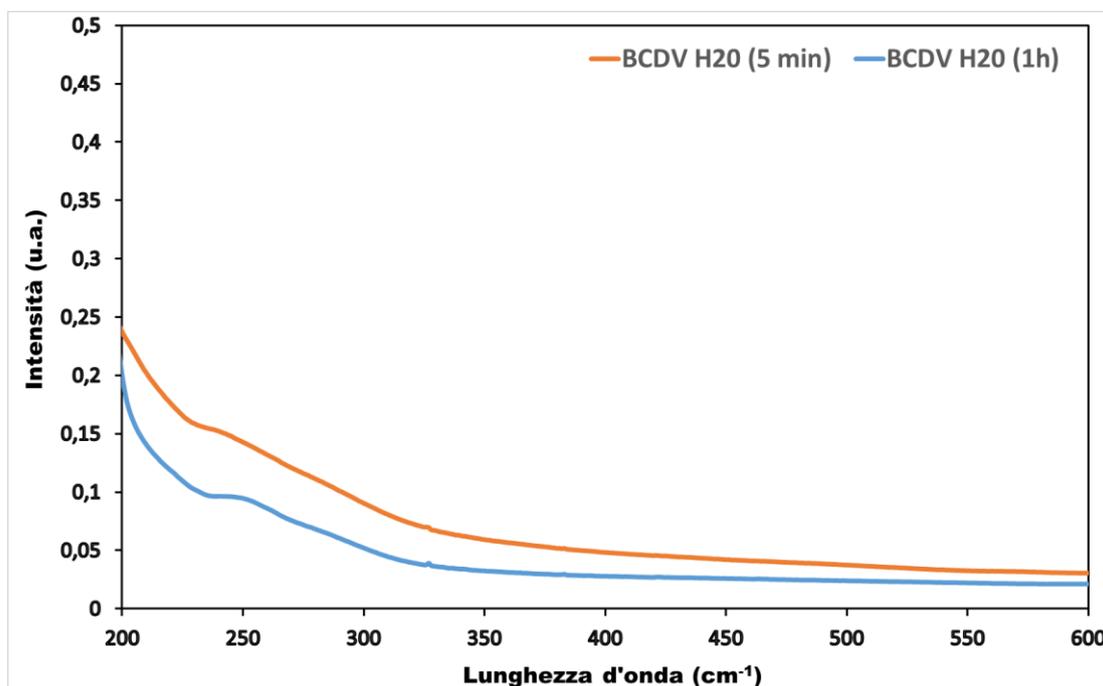


Figura 108: Spettri UV/visibile del campione β -CDV in acqua dopo 5 minuti e dopo un'ora.

5.4.9.4 β -mCDV in etanolo

In Figura 109 è possibile confrontare lo spettro UV/visibile dei campioni β -CDV e β -mCDV in etanolo, entrambi effettuati dopo 5 minuti. La prima differenza tra i due spettri risiede nell'intensità del segnale per le due curve che risulta maggiore per il β -mCDV rispetto al β CDV. Tale diversità può essere attribuita ad una maggiore quantità di principio attivo incorporato nella β -mCD. Un'altra importante differenza è evidenziata per il picco di emissione, spostato verso destra per il campione β -mCDV, ad una lunghezza d'onda di 264 cm^{-1} superiore di 12 cm^{-1} rispetto al campione β CDV. Tale valore si avvicina al valore della

Vitamina D pura [55] e indica che la β -mCD è più efficace della β -CD nel proteggere la Vitamina dalla degradazione.

Per le curve di rilascio dopo un'ora, presentate in **Figura 110**, si possono ripetere le stesse considerazioni fatte per la **Figura 109**: presenza di un'intensità maggiore del segnale e un picco caratteristico spostato verso lunghezze d'onda maggiori nel caso del campione con β -mCD.

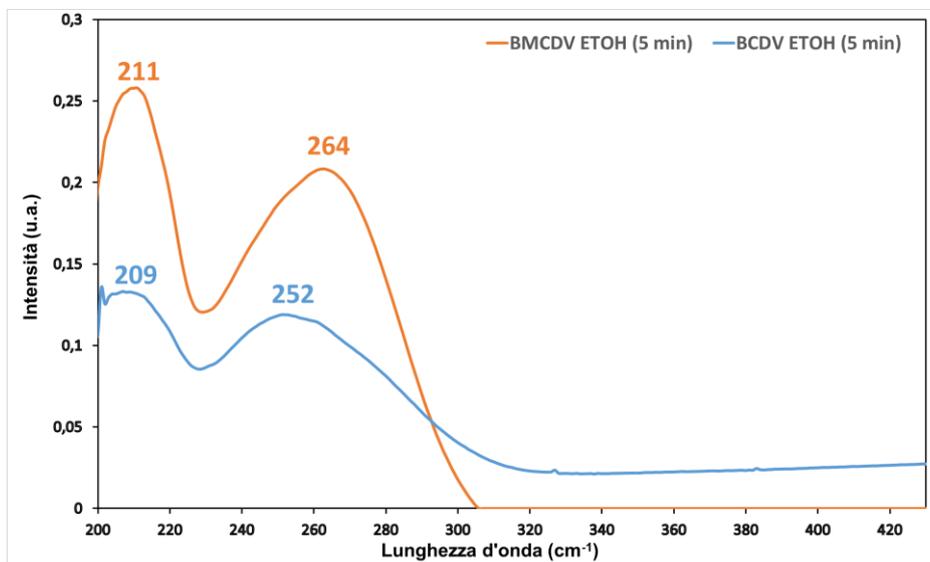


Figura 109: Spettri UV/visibile dei campioni β -CDV (curva blu) e β -mCDV (curva arancione) in etanolo, dopo 5 minuti.

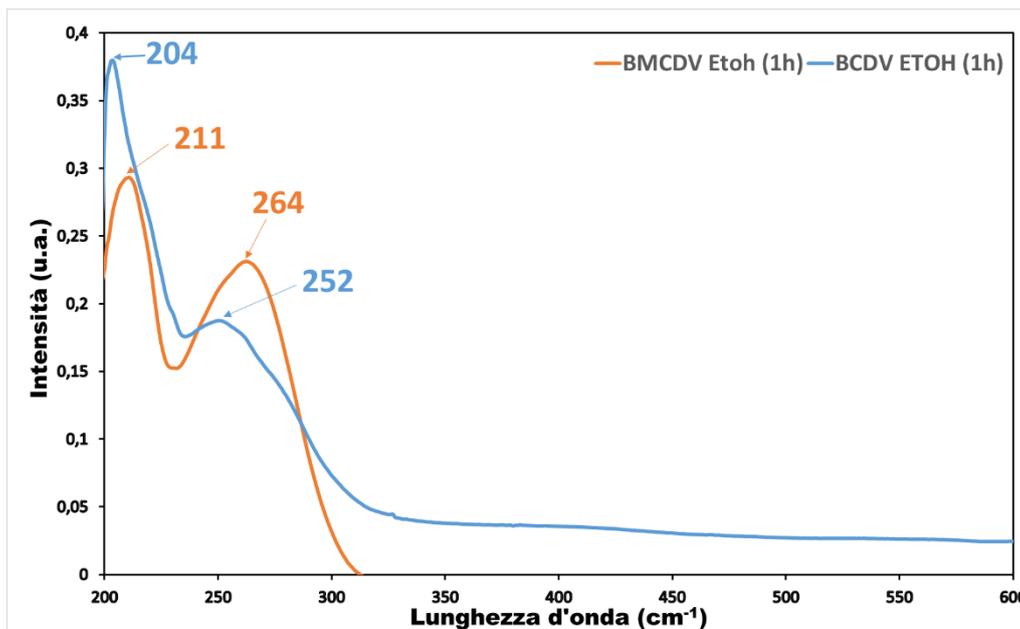


Figura 110: Spettri UV/visibile dei campioni β -CDV (curva blu) e β -mCDV (curva arancione) in etanolo, dopo 60 minuti.

Gli spettri UV/visibile dei campioni β -mCDV sono stati sovrapposti al grafico precedente (**Figura 105**), ottenendo il set di curve in **Figura 111**. Confrontando gli spettri del campione β -mCDV (curva viola e curva gialla) con la Vitamina D pura (curva blu), emerge come tale sintesi abbia un buon effetto di protezione, poiché la curva possiede un andamento simile, alle medesime lunghezze d'onda.

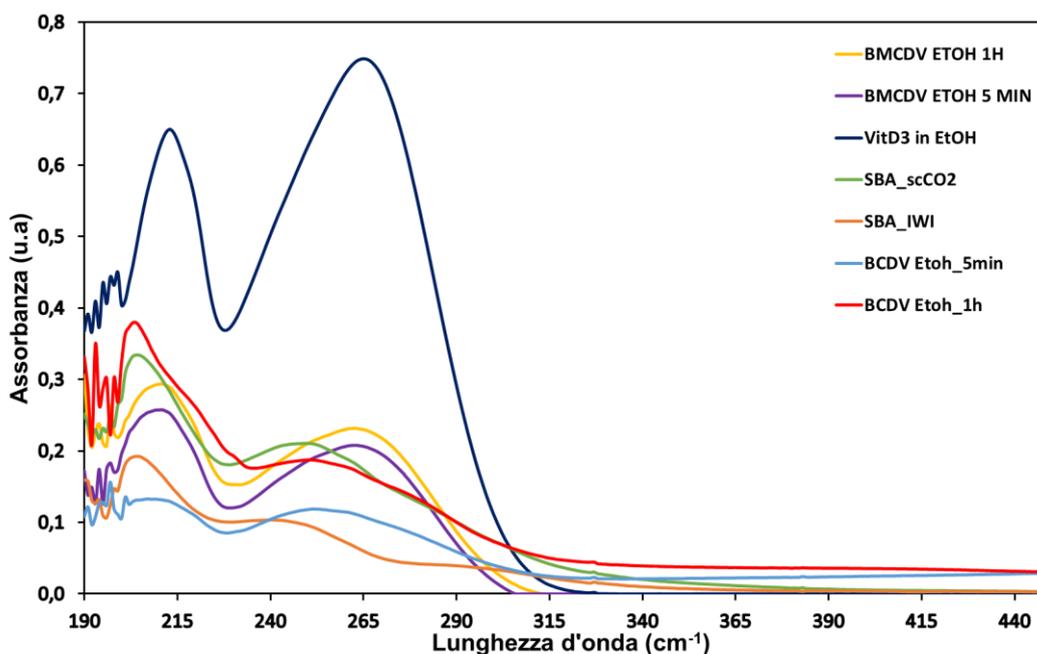


Figura 111: Spettri UV/visibile del campione β -mCDV in etanolo dopo 5 minuti e dopo 1 h, a confronto con le curve relative al campione β -CDV e precedenti ricerche. [35]–[55]

Da calcoli effettuati tramite la retta di taratura [55] si evidenzia che il rilascio per tempi così brevi assume valori altrettanto contenuti (al massimo di **0,57 %** in massa dopo un'ora), come evidenziato in **Figura 112**. Il valore è di poco superiore al rilascio del campione precedente, ma comunque contenuto.

Questi risultati portano a concludere che la tecnica di impregnazione con scCO₂ non è la più adatta per incorporare la vitamina D nelle CDs. Tuttavia, questi dati confermano l'efficacia della CD (in particolar modo della β -mCD) nel proteggere la vitamina D dalla degradazione e supportano, quindi, la validità dell'idea di formare un materiale ibrido silice-CD-vitamina D.

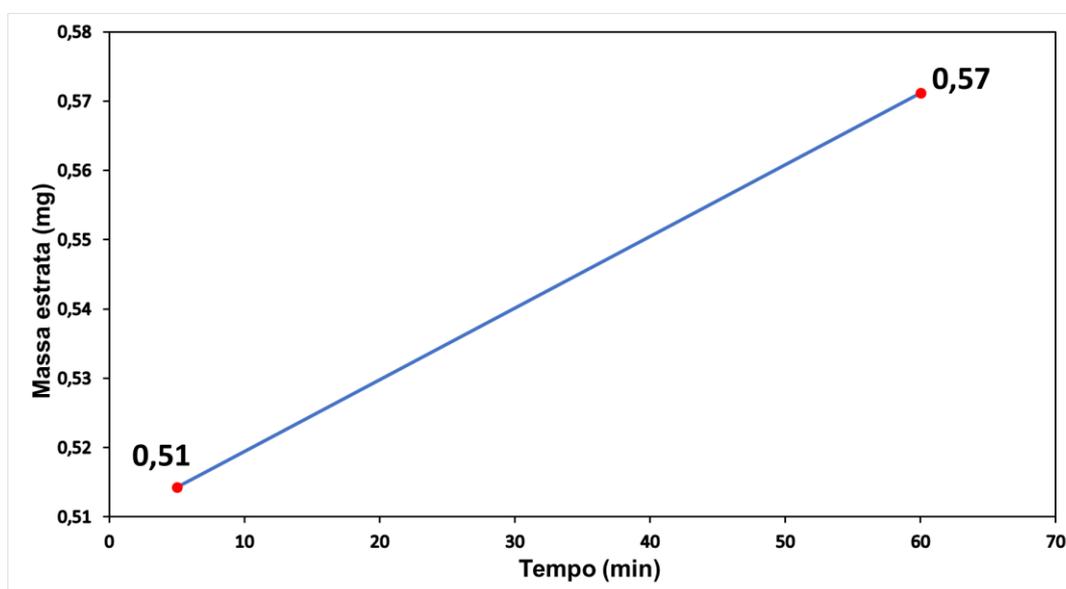


Figura 112: Percentuale in massa di vitamina D, estratta dal campione β -mCDV in etanolo.

CAPITOLO 6: PORGETTAZIONE, CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

6.1 Progettazione di un dispositivo a basa di silice e CD

A conclusione del lavoro di tesi, viene proposta una possibile applicazione dell'ibrido CD/silice investigato.

Come discusso nei capitoli iniziali, le **CDs** sono eccipienti che ben si prestano alle applicazioni biomedicali. La loro biocompatibilità e il rilascio di farmaci, con formazione di complessi inclusionali, le rendono particolarmente promettenti nell'ambito del rilascio topico e nell'adsorbimento da soluzione.

Nei paragrafi successivi, viene proposta una progettazione preliminare del materiale ibrido innovativo in esame. È possibile analizzare in maniera dettagliata i materiali impiegati, le relative quantità e il processo produttivo adoperato.

6.1.1 Guarigione delle ferite

Nel corpo umano, la pelle è l'organo più grande e svolge la funzione di efficace barriera agli agenti patogeni. Oltre alla funzione protettiva essa possiede proprietà di regolazione della temperatura corporea ed anche una funzione sensoriale. Per le lesioni di tale organo il principale problema è l'infezione batterica, che rende il processo di rigenerazione delle ferite molto lento. [85]

La guarigione delle ferite è un processo anabolico e, come tale, le sue problematiche vengono associate ad una carenza di composti nutraceutici. Alcuni macronutrienti, come proteine, lipidi e vitamine, possono influenzarne la relativa cinetica. [86] Le proteine sono necessarie per tutte le fasi di guarigione e sono particolarmente importanti per la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi del collagene. Pertanto, una carenza di proteine genera risposte immunitarie cellulari ritardate. Le vitamine, invece hanno un ruolo importante come fattori coprotagonisti in molti processi enzimatici. La rigenerazione di una ferita richiede un'attività programmata e calibrata di tipo infiammatorio e vascolare; di tessuti connettivi, cellule epiteliali e dei rispettivi mediatori. [86]

6.1.2 Il cerotto transdermico: elenco delle proprietà

I cerotti transdermici forniscono principi attivi a stretto contatto con la pelle e vengono utilizzati da più di quattro decenni. [87] Tuttavia, l'aumento delle problematiche dei tessuti epidermici richiede nuove soluzioni operative.

Le medicazioni della pelle possono essere suddivise in tre gruppi: passive, interattive e bioattive. Il rilascio topico può essere classificato in quest'ultima categoria. [87]

Fra i requisiti che un dispositivo di rilascio transdermico deve possedere è possibile citare:

- La biocompatibilità con i tessuti
- La compatibilità chimica e fisica del materiale selezionato con il farmaco. [87]
- Le proprietà adesive modulate: flessibilità e facile rimozione con buona adesione (comunque non eccessiva). [88] - [89]
- Elevata tensione ed allungamento a rottura.

- Rilascio modulato sulla pelle. Nel caso dei tessuti, la cinetica di rilascio viene mediata dal diametro nominale. Minore è il diametro della fibra, infatti, maggiore sarà la disponibilità di particelle sulla superficie, quindi il rilascio sarà più rapido. [87]

Per soddisfare tali requisiti, come possibili strategie applicative, è possibile citare gli idrogeli, gli idrocolloidi, i film sottili e le garze. [87]

Tra le possibili scelte, viene approfondita la possibilità di incorporare l'ibrido dentro fibre polimeriche, ottenute con la tecnica di elettrospinning. Le fibre intrecciate potrebbero costituire un cerotto a trama, innovativo e funzionalizzato; con buone proprietà meccaniche e in grado di rilasciare principi attivi e/o adsorbire sostanze, come l'essudato della ferita. In **Figura 113** si osserva una possibile struttura del cerotto e una lista di alcuni requisiti necessari.

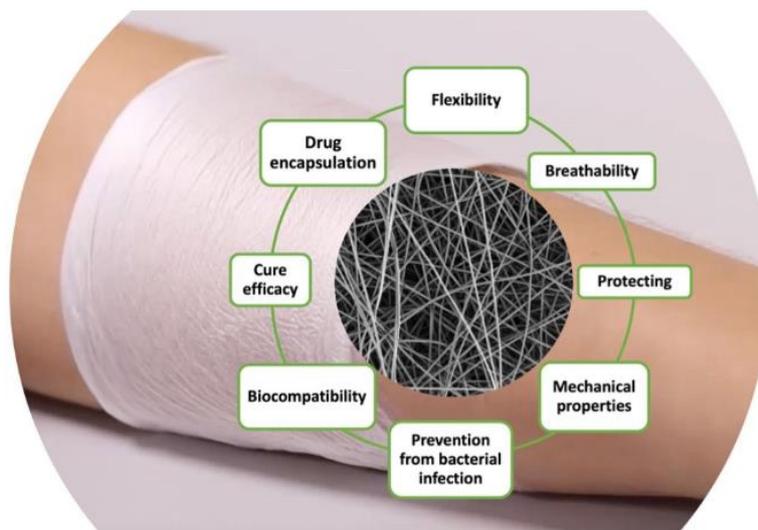


Figura 113: Immagine di un cerotto sulla pelle dell'avambraccio con un inserto di microscopia elettronica a scansione di fibre polimeriche che indica i requisiti e le caratteristiche più importanti per la fasciatura epidermica [87]

6.1.3 Elettrospinning

L'impianto di elettrospinning è costituito da un alimentatore ad alta tensione, un collettore a terra (stazionario o rotativo, a seconda della configurazione scelta), una soluzione polimerica contenuta in una siringa ed una pompa che dosa la portata della soluzione su di un mandrino.

Le configurazioni di uno strumento per elettrospinning possono essere molteplici. In merito alla progettazione dell'ibrido in esame CD/silice, l'impianto rappresentato in **Figura 114**, chiamato anche "side by side" electrospinning [85], è quello che si presta alle specifiche esigenze di progettazione.

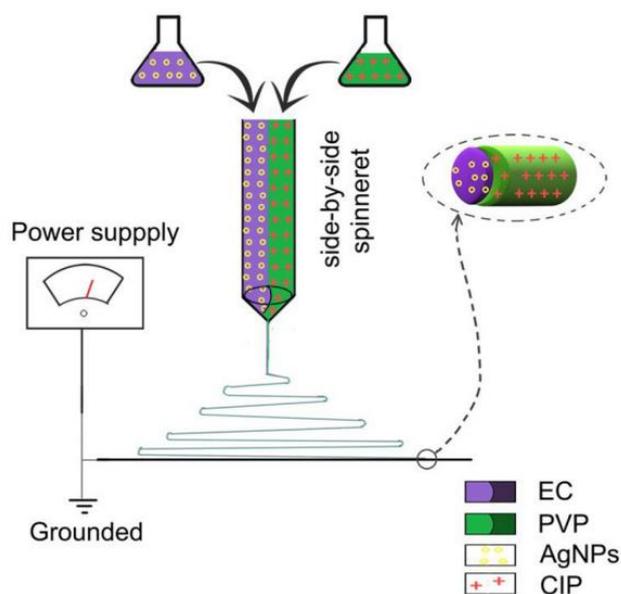


Figura 114: Diagramma schematico di un processo di elettrospinning side-by-side. [87]

Nel lavoro di Yang e al. [85] si fa riferimento a fibre miste, costituite da due polimeri, caricati in modo differente (uno con CIP, particelle nanometriche bifunzionalizzate, l'altro con nanoparticelle di argento (AgNPs)). Nello specifico, la struttura a doppio strato è formata da uno strato di polivinilpirrolidone (PVP) e da uno di etilcellulosa (EC); un polimero biocompatibile, non degradabile e fortemente idrofobico.

La scelta delle matrici è comunque vasta e permette di adattarsi a vari principi attivi. Fra i polimeri naturali si prestano la gelatina, la fibrina, la cellulosa e suoi derivati; fra quelli sintetici (più numerosi rispetto a quelli naturali) il polivinilpirrolidone (PVP), che è il più usato per eccipienti farmaceutici di tipo idrofilico, l'acido polilattico (PLA), il poliuretano (PU) ed il polietilene ossido (PEO) [85].

La formulazione di un cerotto con due superfici, funzionalizzate in modo differente e con la possibilità di introdurre particelle nanometriche, è stata ritenuta la soluzione che meglio si presta alla tecnologia in esame. L'ipotesi progettuale risiede nella possibilità di avere una duplice finitura: uno strato esterno di PVP, funzionalizzato con particelle di β -mCDS2, che viene lentamente eroso dai fluidi biologici e rilascia il principio attivo ed uno strato interno di EC, funzionalizzato con AgNPs ad azione antibatterica ed, allo stesso tempo, protettiva dall'umidità.

6.1.4 Proprietà meccaniche fibre per cerotti transdermici

Le caratteristiche meccaniche dei tessuti dipendono fortemente dalla tecnica di misurazione impiegata, dalle condizioni di lavorazione, dall'orientamento delle fibre, dal loro eventuale incollaggio e dallo slittamento reciproco. [90]

Nello specifico, per definire i requisiti minimi delle variabili, sono stati valutati una serie lavori sull'argomento. Si apprende, da Huang e al. [91], che una singola fibra di PVP vergine possiede una tensione a rottura di 2,3 MPa ed un allungamento del 9,1% (**Figura 115**). L'aggiunta di filler nanostrutturati comporta la formazione di un materiale più elastico, incrementandone il modulo a trazione e la tensione a snervamento e riducendone

l'allungamento a rottura, come si evince dalle curve sforzo-deformazione presenti in **Figura 116**. [91]

Fiber components ^{[Reference]a)}	Tensile strength [MPa]	Tensile modulus [MPa]	Elongation at break [%]
PVP ^[97]	2.3	–	9.1
PVP–CNC (4%)	3.1	–	3.25
PVP–CNC (4%)–AgNO ₃ (0.34%)	2.81	–	2.5

Thickness \approx 0.2 mm

Figura 115: Caratterizzazione meccanica di PVP e suoi compositi con aggiunta di diverse cariche (CNC e AgNO₃) [90]

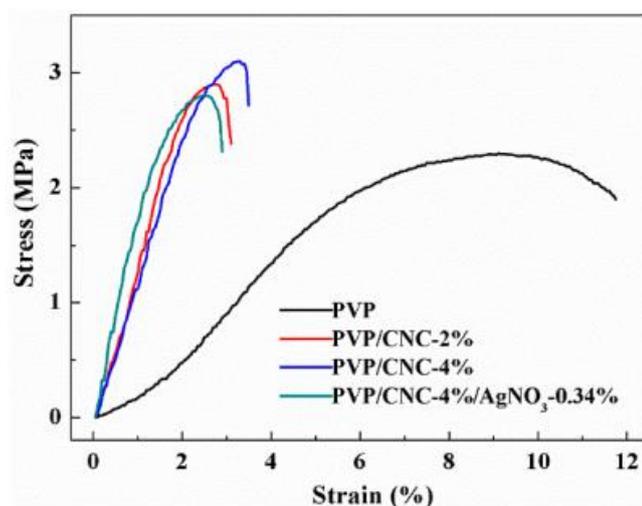


Figura 116: Prove a trazione di diversi provini di PVP, tale quale e caricato. [91]

La valutazione delle proprietà delle singole fibre viene effettuata tramite microscopio a forza atomica (AFM), munito di opportuno cantiliver [90] Le proprietà a trazione di strutture tridimensionali, come la membrana in esame, sono misurate tramite un test convenzionale. I campioni sono tagliati in trame di dimensioni standardizzate; vengono poi montati tra due supporti e sottoposti ad un carico crescente. Le caratteristiche di trazione sono calcolate automaticamente dal software dello strumento.

Nonostante il test sul tessuto sia più facile rispetto a quello delle singole fibre; l'interpretazione della prova risulta più complessa, a causa della variazione della porosità delle fibre, i diversi meccanismi di rottura competitivi e i diversi metodi di campionamento. [90]

6.1.5 L'ibrido CD/SILICE come filler di fibre polimeriche per un cerotto innovativo

Tra le sintesi studiate nel seguente lavoro di tesi, come discusso nel paragrafo precedente, la più promettente è quella denominata β -mCDS2. Poiché non è stato possibile ottenere delle nanoparticelle con un approccio bottom-up, si ipotizza di nanostrutturare l'ibrido con un approccio top-down. Il campione massivo viene finemente macinato e successivamente setacciato, fino ad ottenere delle particelle irregolari molto fini.

Si ipotizza di impiegare i medesimi reagenti della sintesi prodotta in laboratorio, riportati nella tabella di seguito (**Tabella 12**).

TMOS	β -MCD	HCl	H ₂ O
4,0 g	2,0 g	2/3 gocce	3,0 g

Tabella 12: Elenco reagenti della sintesi β -mCDS2.

La sintesi è stata comunque ottimizzata nell'ottica di incorporare il colecalciferolo per applicazioni topiche. L'obiettivo quindi è il caricamento di ingenti quantità di Vitamina D. Dallo studio di Yan Liu e al. [92] si apprende che la stechiometria di coordinazione tra la CD ed il farmaco è pari a 2:1. Preliminarmente, bisogna assumere l'ipotesi che tutta la CD venga correttamente incorporata nel "network" e che tutto il TMOS reagisca formando silice. In questo modo si ottiene un ibrido con il 45,0% di CD, come emerso dalla caratterizzazione termogravimetrica (**Figura 60**).

Considerando una quantità di ibrido β -mCDS2 pari a 100 g, la relativa β -MCD è pari a 45 g, per le ipotesi appena fatte. Le moli di oligosaccaride (tenendo conto che la massa molare presente nelle SDS della β -mCD è pari a 1310 g/mol) sono pari a:

$$n_{(\beta\text{-MCD})} = \frac{m_{(\text{massa } \beta\text{-MCD})}}{PM_{(\text{massa molare } \beta\text{-MCD})}} = \frac{45 \text{ g}}{1310 \text{ g/mol}} = 0,035 \text{ mol}$$

Per la stechiometria di coordinazione citata, [92] le moli di vitamina D sono esattamente la metà rispetto a quelle della CD:

$$n_{\text{VIT-D}} = \frac{n_{(\beta\text{-MCD})}}{2} = 0,017 \text{ mol}$$

La massima quantità di vitamina D che è possibile incorporare, dato che il suo peso molecolare è pari a 384,64 g/mol, può essere così calcolata:

$$m_{(\text{massa VIT-D})} = n_{(\text{VIT-D})} \times PM_{(\text{massa molare Vit-D})} = 0,017 \text{ mol} \times 382,64 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 6,57 \text{ g}$$

La percentuale in massa di vitamina D presente nell'ibrido è quindi pari a:

$$\% \text{massa}_{\text{VIT-D}} = \frac{m_{(\text{massa VIT-D})}}{\text{massa}_{\text{iniziale}}} \times 100 = 6,57 \%$$

In futuro si suggerisce di effettuare studi di rilascio in vitro, che possano quantificare l'effettiva farmacinetica del DDS con un contenuto percentuale di farmaco pari a 6,6 %; se con tali percentuali la concentrazione di principio attivo rilasciato può lenire o meno l'infiammazione causata dalla psoriasi a placche.

Le particelle di ibrido possono costituire un filler riempitivo per la matrice polimerica, ottenendo così un materiale composito nanostrutturato, caratterizzato da una bassa percentuale di rinforzante rispetto ad un composito tradizionale. [93]

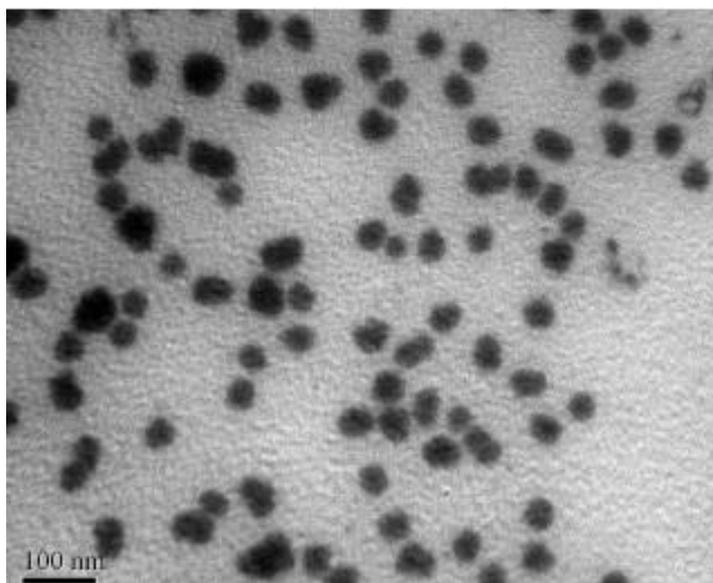
La scelta della matrice è ricaduta sul PVP, per le motivazioni spiegate in precedenza. Sono presenti, infatti, in letteratura un nutrito numero di lavori, nei quali emerge una buona

compatibilità di sistemi nanostrutturati a base di silice e PVP, [94]-[95]-[96]. Esempio è lo studio di Sayed e al. [94], nel quale viene riportato un metodo di preparazione avveniristico di un nanocomposito (preparato tramite radiazione gamma) a base di gomma d'acacia, PVP e silice per la rimozione di inquinanti da soluzione.

Tale polimero è totalmente compatibile con la superficie esterna della silice ed è soggetto a degradazione quando a contatto con fluidi biologici. La matrice si dissolve lentamente, liberando l'ibrido al suo interno.

Il vantaggio principale è la totale assenza di cristallizzazione del principio attivo nella matrice polimerica grazie all'ibrido CD/silice. La dissoluzione del farmaco, e la sua successiva solidificazione, possono indurre cambiamenti nella struttura cristallina [87]; impiegando la polvere di β -mCDS2 il problema viene risolto, in quanto il farmaco è stato reso amorfo e confinato, se pur reversibilmente, nella cavità dell'oligosaccaride. Inoltre la silice, a contatto con la pelle, rilascia acido ortosilicico, composto nutraceutico utile per il trattamento della patologia.

L'idea sopra proposta presenta certamente anche alcuni svantaggi. Fra questi è sicuramente possibile annoverare la difficoltà di ottenere un composito nanostrutturato a matrice polimerica. Il sistema è molto complesso, in quanto congiunge fasi di natura organica e inorganica, con differenti proprietà chimico-fisiche. In tal caso la carica nanostrutturata, a causa dell'alta tensione superficiale, potrebbe andare incontro ad agglomerazione, minando l'omogeneità del composito e, di conseguenza, le relative proprietà meccaniche. [97]. A questo proposito, però, si può far nuovamente riferimento al lavoro redatto da Sun e al. [96]. Al suo interno viene riportata la micrografia (**Micrografia 6**) di un nanocomposito ottenuto disperdendo nanoparticelle di silice in una matrice di PVP; sviluppata per membrane ultrafiltranti anti-fuliggine. Si può osservare che nel composito in esame non viene adoperato nessun compatibilizzante tra le fasi. Dall'analisi micrografica, infatti, emerge una buona dispersione e distribuzione della carica, indice di un'elevata bagnabilità. Sun e al. [96] suggeriscono che la miscela sia facilmente preparabile per semplice miscelazione, in quanto si stabiliscono forti interazioni all'interfaccia tra i gruppi carbonilici di PVP e gli ossidrili superficiali della silice.



Micrografia 6: Micrografia al SEM di un nanocomposito a base di silice-PVP. [96]

6.2 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Al termine del lavoro di tesi, risulta necessario trarre delle conclusioni in merito alle sintesi effettuate. L'obiettivo preliminare delle prove era quello di ottenere un ibrido ternario a base di vitamina D, CD e silice. Il metodo ipotizzato prevedeva l'impregnazione in CO₂ supercritica della vitamina D in CD per la formazione di un complesso d'inclusione, la sua successiva solubilizzazione nel bagno di sintesi e infine la precipitazione nella silice.

I campioni che hanno mostrato maggiore interesse per l'obiettivo prefissato sono quelli in ambiente acido. Nello specifico, la sintesi più promettente è quella relativa al campione β -mCDS2; ottimizzata grazie all'impiego di CD metilata ed alle basse temperature di invecchiamento. Tale campione possiede tutte le caratteristiche per essere un ibrido organico-inorganico: lo zucchero non subisce una visibile degradazione; la beta-metilCD è un valido carrier di principi attivi lipofili; ne viene incorporata un'ingente quantità nel materiale vetroso (circa il 50% come avviene per i tensioattivi cationici tradizionali) e inoltre essa non subisce fenomeni di cristallizzazione e segregazione.

L'unico inconveniente da superare, in possibili scenari futuri di implementazione della tecnologia, è la problematica legata alla morfologia del vetro sintetizzato. Le cinetiche di idrolisi e condensazione, sbilanciate verso quest'ultima, favoriscono la formazione di un gel molto strutturato, con conseguente formazione di materiale bulk. Come accennato nei capitoli precedenti, le applicazioni in ambito topico richiedono invece materiale particellare, così da ottimizzarne il rilascio nei tessuti epidermici. Si potrebbe quindi cambiare il rapporto tra precursore siliceo e massa d'acqua ed etanolo, mantenendo costante la quantità di CD così da ottenere le sfere.

I campioni ottenuti in ambiente basico, invece, mostrano delle proprietà antitetiche rispetto a quelli acidi. La sintesi VBCDS presenta una struttura particellare molto fine e regolare, come viene evidenziato nello studio micrografico, ma senza l'incorporazione dell'oligosaccaride. Tale evidenza deriva dalle misure spettroscopiche, termogravimetriche e micrografiche (si intravede una fase che ingloba le particelle che potrebbe essere appunto la CD). Nell'ottica di incrementarne il contenuto in massa, si consiglia un aumentare la quantità di oligosaccaride disciolto nel bagno di sintesi, fino ad arrivare al valore ideale del 50 % in massa nell'ibrido calcinato, come avviene nel caso del campione β -mCDS2. In tal senso bisognerebbe studiare cosa accade durante la solubilizzazione (se il processo è competitivo tra acqua ed etanolo) e in quale fase della sintesi converrebbe solubilizzare lo zucchero così da generare la corretta co-precipitazione.

Per quanto riguarda invece lo studio preliminare relativo all'impregnazione della vitamina D in CO₂ supercritica (scCO₂), restano aperti alcuni scenari. Il trattamento, eco-friendly e sicuro per applicazioni farmaceutiche, mostra delle riserve sulla possibile formazione di un complesso d'inclusione.

Per il campione β -CDV il complesso non è stabile, poiché sono presenti dei picchi di fase cristallina, e inoltre la massa estratta in soluzione alcolica è molto bassa. Per il campione β -mCDV, invece, il complesso è stabile ma la massa estratta rimane esigua.

Resta comunque da annoverare che la CD forma un complesso stabile con la vitamina D, proteggendola da eventuali degradazioni; come evidenziato dai picchi a 265 cm⁻¹ nello spettro UV/visibile.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Ali Mansoori, "Principles of nanotechnology: molecular based study of condensed matter in small systems", Year 2005
- [2] Ramsden, Jeremy J.. (2016). "Nanotechnology - An Introduction (2nd Edition)" - 1.1.1 Working Definitions. Elsevier. Page 4-400
- [3] Namra Abid, A. M. (2022). "Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review", *Advances in Colloid and Interface Science*, Page 1-18.
- [4] Esteban Beltrán Gracia, A. L. C. C. (2019) "Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications" *Cancer Nanotechnology*, 1-40
- [5] Brewster, T. L. (2010). "Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development" Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 1607.
- [6] Szejtli, J. (2004) "Past, present, and future of cyclodextrin" *Pure Application Chemistry*, 1825-1845.
- [7] <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha-D-Glucopyranose.svg>
- [8] <http://culturalmenteblog.blogspot.com/2018/09/disaccaridi-oligosaccaridi-e.html>
- [9] Courtesy of *CCIA Prato, Unione industriale Pratese*
- [10] Mark E. Davis , Marcus E. Brewster "Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future", *Nat rev drug discov*, 2004; 3:1023-1035
- [11] Maria Pia Casaletto, Antonella Privitera, Viviana Figà , "MATERIALI E SOLUZIONI ECOSOSTENIBILI PER LA CONSERVAZIONE DEL PATRIMONIO CULTURALE E LA PROTEZIONE DI MATERIALI DI INTERESSE INDUSTRIALE"/ Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati,/ Year 2016
- [12] Caldera, Pedrazzo, Anceschi, "Nanospugne di ciclodestrine", *Chimica e Nanotecnologie*| ANNO I | N° 6| Novembre 2017 | 1-7
- [13] Erem Bilensoy, Wiley & Sons "Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications", Incorporated 2011-05-24, 1-412
- [14] Nataly Silva, Ana Riveros, Nicolás Yutronic "Photothermally Controlled Methotrexate Release System Using β -Cyclodextrin and Gold Nanoparticles"/ *Nanomaterials* /Year 28 November 2018/ doi:10.3390/nano8120985
- [15] József Szejtli "Cyclodextrins in the Textile Industry" *Starch/Stärke*55(2003), Page 191–196
- [16] M. Dehmer, Ch. Schleinig, T. MerzF. Everts: WO 9813456 (1998)
- [17] HANS-JORGEN BUSCHMANN, ECKHARD SCHOLLMEYER "Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review", *Cosmet. Sci.*, 53, Page 189 (May/June 2002)
- [18] Yao Hu, Chao Qiu, Yang Qin "Cyclodextrin–phytochemical inclusion complexes: Promising food materials with targeted nutrition and functionality" *Trends in Food Science & Technology*
- [19] Jiefeng Pan, Fangmi Aia, Ping Shao "Development of polyvinyl alcohol/ β -cyclodextrin antimicrobial nanofibers for fresh mushroom packaging" *Food Chemistry* 2019, Page 1-18

- [20] Rajeswari Challa, Alka Ahuja, Javed Ali "Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review" AAPS PharmSciTech 2005; E329-E357
- [21] T. Higuchi, KA Connors, S. L. Connors, K.A. Connors "Phase solubility techniques", Adva Anal Chem Instr. 1965; Page 212-217
- [22] Phennapha Saokham ,Chutimon Muankaew, Phatsawee Jansook,"Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes"
- [23] ARUN RASHEED, ASHOK KUMAR C. K., SRAVANTHI "Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review" Sci Pharm. 2008; 76: 567–598 doi:10.3797/scipharm.0808-05
- [24] Mauro Banchero "Supercritical Carbon Dioxide as a Green Alternative to Achieve Drug Complexation with Cyclodextrins" Pharmaceuticals 2021, 14, 562. <https://doi.org/10.3390/ph14060562>
- [25] Mauro Banchero, Silvia Ronchetti, Luigi Manna "Characterization of Ketoprofen/Methyl- β -Cyclodextrin Complexes Prepared Using Supercritical Carbon Dioxide" Journal of Chemistry Volume 2013, Article ID 583952, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/583952>
- [26] Christophe Barbè, John Bartlett, Linggen Kong "Silica Particles: A Novel Drug-Delivery System" Advanced materials (Weinheim), Year 2004, Vol.16 (21), p.1959
- [27] Relatore: Alvisè Benedetti Laureando: Matteo Testi "Studio di sistemi a base di silice per applicazioni biomediche" 2011/2012
- [28] Courtesy of <https://www.osmosis.org/answers/peaks-and-troughs>
- [29] Kinam Park "Controlled drug delivery systems: Past forward and future back" Journal of Controlled Release, Year 2014, Page 3-18
- [30] Candidato Marianna Bitto "Silice a mesoporosità ordinata come carrier di curcumina", Marzo 2020
- [31] Christophe Barbè, John Bartlett, Linggen Kong "Silica Particles: A Novel Drug-Delivery System" Advanced materials (Weinheim), Year 2004, Vol.16 (21), p.1959
- [32] Yixian Zhoua , Guilan Quana, Qiaoli Wub , Xiaoxu Zhangc, "Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene deliver", Acta Pharmaceutica Sinica B, Year 2017, Doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007>
- [33] Bowen Yanga, Yu Chena, Jianlin Shia," Mesoporous silica/organosilica nanoparticles: Synthesis, biological effect and biomedical application" Materials Science & Engineering R., 2019, 65-105
- [34] Sílvia C. Nunes, Paulo Almeida, and Verónica de Zea Bermudez "Ordered Mesoporous Sol–Gel Materials: From Molecular Sieves to Crystal-Like Periodic Mesoporous Organosilicas", Year 2015, Page 575 DOI: 10.1002/9783527670819.ch18
- [35] Relatore Barbara Onida, Tesi Giulia Palestrini "Silici nanoporose come carrier di vitamina D₃" 2020
- [36] Courtesy of slides of Sonia Fiorilli
- [37] Courtesy of Hermann Luyken
- [38] B. Yang, Y. Chen, and J. Shi, "Mesoporous silica/organosilica nanoparticles: Synthesis, biological effect and biomedical application," Mater. Sci. Eng. R Reports, vol. 137, no. January, pp. 66–105, 2019, doi: 10.1016/j.mser.2019.01.001.

- [39] Relatore Prof.ssa Barbara Onida, Candidato Elena Maretto “Sintesi e biodegradazione di silici mesoporose”, Anno 2020
- [40] F. Chen, G. Hableel, E. R. Zhao e J. V. Jokerst, «Multifunctional Nanomedicine with Silica: Role of Silica in Nanoparticles for Theranostic, Imaging, and Drug Monitoring,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 521, p. 261–279, 7 2018.
- [41] Reema Narayan, Usha Y. Nayak , Ashok M. Raichur “Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances” *Pharmaceutics* 2018, 10, 118; doi:10.3390/pharmaceutics10030118
- [42] Werner Stober, Arthur Fink “Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range”/ Max-Planck-Institute, Göttingen, Germany-Year 1967
- [43] Zeid A. AlOthman , “A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials” /Chemistry Department, P.O. Box 2455, *Materials* 2012, 5, Page 2886; doi:10.3390/ma5122874
- [44] Bulent E. YOLDAS “MODIFICATION OF POLYMER-GEL STRUCTURES” *Journal of Non-Crystalline Solids* 63 (1984) 145-154
- [45] Brinker, “Sol-gel processing of silica. In *The Colloid Chemistry of Silica*”; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 1994; Chapter 18, pp. 361–402.
- [46] J.N.W.N.Barker R.E.Ashton, R.Marks “Topical maxacalcitol for the treatment of psoriasis vulgaris:a placebo-controlled, double-blind, dose-Ending studywith active comparator” *British Journal of Dermatology*1999;141: 274-278
- [47] Ryszhan Bakirova,Altynbek Nukhuly, Ainara Iskineyeva “Obtaining and Investigation of the β Cyclodextrin Inclusion Complex with Vitamin D3 Oil Solution” *Hindawi Scientifica* Volume 2020, Article ID 6148939, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2020/6148939>
- [48] John M. Ballard, Limin Zhu , Eric D. Nelson “Degradation of vitamin D3 in a stressed formulation: The identification of esters of vitamin D3 formed by a transesterification with triglycerides” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 142–150
- [49] Hector F DeLuca “Overview of general physiologic features and functions of vitamin D” *J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S. doi: 10.1093/ajcn/80.6.1689S.
- [50] Laszlo Jicsinszky, Giancarlo Cravotto “Cyclodextrins in Skin Formulations and Transdermal Delivery” *J Skin Stem Cell.* 2019 December; 6(4):e102561 doi: [10.5812/jssc.102561](https://doi.org/10.5812/jssc.102561)
- [51] Sebastian Polarz, Bernd Smarsly, Lyudmila Bronstein “From Cyclodextrin Assemblies to Porous Materials by Silica Templating” *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, No. 23
- [52] Bao-Hang Han “Cyclodextrin-based Porous Silica Materials as in Situ Chemical “Nanoreactors” for the Preparation of Variable Metal-Silica Hybrids” *Chem. Mater.* 2001, 13, 3915-3919
- [53] Jia, Y.P.; Shi, K.; Liao “Effects of Cetyltrimethylammonium Bromide on the Toxicity of Gold Nanorods Both In Vitro and In Vivo: Molecular Origin of Cytotoxicity and Inflammation.” *Small Methods* 2020, 4, 1900799. doi:10.1002/smt.201900799.
- [54] Pope, Mchenzie, “SOL-GEL PROCESSING OF SILICA”, *Journal of Non-Crystalline Solids* X7/ Year 1986/ Page 186
- [55] Relatori Barbara Onida, Marta Gallo, Tesista: Daniele Arduino “Hybrid particles for vitamin D3 release in view of psoriasis treatment.” Anno 2021
- [56] Werner Stober, Arthur Fink “Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range” *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE* 26, 62--69 (1968)

- [57] <https://www.shimadzu.com/an/industries/automotive/metals/xrd/index.html>
- [58] Courtesy of <https://www.microscopy.ethz.ch/bragg.htm>
- [59] Courtesy of Guido Molteni/ <https://slideplayer.it/slide/10794993/>
- [60] Francesco Trotta, Marco Zanetti, Giovanni Camino "Thermal degradation of cyclodextrins" *Polymer Degradation and Stability* 69 (2000), Page 370-379
- [61] Kavirajaa Pandian Sambasevam, Sharifah Mohamad "Synthesis and Characterization of the Inclusion Complex of β -cyclodextrin and Azomethine" *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 3671-3682; doi:10.3390/ijms14023671
- [62] Dongmei Ke, Wenxue Chen, Weijun Chen "Preparation and Characterization of Octenyl Succinate β -Cyclodextrin and Vitamin E Inclusion Complex and Its Application in Emulsion", 4 February 2020
- [63] J. Szejtli / "Enhancement of Stability and Biological Effect of Cholecalciferol by P-Cyclodextrin Complexation"/*Pharmazie*/ January 1981
- [64] Relatore prof.ssa Barbara Onida, Correlatori prof. Mauro Banchemo dott.ssa Marta Gallo/ Candidato Elena Zuena "Particelle ibride a base di silice per il rilascio di curcumina: valorizzazione del processo di sintesi" Marzo 2021
- [65] A. Vavn Blaaderen "Monodisperse Colloidal Silica Spheres from Tetraalkoxysilanes: Particle Formation and Growth Mechanism" *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 154, No. 2, December 1992
- [66] Van Helden et al. 1980, Preparation and characterization of spherical monodisperse silica dispersions in nonaqueous solvents
- [67] Relatori Prof.ssa Barbara Onida Prof.ssa Silvia Ronchetti Dr. Federica Leone "Silice mesoporosa come carrier di Piroxicam" Candidato Luca Serpella, Dicembre 2017
- [68] Aldona BEGANSKIENĖ, Valdas SIRUTKAITIS, Marytė KURTINAITIENĖ "IR, TEM and NMR investigations of Stöber Silica Nanoparticles" *MATERIALS SCIENCE (MEDŽIAGOTYRA)*. Vol. 10, No. 4. 2004
- [69] Horacio E Bergna. "The colloid chemistry of silica" *Rapp. tecn. American Chemical Society*, Washington, DC (United States), 1994
- [70] Hong Zhang, Chao Li, Jinshan Guo "In Situ Synthesis of Poly (methyl methacrylate)/SiO₂ Hybrid Nanocomposites via "Grafting Onto" Strategy Based on UV Irradiation in the Presence of Iron Aqueous Solution" *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials* Volume 2012, Article ID 217412, 9 pages doi:10.1155/2012/217412
- [71] Mauro Banchemo "Supercritical Carbon Dioxide as a Green Alternative to Achieve Drug Complexation with Cyclodextrins" *Pharmaceuticals* 2021, 14, Page 1-36 <https://doi.org/10.3390/ph14060562>
- [72] Mauro Banchemo, Luigi Manna "Investigation of the piroxicam/hydroxypropyl--cyclodextrin inclusion complexation by means of a supercritical solvent in the presence of auxiliary agents" *J. of Supercritical Fluids* 57 (2011), Page 259–266
- [73] M.H.A. Jahurul, I.S.M. Zaidul, N.A.N. Norulaini "Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics" *Journal of Food Engineering*, 2017, Page 467-476

- [74] Münevver Sökmena, Ezgi Demirb, Suliman Yousuf Alomara “Optimization of sequential supercritical fluid extraction (SFE) of caffeine and catechins from green tea” *The Journal of Supercritical Fluids*, 2018, page 171
- [75] McHugh, Mark A. Krukonis, Val J. (1994). *Supercritical Fluid Extraction (2nd Edition) - 1. Introduction*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt003GDDTC/supercritical-fluid-extraction/introduction>
- [76] Relatore: Barbara Onida, Marta Gallo. Candidato: Vito Martorella “Adsorbimento di vitamina D₃ su SBA-15 mediante CO₂ supercritica” Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali
- [77] Zhen Huang, Li Xua, Jing-Huan Li a, S. Kawi b, “Organic template removal from hexagonal mesoporous silica by means of methanol-enhanced CO₂ extraction: Effect of temperature, pressure and flow rate” *Separation and Purification Technology* Volume 77, Issue 1, 2 February 2011, Pages 112-119
- [78] Pavel Gurikov, Irina Smirnova et al “Amorphization of drugs by adsorptive precipitation from supercritical solutions: A review” *The Journal of Supercritical Fluids*, Year 2018, Page 110
- [79] Courtesy of slides of Chiara Vitale Brovarone course of Ingegneria dei Materiali.
- [80] Arezki Bounaceur, Elisabeth Rodier, Jacques Fages “Maturation of a ketoprofen-cyclodextrin mixture with supercritical carbon dioxide” *J. of Supercritical Fluids* 41 (2007) 430
- [81] Paola Mura “Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015, Vol.113, p.226-238
- [82] Vuk; Ajduković, Zorica; Uskoković, Dragan (2013). Multifunctional hydroxyapatite and poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol. *Materials Science and Engineering: C*, 33(2), 943–950.
- [83] J Szejtli, E Bolla-Pusztai, P Szabó, T Ferenczy “Enhancement of Stability and Biological Effect of Cholecalciferol by P-Cyclodextrin Complexation” *Pharmazie* 1980 Dec;35(12):779-87.
- [84] Yufeng Ren, Ying Liu, Raomei Niu “Host-guest inclusion system of oleanolic acid with methyl-β-cyclodextrin: Preparation, characterization and anticancer activity” *Journal of Molecular Structure* 1117 (2016)
- [85] Jinke Yang, Ke Wang, Deng-Guang Yu “ Electrospun Janus nanofibers loaded with a drug and inorganic nanoparticles as an effective antibacterial wound dressing” *Materials Science & Engineering C* 111 (2020) 110805 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110805>
- [86] Rajendran, S. “Advanced Textiles for Wound Care (Second Edition)” [0-08-102192-5] Anno:2019
- [87] Zuzanna J. Krysiak, Urszula Stachewicz “Electrospun fibers as carriers for topical drug delivery and release in skin bandages and patches for atopic dermatitis treatment” *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.*, Year 2022
- [88] Gola, M., Czajkowski, R., Bajek, A., Dura, A., & Drewa, T. (2012). “Melanocyte stem cells: Biology and current aspects” *Medical Science Monitor*, 18(10), 155–159.
- [89] Yang, X., Fan, L., Wang, Y (2017). Green electrospun Manuka honey/silk fibroin fibrous matrices as potential wound dressing. *Materials and Design*, 119, 76–84
- [90] Taslim Ur Rashid, Russell E. Gorga, and Wendy E. Krause “Mechanical Properties of Electrospun Fibers—A Critical Review” *Adv. Eng. Mater.* 2021, 23, 2100153

- [91] Siwei Huang , Ling Zhou , Mei-Chun “Preparation and Properties of Electrospun Poly (Vinyl Pyrrolidone)/Cellulose Nanocrystal/Silver Nanoparticle Composite Fibers” *Materials* 2016, 9, 523; doi:10.3390/ma9070523
- [92] Yan Liu, Huayang Zhang “Study of VD3- β -Clodextrin Inclusion Complex “*Journal of Geoscience and Environment Protection*, 2016, 4, 163-167
- [92] Shaoyun Fu,Zheng Sun,Pei Huang “Some basic aspects of polymer nanocomposites: A critical review” *Nano Materials Science* 1 (2019) 2–303
- [94] Asmaa Sayed, Ghada A. Mahmoud, Heba Said “Characterization and optimization of magnetic Gum-PVP/SiO₂ nanocomposite hydrogel for removal of contaminated dyes” *Materials Chemistry and Physics* 280 (2022)
- [95] Alyson E. Mitchell, Yun-Jeong Hong, J. Cale May “A Comparison of Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), Silica Xerogel and a Polyvinylpyrrolidone (PVP)–Silica Co-Product for Their Ability to Remove Polyphenols from Beer.” *Journal of the institute of Brewing*, Year 2005
- [96] Mengping Sun, Yanlei Su, Chunxia Mu “Improved Antifouling Property of PES Ultrafiltration Membranes Using Additive of Silica-PVP Nanocomposite” *Ind. Eng. Chem. Res.* 2010, 49, 790–796
- [97] Claudio Badini “Materiali composite per l’ingegneria” 2013
- [98] Dongyuan Zhao,Peidong Yang,Nick Melosh “Continuous Mesoporous Silica Films with Highly Ordered Large Pore Structures” *Adv. Mater.*1998, 10,No. 16
- [99] Ryszhan Bakirova , Altynbek Nukhuly, Ainara Iskineyeva “Obtaining and Investigation of the β -Cyclodextrin Inclusion Complex with Vitamin D3 Oil Solution” *Scientifica* Volume 2020, Article ID 6148939, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2020/6148939>

8. RINGRAZIAMENTI

Un grandissimo ringraziamento va alla professoressa Barbara Onida, per la disponibilità, la fiducia rivolta e tutti i preziosi consigli durante le riunioni; rivelandosi un punto di riferimento nell'interpretazione dei dati, nel proporre nuovi spunti di sintesi ed anche un grande supporto per l’inserimento nel mondo del lavoro.

Ringrazio poi la dottoressa Marta Gallo per tutto il tempo trascorso in laboratorio, i consigli sul funzionamento degli strumenti, le correzioni dell’elaborato, le spiegazioni di Excel e, ovviamente, tutti i caffè al bar Denise.

Grazie mille al professor Mauro Banchemo, per le correzioni e tutto il materiale fornito in merito all’impregnazione con fluidi supercritici.

Infine grazie a Sara, Paolo e Vittoria per il supporto e la compagnia durante tutti questi mesi.