

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

Sviluppo di ZnO nano-strutturato per rilascio di farmaci, in assenza di solventi organici



Relatore

Prof.ssa Barbara Onida

Correlatori

Prof. Luigi Manna
Dr. Federica Leone

Candidato

Valeria Tersite

Luglio 2018

A mio padre, a mia madre, ai miei fratelli

Sommario

Acronimi	I
Introduzione	II
CAPITOLO 1	1
Ossido di Zinco nano-strutturato per il rilascio topico di farmaci	1
1.1 Introduzione	1
1.1.1 Metodi di sintesi dell'ossido di zinco nano-strutturato.....	2
1.2 Applicazioni biomedicali dell'ossido di zinco nano-strutturato	4
1.3 ZnO nanostrutturato come carrier di farmaci: Stato dell'arte	6
1.4 Applicazioni topiche di ZnO	7
1.4.1 La cute	7
1.4.2 Applicazioni dermatologiche dell'ZnO	8
1.4.3 Tossicità delle nano-particelle di ossido di zinco	8
CAPITOLO 2	9
Processo supercritico per l'incorporazione di farmaci.....	9
2.1 Introduzione	9
2.2 Proprietà dell'anidride carbonica supercritica	9
2.3 Processo d'incorporazione del farmaco tramite scCO ₂	11
2.3.1 Aspetti innovativi	12
2.3.2 Amorfizzazione del farmaco	13
2.4 Farmaci	14
2.4.1 Ibuprofene	14
2.4.2 Simvastatina.....	15
CAPITOLO 3	16
Materiali e metodi.....	16
3.1 Materiali	16
3.2 Sintesi dell'ossido di zinco nanostrutturato	16
3.3 Incorporazione con CO ₂ supercritica	16
3.3.1 Valutazione degli effetti del processo supercritico su Ns-ZnO.....	18
3.4 Quantificazione del farmaco incorporato	18

3.5 Sistema di rilascio per l'ibuprofene	20
3.6 Metodi di caratterizzazione	20
3.6.1 Diffrazione a raggi X	21
3.6.2 Analisi di fisisorbimento di azoto	21
3.6.3 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	21
3.6.4 Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo	21
 CAPITOLO 4	 22
Risultati.....	22
4.1 Caratterizzazione di Ns-ZnO	22
4.1.1 Analisi di fisisorbimento di azoto	22
4.1.2 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.....	24
4.1.3 Diffrazione a raggi X	25
4.1.4 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo.....	26
4.2 Caratterizzazione dell'Ibuprofene	27
4.2.1 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.....	27
4.2.2 Diffrazione a raggi X	28
4.3 Caratterizzazione della Simvastatina.....	29
4.3.1 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.....	29
4.3.2 Diffrazione a raggi X	30
4.4 Caratterizzazione di IBU@Ns-ZnO	30
4.4.1 Analisi di fisisorbimento di azoto.....	30
4.4.2 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.....	32
4.4.2.1 Valutazione degli effetti del processo supercritico su Ns-ZnO.....	33
4.4.4 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo.....	35
4.4.5 Quantificazione del farmaco incorporato.....	36
4.4.7 Valutazioni finali.....	38
4.4.6 Sistema di rilascio per l'ibuprofene	40
4.5 Caratterizzazione di SIM@Ns-ZnO	42
4.5.1 Analisi di fisisorbimento di azoto.....	42
4.5.2 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.....	44
4.5.3 Diffrazione a raggi X	45
4.5.4 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo.....	46

4.5.5 Quantificazione del farmaco incorporato.....	46
4.5.6 Determinazione del numero di molecole per nm ² e nm ³	48
4.5 Valutazione dei fattori che influenzano il “Drug Loading”	48
Conclusioni	51
Bibliografia	53
Ringraziamenti.....	57

Acronimi

Ossido di Zinco	ZnO
Ossido di Zinco nano-strutturato	Ns-ZnO
Ibuprofene	IBU
Simvastatina	SIM
Etanolo	EtOH
Tampone fosfato 7.4	PBS
Anidride carbonica supercritica	scCO ₂
Ibuprofene incorporato tramite scCO ₂	IBU@Ns-ZnO
Simvastatina incorporata tramite scCO ₂	SIM@Ns-ZnO
Ossido di zinco nano-strutturato trattato in scCO ₂	Ns-ZnO_scCO ₂
Diffraattometri a raggi X	XRD
Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	FT-IR
Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo	FESEM

Introduzione

L'obiettivo perseguito in questo lavoro di tesi è lo studio dell'ossido di zinco nano-strutturato, come carrier di farmaci per applicazioni dermatologiche. A tal fine, seguendo un approccio *green*, è stata scelta una tecnologia innovativa per l'impregnazione del carrier, che prevede l'utilizzo di anidride carbonica supercritica.

L'attività sperimentale, alla base di questo lavoro, rappresenta un primo tentativo di analisi della versatilità di Ns-ZnO, nella sua capacità d'incorporare diverse tipologie di farmaci, in particolare ibuprofene e simvastatina. In letteratura, infatti, sono rari i dati relativi alla combinazione della tecnologia scCO₂ con l'ossido di zinco nano-strutturato, soprattutto come *Drug Delivery System*.

Questo elaborato si articola in quattro capitoli. Il primo capitolo descrive, in maniera generica, le proprietà di Ns-ZnO e le possibilità di applicazione nel campo biomedicale, offrendo una visione complessiva dell'utilizzo di ZnO nano-strutturato come *drug delivery system*. Inoltre vengono valutati gli aspetti di tossicità di Ns-ZnO e viene posta attenzione sugli studi esistenti che lo coinvolgono nelle applicazioni topiche.

Il capitolo due tratta la tecnologia innovativa scCO₂, come metodo d'incorporazione di farmaci in Ns-ZnO. A tal fine sono descritte le proprietà fondamentali dell'anidride carbonica supercritica e i campi di applicazione in cui viene coinvolta, al fine di comprendere i meccanismi alla base del processo d'impregnazione tramite scCO₂, metodo utilizzato durante l'attività di tesi. Inoltre in questo capitolo vengono presentati i due farmaci modello scelti per l'attività di tesi, ovvero ibuprofene e simvastatina, di cui vengono descritte le proprietà fondamentali che li rendono interessanti nell'ambito della ricerca.

Con il terzo capitolo inizia la presentazione dell'attività sperimentale. Viene riportata la descrizione dei materiali utilizzati, il metodo di sintesi del supporto e le tecniche di caratterizzazione adottati. Inoltre, in questo capitolo, vengono descritte le fasi sperimentali alla base dell'attività di ricerca: l'incorporazione dei farmaci tramite scCO₂ e il sistema di rilascio dell'ibuprofene, tramite celle di Franz.

Il capitolo quattro presenta tutti i risultati ottenuti durante le fasi caratterizzanti l'attività sperimentale, con le opportune osservazioni.

CAPITOLO 1

Ossido di Zinco nano-strutturato per il rilascio topico di farmaci

1.1 Introduzione

L'interesse dell'uomo per l'innovazione e la ricerca di tecniche industriali efficienti ha aperto le porte al campo della nanotecnologia. Parlando di "nano-materiali" si intende la produzione di nano-particelle di dimensione non oltre 100 nm. Le peculiarità di questi materiali risiedono nelle loro ridotte dimensioni e nella morfologia, in grado di ottimizzare le proprietà chimico-fisiche [1]. In questa categoria rientrano gli ossidi inorganici, in particolare l'ossido di zinco (ZnO), visto le proprietà uniche che lo caratterizzano e la possibilità di applicazione in molteplici campi [2]. La sintesi degli ossidi metallici nano-strutturati garantisce l'ottenimento di materiali ad elevata area superficiale e volume dei pori e con una struttura tale da renderli funzionali per diverse applicazioni.

L'ossido di zinco (ZnO) è stato definito un materiale multifunzionale grazie alle sue proprietà intrinseche, quali alta stabilità chimica, termica e meccanica, elevata fotostabilità, biocompatibilità ed elevato coefficiente di accoppiamento elettrochimico [2]. ZnO è un materiale inorganico, semiconduttore di classe II-VI con energia di legame pari a 60 eV e un *energy gap* di 3.37 eV. Le proprietà piezo- e piroelettriche di questo materiale lo rendono idoneo nell'utilizzo come sensore, convertitore, generatore e fotocatalizzatore nel processo di produzione d'idrogeno. Grazie alla sua bassa tossicità, biocompatibilità e biodegradabilità, l'ossido di zinco è stato riconosciuto come un materiale sicuro da US Food and Drug Administration (FDA) [3].

Nella figura 1.1 sono mostrate le tre forme cristalline dell'ossido di zinco: sale di roccia, Zincoblenda e wurtzite.

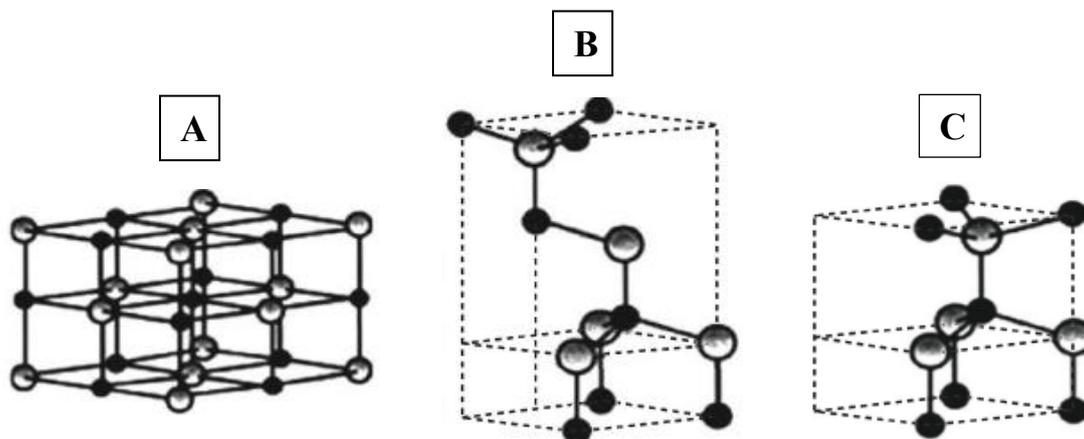


Figura 1.1 Forme cristalline dell'ossido di zinco: A) sale di roccia, B) Zincoblenda e C) wurtzite [4].

La struttura wurtzite esagonale, più stabile rispetto alle altre forme cristalline in condizioni ambientali, possiede i parametri di cella $a=0.3296$ nm e $c=0.52065$ nm. Essa presenta una struttura tetraedrica in cui ogni atomo di zinco è circondato da quattro atomi di ossigeno e viceversa [5].

Dalla sintesi dell'ossido di zinco è possibile ottenere un'ampia gamma di morfologie e strutture differenti e per questo motivo questo materiale può essere applicato in molti campi della nanotecnologia. ZnO si può presentare in strutture uni- (1D), bi- (2D) e tri- (3D) dimensionali (figura 1.2).

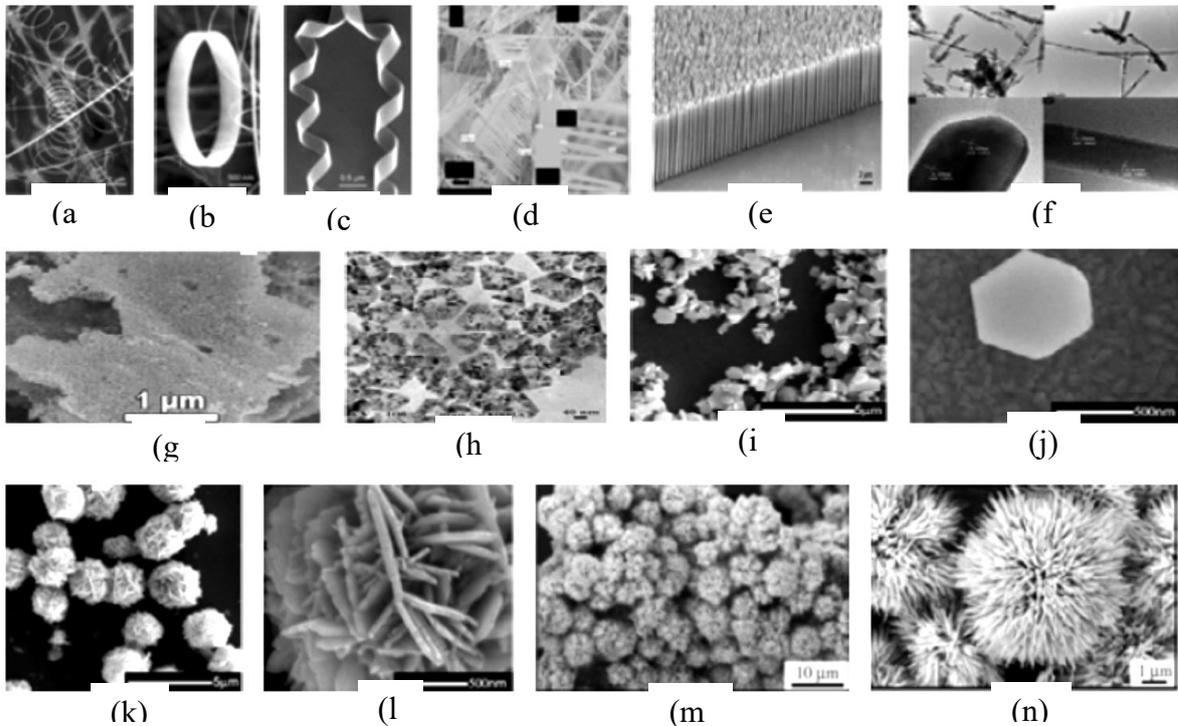


Figura 1.2 Strutture dell'ossido di zinco; ZnO (1D): (a) nanosprings, (b) nanorings, (c) nanohelix, (d) nanocombs, (e) nanowires e (f) nanorods. ZnO (2D): (g) nanosheets, (h) nanopellets e (i) nanoplates. ZnO (3D): (k) & (l) nanoflowers, (m) Nanomesosphere, (n) nanourchins [1].

1.1.1 Metodi di sintesi dell'ossido di zinco nano-strutturato

Le nano-particelle di ossido di zinco possono essere ottenute utilizzando diverse metodologie, in base alla morfologia e struttura richiesti dalla specifica applicazione. In accordo con una recente classificazione [1], i metodi utilizzati per la sintesi di ossido di zinco nano-strutturato sono riportati nella figura 1.3.

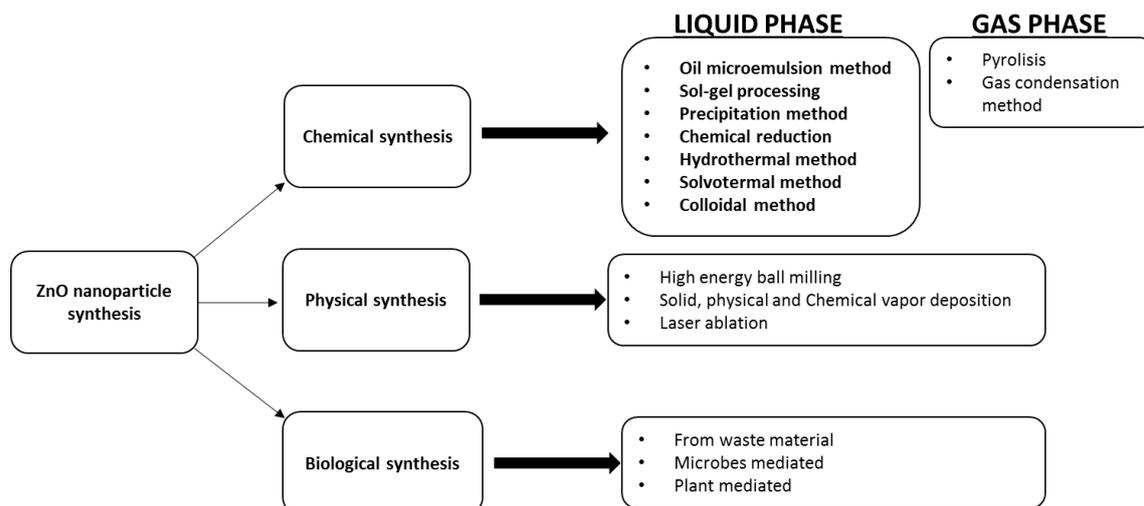


Figura 1.3 Tecniche utilizzate per la sintesi di nano-particelle di ZnO [1].

Come si evince dalla figura 1.3, tra i metodi chimici utilizzati in fase liquida, sono previsti i **metodi di precipitazione e co-precipitazione**, basati sulla reazione di un agente riduttivo con un sale di zinco. Questa interazione favorisce la formazione di un precipitato solubile o insolubile che, dopo un trattamento di lavaggio e calcinazione, porta alla formazione del materiale d'interesse. Per quanto riguarda il **metodo sol-gel**, la fase "sol" è una soluzione colloidale in cui particelle solide sono sospese in una fase liquida e la fase "gel" è ottenuta da metodi di poli-condensazione e successivo invecchiamento per raggiungere la fase di maturazione desiderata [6]. Questo metodo permette di produrre ZnO puro ed uniforme. Per ottenere ZnO sotto forma di film sottili, sfere (3D), fili o aste (2D) è conveniente utilizzare i **metodi solvo- o idro-termali** in cui i precursori sono dissolti in solventi caldi o acqua in condizioni di pressione pari a 1-10,000 atm e temperatura di 100-1000 °C.

Tra le tecniche di sintesi in fase gas è riportato il **metodo di pirolisi**. Un sale di zinco, che funge da precursore, è disperso in fase gas sotto forma di goccioline le cui dimensioni diminuiscono per disidratazione. Il **metodo di condensazione** prevede l'evaporazione di una certa sorgente di zinco all'interno di una camera riscaldata. Il vapore, fatto passare all'interno di una camera fredda riempita di gas inerte, viene raccolto e in seguito consolidato.

I metodi biologici si dividono essenzialmente in **metodo di sintesi mediato da piante** e **metodo di sintesi mediato da microrganismi**. Il primo metodo si basa sul metabolismo secondario delle piante in grado di convertire il precursore, ovvero il sale di metallo, in metallo o nano-particelle di ossido metallico. Nel secondo metodo sono i microrganismi a giocare un ruolo fondamentale per la trasformazione degli ioni in metalli o nano-particelle di ossidi metallici, tramite l'attività enzimatica. I metodi biologici, negli ultimi anni, stanno ottenendo molta attenzione essendo delle tecniche *green* [7].

I metodi fisici di sintesi dell'ossido di zinco, elencati nella figura 1.3, sono molto utilizzati soprattutto nei processi industriali [7].

1.2 Applicazioni biomedicali dell'ossido di zinco nano-strutturato

Viste le molteplici proprietà e morfologie che lo caratterizzano, l'ossido di zinco può essere applicato in più settori, come rappresentato nella figura 1.4.

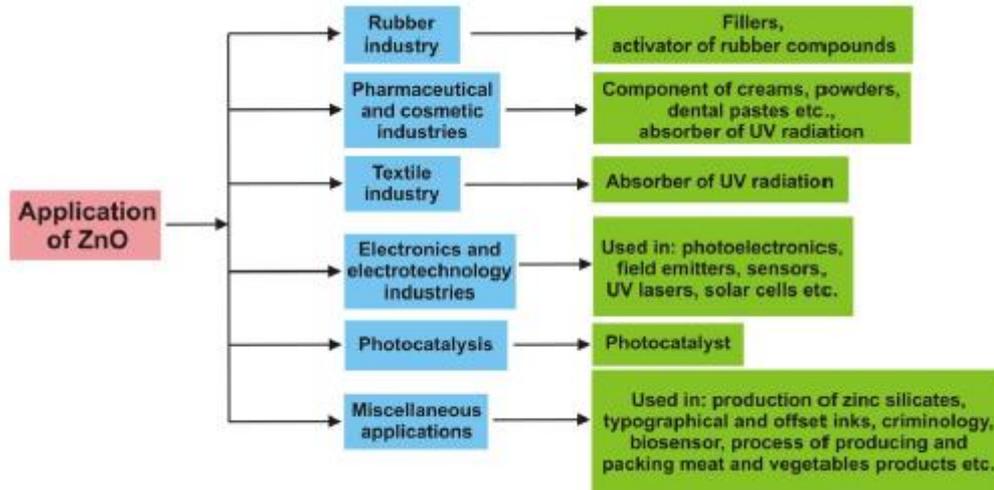


Figura 1.4 Applicazioni dell'ossido di zinco nano-strutturato [2].

Questo lavoro di tesi si colloca nell'ambito di applicazione di ZnO come sistema di rilascio di farmaci per via topica e a tal fine è di seguito riportato un approfondimento sulle proprietà biologiche di questo materiale nano-strutturato.

- **Agente antibatterico:** come tale, ZnO è in grado di bloccare e inibire la crescita batterica grazie a tre differenti meccanismi [8]. Il meccanismo predominante è il Meccanismo Fotocatalitico, che si basa sulla produzione di specie ossigeno reattive (ROS). In questo meccanismo si ha la formazione di radicali liberi molto reattivi come l'anione superossido O_2^{2-} e il radicale ossidrilico OH^{\cdot} , carichi negativamente e che quindi non penetrano nella membrana, e il perossido d'idrogeno H_2O_2 che attraversa la parete cellulare e causa problemi ai componenti cellulari. I ROS si formano grazie alla presenza di difetti sulla superficie del cristallo di ZnO in mancanza di radiazioni UV. Altro meccanismo è l'interazione elettrostatica tra le nano-particelle di ZnO e la parete cellulare dei batteri che provoca la perdita d'integrità della membrana con alterazione del loro metabolismo basale. Terzo e ultimo meccanismo è il rilascio di ioni Zn^{2+} dovuto all'accumulo di nano-particelle di ZnO all'interno della cellula. Quest'ultimo meccanismo, per il quale gli ioni disciolti possono distruggere la membrana modificandone la permeabilità, sembrerebbe meno efficiente dato il basso grado di dissoluzione delle particelle di ZnO [4].

L'attività antibatterica di ZnO è fortemente influenzata dalla morfologia, dimensione e concentrazione delle nano-particelle di ossido di zinco. Ad esempio, la forma delle particelle influenza il loro processo di internalizzazione: le nano-particelle a forma di asta presentano una migliore penetrazione rispetto a quelle sferiche, mentre le nano-particelle con struttura lamellare garantiscono una più alta attività antibatterica grazie all'area superficiale elevata che li caratterizza. Pertanto, la forma e concentrazione delle nano-particelle di ZnO giocano un ruolo fondamentale nell'attività antibatterica. Le nano-

strutture con dimensioni più piccole garantiscono una migliore performance, grazie all'area superficiale esposta più elevata.

- **Agente antimicrobico:** con gli stessi meccanismi descritti nell'attività antibatterica, le nano-particelle di ZnO risultano essere attive anche contro i funghi patogeni [5]. Questa duplice attività rende l'ossido di zinco molto versatile e interessante per applicazioni biologiche. Le proprietà antimicrobiche di ZnO lo rendono idoneo per la protezione delle formulazioni in campo farmaceutico e cosmetico e anche nel campo alimentare nel settore del *packaging* per la conservazione del cibo [9].
- **Agente antitumorale:** le proprietà terapeutiche delle nano-medicine le rendono idonee al trattamento di malattie come il cancro. Come altri ossidi inorganici, l'ossido di zinco presenta una citotossicità intrinseca verso le cellule tumorali. Uno dei meccanismi, grazie al quale ZnO svolge la sua attività antitumorale, è basato sulla sua abilità di produrre specie ROS, precedentemente descritte, capaci d'indurre stress ossidativo e morte della cellula [10]. Un'altra caratteristica, che rende l'ossido di zinco idoneo per il trattamento antitumorale, è la sua elettrostaticità: le nano-particelle di ZnO hanno una forte carica superficiale positiva e sono in grado d'interagire con gli anioni fosfolipidici presenti sulla membrana delle cellule tumorali, promuovendone la sconfitta[11].
- **UV blocker:** le nano-particelle di ZnO sono in grado di assorbire le radiazioni UV e per questo sono molto utilizzate nell'industria cosmetica per la produzione di creme per la protezione solare. Per evitare che i raggi UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) possano innescare delle reazioni metaboliche con l'insorgenza di eritemi e danni sulla pelle, oggi i prodotti per la protezione solare prevedono una combinazione di ZnO e biossido di titanio (TiO₂). Il meccanismo base prevede lo *scattering* o assorbimento delle radiazioni UV con protezione efficiente della pelle [12].
- **Biosensore:** le caratteristiche di ZnO lo rendono adatto alle applicazioni come biosensore; infatti l'elevato rapporto superficie-volume, l'elevata attività elettrochimica e catalitica, la stabilità chimica e la mancata tossicità sono delle proprietà adatte per l'immobilizzazione enzimatica e il trasporto elettronico al collettore di corrente. Inoltre ZnO ha un elevato punto isoelettrico pari a 9-10 quindi permette l'assorbimento di proteine tramite interazioni elettrostatiche [13].
- **Applicazione in Bioimaging:** le nano-particelle di ZnO, soprattutto nella forma di *Quantum Dots*, sono utilizzate nel campo del *Bioimaging* per il monitoraggio delle cellule vive e dei tessuti. L'ampia banda di assorbimento, la banda di emissione stretta e simmetrica, l'alta stabilità e le caratteristiche tipiche di un semiconduttore rendono ZnO adatto per questo tipo di applicazione [14].
- **Drug Delivery system:** scopo principale di questa tesi è l'analisi di ZnO utilizzato come sistema di rilascio di farmaci per via topica; quindi nei paragrafi successivi è riportato lo stato dell'arte di ZnO come Drug Delivery system e, in particolare, la sua applicazione nell'ambito dermatologico.

1.3 ZnO nanostrutturato come carrier di farmaci: Stato dell'arte

Negli ultimi anni è cresciuta l'attenzione per l'ossido di zinco come materiale adatto a fungere da sistema di rilascio dei farmaci. Infatti la possibilità di ottenere nano-particelle con alta area superficiale ed elevato volume dei pori grazie al processo di sintesi, ha evidenziato l'idoneità di questo materiale per questo tipo di applicazione. In letteratura, tra i lavori degli autori che trattano questa tematica, è possibile distinguere gli studi che coinvolgono ZnO come carrier puro e quelli che utilizzano carrier compositi di ZnO.

Come già evidenziato nel paragrafo precedente, l'ZnO è un efficace agente antitumorale e come tale è oggetto di molte ricerche. Ad esempio la produzione di ZnO mesoporoso per il rilascio di Doxorubicina è stato investigato da più gruppi di ricerca, quali Tian e colleghi [15], Liu e collaboratori [16]. I diversi lavori differiscono per tecnica di sintesi utilizzata e metodo d'incorporazione del farmaco nel carrier e sono valutati in termini di area superficiale esibita da ZnO, disponibile per l'intrappolamento del farmaco e capacità di rilascio del carrier. Un aspetto discusso in molti lavori presenti in letteratura è la possibilità di funzionalizzare e migliorare le proprietà di ZnO per l'incorporazione del farmaco, specie nei processi applicati in campo medico per la lotta contro il cancro. Nel 2010, a tal proposito, Mitra e collaboratori hanno sintetizzato ZnO nella forma di *nanorods* per il rilascio di Doxorubicina [3]. Il processo, che prevedeva più step chimici di funzionalizzazione, è risultato molto performante con una percentuale di *Drug Loading Efficiency* pari a 88% [17]. Molte delle attività sperimentali hanno evidenziato la dipendenza della fase di rilascio delle molecole di farmaco dal pH del solvente in cui il rilascio viene effettuato. La possibilità di effettuare dei rilasci a pH controllato è vantaggioso nel processo curativo perché i siti target dove è localizzato il tumore presentano un pH basso, stimolando il rilascio del farmaco.

Negli ultimi anni molti studi si sono concentrati sulla possibilità di progettare dei carrier di farmaci ottenuti dalla combinazione di ossido di zinco e altri materiali, come ad esempio polimeri, in grado di migliorare le proprietà dell'ossido inorganico. Questi sistemi compositi di ZnO sono utilizzati nelle applicazioni medicali per il trattamento antitumorale. Ad esempio la combinazione di ZnO con il polimero poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) è stata studiata da Stankovic [18]. Il materiale innovativo, ottenuto dalla combinazione, è costituito da particelle sferiche utilizzate contro le malattie infettive. Wei e collaboratori hanno valutato la possibilità di combinare PLGA e ZnO mesoporoso ottenendo un carrier singolo in grado di vincere la resistenza del farmaco e massimizzare l'attività antitumorale [19].

Dall'analisi degli studi presenti in letteratura, si evince che il vantaggio principale garantito da questi sistemi è la possibilità di effettuare un rilascio controllato del farmaco, sia utilizzando ossido di zinco puro che sistemi combinati e il fatto che il materiale è già biologicamente attivo intrinsecamente.

Dall'analisi dello stato dell'arte attuale emerge che lo studio dell'ZnO come *Drug Delivery System* è ancora all'inizio e solo da pochi anni la comunità scientifica si sta concentrando su questa tematica. Inoltre, nonostante l'applicazione di ZnO in ambito dermatologico abbia origini tradizionali e da sempre viene utilizzato, in letteratura ci sono pochissimi lavori che studiano ZnO come carrier di farmaci sulla pelle.

1.4 Applicazioni topiche di ZnO

Negli ultimi anni lo sviluppo dei *Drug Delivery systems*, per applicazioni topiche, ha rappresentato una possibile soluzione alla difficile permeazione di alcuni farmaci attraverso la pelle, a causa della sua natura lipidica. La pelle, costantemente esposta all'azione di agenti patogeni, diventa spesso sede di infezioni [20]. Il vantaggio garantito dalla progettazione di carrier di farmaci risiede nella possibilità di effettuare un rilascio controllato del farmaco sulla pelle.

1.4.1 La cute

La pelle è principalmente costituita da tre strati: l'epidermide, il derma e l'ipoderma. La sua struttura completa è schematizzata nella figura 1.5 [21].

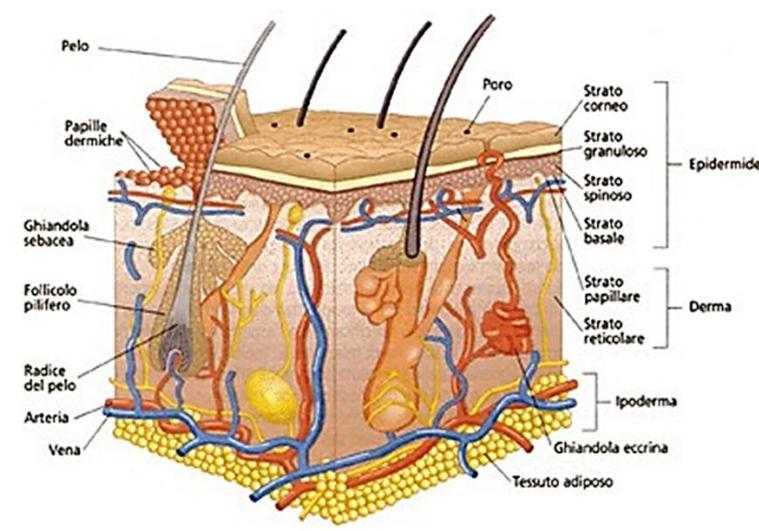


Figura 1.5 Rappresentazione schematica della pelle [21].

L'epidermide è la parte più esterna formata da strati di cheratinociti, cellule che sono libere di muoversi dallo strato basale allo strato corneo dell'epidermide e melanociti, cellule responsabili della colorazione della pelle. Nello strato corneo, le cellule si aggregano con una forma piatta formando i corneociti (*fase brick*), cellule circondate da una matrice lipidica extracellulare (*fase mortar*), ricca di proteine. Il derma è costituito da un tessuto connettivo irregolare e denso, ricco di cellule nervose, vasi sanguigni e linfatici. L'ipoderma è lo strato più profondo della cute ed è formato da tessuto connettivo e grasso. L'assenza di una rete vascolare, richiede la progettazione di un sistema per il rilascio di farmaci, in grado penetrare nell'epidermide per raggiungere il derma [22].

Lo strato corneo, nell'epidermide, è il principale responsabile della difesa della cute dagli agenti estranei, essendo direttamente in contatto con l'ambiente esterno. Questo strato è lipofilo, coperto dal sebo secreto dalle ghiandole sebacee, dal sudore e dalle cellule morte. Il trasporto delle sostanze attraverso lo strato corneo avviene per diffusione passiva.

Eventuali svantaggi associati al processo di *Drug Delivery system* sono legati alle conseguenze tossiche che il processo di penetrazione può causare. Uno dei parametri che

governa il processo d'interazione tra il carrier e la pelle è la dimensione delle particelle. Gli studi di Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) hanno rivelato che solo le particelle con dimensione minori di 10 nm sono in grado di penetrare i tessuti della pelle. Inoltre anche la morfologia delle particelle gioca un ruolo importante nel processo di penetrazione cutanea: le particelle con forma ad aste causano tossicità più di altre tipologie di forma. Un altro parametro da tenere in considerazione, sebbene il suo effetto non sia ancora molto chiaro, è la carica superficiale negativa presente sulla pelle che, tramite interazioni elettrostatiche, influenza la penetrazione del carrier [22].

1.4.2 Applicazioni dermatologiche dell'ZnO

Grazie alle sue proprietà, precedentemente descritte, ZnO è molto utilizzato in ambito dermatologico grazie alla sua capacità di curare le ferite ed irritazioni cutanee, creando una barriera protettiva sulla pelle. Un materiale idoneo per il processo di *Wound Dressing* deve essere biocompatibile, non tossico, possibilmente biodegradabile. ZnO somministrato sulla pelle agisce come un cofattore e favorisce la migrazione dei cheratinociti durante il processo di medicazione, difendendo da infezioni batteriche [23]. Data la sua biocompatibilità e non-tossicità, ZnO è tra i componenti di molti prodotti per la cura del corpo, mentre le sue proprietà antibatteriche lo rendono ideale come componente negli shampoo antiforfora e negli unguenti antisettici. Tuttavia, negli ultimi anni sta crescendo il suo utilizzo per la prevenzione dell'acne, grazie alla sua attività antinfiammatoria. Tra tutti i nano-materiali, ZnO è il più versatile perché le diverse metodologie di sintesi possono produrre forme differenti e ottimizzare l'interazione con la cute; questo aspetto lo rende ottimale nell'ambito cosmetico.

1.4.3 Tossicità delle nano-particelle di ossido di zinco

L'utilizzo delle nano-particelle di ZnO nell'ambito medicale, ci obbliga a prendere in considerazione alcuni aspetti legati alla sua tossicità. Relativamente a questa tematica in letteratura i dati riportati sono ambigui: da una parte molti ricercatori evidenziano come ZnO porti ad una riduzione dell'attività cellulare e ad un danneggiamento delle membrane cellulari, dall'altra parte però in molti osservano l'utilità di ZnO per la sua attività antitumorale [24].

Uno degli studi più recenti è quello di Holmes e colleghi [25], atto a valutare il livello di penetrazione delle particelle di ZnO nella pelle e la loro tossicità. L'analisi di diverse formulazioni comunemente usate nei prodotti cosmetici, presenti in commercio, hanno evidenziato la presenza degli ioni zinco nello strato corneo, più esterno e non hanno osservato l'attraversamento dell'epidermide.

Un altro studio recente ha confermato l'attività tossica di ZnO contro le cellule T cancerose e non contro le cellule normali presenti nel corpo umano. Hanley et al. Hanno dimostrato che l'effetto citotossico delle nano-particelle di ZnO non va ad intaccare il normale funzionamento delle cellule non affette dal cancro [26].

L'insieme di queste osservazioni sottolinea la grande attenzione riservata a ZnO come *Drug Delivery system*, con particolare interesse per l'applicazione cutanea.

CAPITOLO 2

Processo supercritico per l'incorporazione di farmaci

2.1 Introduzione

Nelle industrie farmaceutiche, il recente interesse, rivolto all'utilizzo di solventi alternativi a quelli comunemente utilizzati, nasce dalla necessità di risolvere le problematiche ambientali causate dai rifiuti prodotti dai tradizionali processi produttivi che fanno utilizzo di solventi organici [27], [28]. I solventi organici, molto utilizzati nei processi di sintesi dei carrier e d'incorporazione dei farmaci API (Active Pharmaceutical Ingredients), hanno un forte impatto ambientale e i loro residui sono fortemente tossici [29]. Per questi motivi è nata, soprattutto negli ultimi anni, l'esigenza di un processo chimico *green*, sostenibile da un punto di vista ambientale. In questo contesto si colloca la tecnologia che prevede l'utilizzo di solventi supercritici, come alternativa alle tecniche d'incorporazione tradizionali. In questo lavoro di tesi è stata utilizzata l'anidride carbonica supercritica (scCO₂) come mezzo d'incorporazione dei farmaci, Ibuprofene e Simvastatina, all'interno del carrier ZnO.

2.2 Proprietà dell'anidride carbonica supercritica

L'anidride carbonica è detta supercritica quando la sua pressione e temperatura si trovano al di sopra del punto critico ($T_c = 31^\circ\text{C}$; $P_c = 74 \text{ bar}$). In queste condizioni, il fluido assume delle proprietà particolari in quanto mostra caratteristiche di solvatazione e densità tipici di una fase liquida (densità di scCO₂ compresa tra 0.2 e 1.5 g/cm³) e invece capacità di trasferimento di massa e viscosità tipici di una fase gas. La CO₂ è molto utilizzata come solvente supercritico perché ha un basso punto critico, non è tossica né infiammabile, è altamente pura, inodore, incolore, sicura ed economica. Il cambiamento dei parametri fisici, pressione e temperatura, comporta un cambio di fase dell'anidride carbonica che può trovarsi allo stato solido, liquido o gassoso.

La figura 2.1 mostra il diagramma di fase dell'anidride carbonica. Si osserva che un incremento della temperatura e pressione comporta una riduzione di densità della fase liquida e un incremento di densità della fase vapore. Nel cosiddetto "punto critico", le due densità sono esattamente le stesse e la fase liquida e vapore si combinano in un'unica fase.

La scCO₂ risulta essere un'adeguata sostituta dei solventi organici in quanto è molto versatile, infatti presenta un'elevata compressibilità per valori dei parametri fisici nell'intorno del punto critico. Di conseguenza la densità e il potere di solvatazione di scCO₂ è regolabile in un ampio range di temperatura e pressione [30].

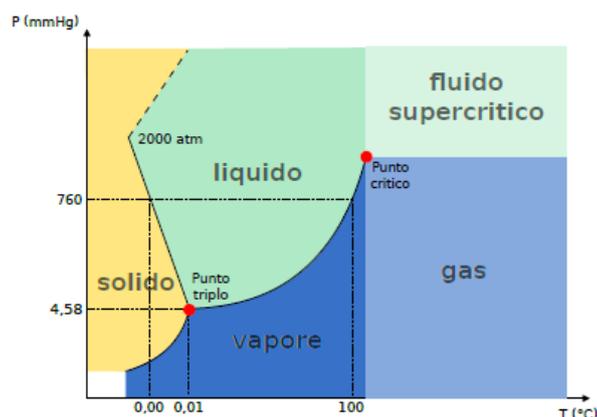


Figura 2.1 Diagramma di fase di $scCO_2$ [31].

Nato dalla necessità di un processo green, il metodo d'incorporazione di farmaci, con utilizzo di $scCO_2$, mostra un'alta versatilità tecnologica che lo rende idoneo per diversi campi applicativi:

- ✓ **Industria alimentare:** $scCO_2$ utilizzato nel processo di estrazione della caffeina e del luppolo da matrici solide. All'interno di un vessel ad alta pressione, la circolazione di $scCO_2$ permette di recuperare il prodotto desiderato dal materiale solido e portarlo all'interno di un altro vessel, dove viene separato dal gas grazie a una fase finale di depressurizzazione.
- ✓ **Sistemi di lavaggio:** la $scCO_2$ ha una tensione superficiale nulla ed è in grado di raggiungere grandi profondità all'interno dei materiali; per questi motivi è ideale nei sistemi di lavaggio da residui organici [32].
- ✓ **Trattamento dei materiali:** $scCO_2$ è molto utilizzata nei processi di micronizzazione delle polveri, di rivestimento di aerogel 3D ed esfoliazione dei materiali stratificati [33].
- ✓ **Industria farmaceutica:** la $scCO_2$ riveste un ruolo importante nella progettazione di sistemi nano-strutturati per il rilascio dei farmaci ed in questo contesto si colloca il lavoro di questa tesi.

Oltre alla versatilità e biodisponibilità, la tecnologia $scCO_2$ opera in condizioni vantaggiose, ovvero richiede tempi e temperature non molto elevate e questo aspetto è molto importante soprattutto quando si opera su materiali termolabili.

Tuttavia bisogna riconoscere anche i limiti di questa tecnica utilizzata. La tecnologia $scCO_2$ richiede alti valori di pressioni, alti costi di manutenzione ed ha una scarsa capacità di dissoluzione nelle specie ioniche e polari perché è una molecola lineare con momento dipolare nullo. Questo aspetto non la rende idonea per tutti i tipi di composti, sebbene la sua combinazione con un co-solvente, ad esempio l'etanolo, possa incrementare la sua polarità [34].

2.3 Processo d'incorporazione del farmaco tramite scCO₂

Come descritto nel paragrafo precedente, uno dei principali campi applicativi della tecnologia scCO₂ è quello farmaceutico per la progettazione di sistemi di rilascio di farmaci. La figura 2.2 mostra una rappresentazione schematica dell'apparato utilizzato per la realizzazione del *Drug impregnation* tramite scCO₂.

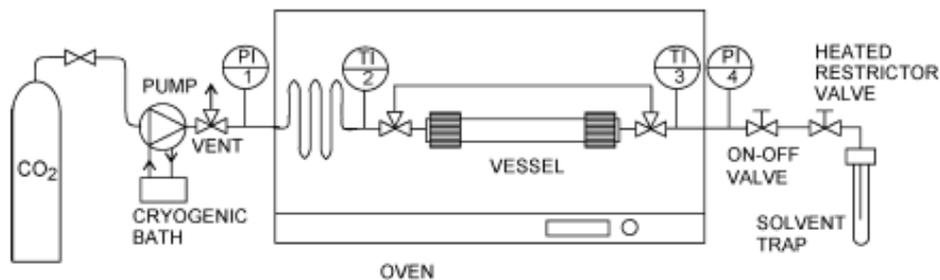


Figura 2.2 Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per l'incorporazione dei farmaci in Ns-ZnO [35].

L'apparato utilizzato per il processo d'impregnazione tramite scCO₂ presenta un sistema di controllo della temperatura e di regolazione della pressione. Il processo può avvenire in modalità statica o in condizioni di agitazione. All'interno del vessel, dove vengono inseriti il materiale e il farmaco, viene pompata la scCO₂ fino a raggiungere le condizioni di pressione desiderata. Il processo d'impregnazione, tramite scCO₂, è molto performante grazie alle proprietà del solvente utilizzato, ovvero alta densità e buon potere solvente, tali da permettere la solubilizzazione del farmaco (API) al suo interno. Inoltre la scCO₂ presenta un'alta diffusività che gli permette di diffondere all'interno del supporto presente nel vessel.

Il processo di *Drug Loading* tramite scCO₂ si compone di tre fasi principali [34], come mostra la figura 2.3:

- **FASE 1:** dissoluzione del farmaco API in scCO₂;
- **FASE 2:** la soluzione di farmaco in scCO₂ diffonde e si adsorbe all'interno del materiale. La FASE 1 e la FASE 2 avvengono contemporaneamente alle stesse condizioni di pressione e temperatura. L'interazione tra il materiale e il farmaco può essere di natura debole, ovvero un semplice meccanismo di deposizione che può portare alla cristallizzazione del farmaco oppure può essere un'interazione forte, mediata da legami idrogeno o legami di Van der Waals, che garantisce un'elevata percentuale di *Drug Loading* [36];
- **FASE 3:** depressurizzazione dell'impianto con ritorno della CO₂ in forma gassosa e recupero del sistema incorporato. In seguito a questa fase, il materiale, contenente il farmaco incorporato, è già pronto per essere utilizzato senza bisogno di una fase finale di purificazione dal solvente.

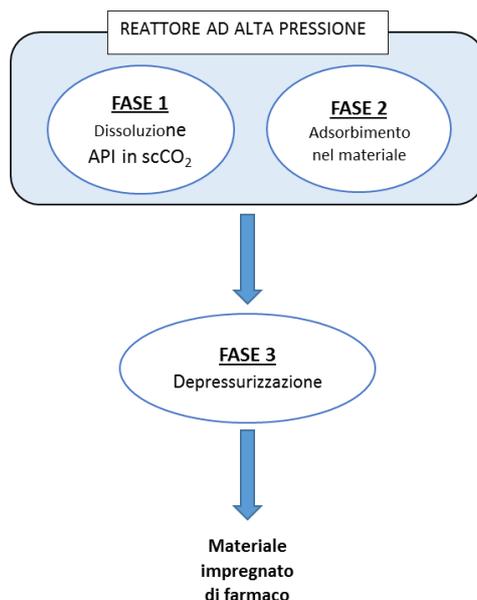


Figura 2.3 Rappresentazione schematica delle tre fasi caratteristiche del processo di Drug Loading con $scCO_2$.

I parametri termodinamici e cinetici influenzano fortemente il processo d'impregnazione, in particolare la temperatura e la pressione giocano un ruolo fondamentale in quanto ogni loro modifica ha un effetto sulla percentuale di *Drug Loading*, in relazione alla natura del materiale e del farmaco coinvolti [37]. Altri due parametri importanti da considerare, all'interno del processo analizzato, sono il tempo di contatto e la diffusività. La tecnologia $scCO_2$ ha infatti la capacità di migliorare la diffusione del farmaco all'interno di una matrice polimerica, migliorando la performance del processo d'impregnazione.

2.3.1 Aspetti innovativi

La tecnologia $scCO_2$, applicata al processo d'incorporazione del farmaco all'interno di una matrice, nasce come alternativa alla tecnica convenzionale, generalmente utilizzata nei processi produttivi, ovvero il metodo di adsorbimento da soluzione. Questo metodo richiede il rilascio del carrier all'interno di una soluzione di farmaco fortemente concentrata, per più ore, al fine di ottenere l'adsorbimento delle molecole del farmaco all'interno delle porosità del materiale [38]. Sebbene questo metodo sia stato utilizzato per molti anni, perché semplice da realizzare e non richiede l'utilizzo di apparecchiature costose, presenta una serie di svantaggi, che in parte sono stati già discussi nel paragrafo 2.2. Come precedentemente detto, questo metodo tradizionale ha un effetto negativo sull'ambiente a causa della tossicità dei residui organici nei prodotti finali. Il metodo di adsorbimento da soluzione necessita, inoltre, di una fase finale di separazione e purificazione dalla soluzione di farmaco residua e prevede l'utilizzo di un'elevata quantità di solvente organico in quanto molti farmaci sono poco solubili in acqua [39].

La tecnologia $scCO_2$, che si pone come alternativa innovativa ai metodi convenzionali, è in primo luogo una tecnica d'impregnazione *green* in quanto $scCO_2$ non è tossico, né infiammabile e né costoso, è riciclabile e adatto alle applicazioni farmaceutiche. Data la sua natura apolare, $scCO_2$ è un ottimo solvente per i farmaci scarsamente solubili in acqua quindi può sostituire i solventi organici e non richiede alcun trattamento finale di purificazione. Inoltre, la possibilità di manipolare i parametri fisici di processo, in base alla

natura del farmaco e del materiale, permette di ottimizzare il contatto tra le fasi e di ottenere la conversione del farmaco API in uno stato amorfo, tale da migliorare il suo profilo di dissoluzione e la sua biodisponibilità [34]. Questo aspetto verrà indagato nel paragrafo 2.3.2, di seguito riportato.

2.3.2 Amorfizzazione del farmaco

Le singole molecole del farmaco possono esibire diversa polimorfia. La forma cristallina è caratterizzata da ordine, diversamente, quella amorfa è una forma disordinata e metastabile, che tende a minimizzare la sua energia interna e a cristallizzare. In passato, nell'ambito di rilascio dei farmaci, lo stato amorfo non veniva considerata adatto all'attività terapeutica, data la sua instabilità; oggi, invece, molteplici sono le formulazioni amorse messe in commercio dall'industria farmaceutica.

Esistono due metodi per convertire una forma cristallina in amorfa: conversione diretta (irradiazione o attivazione meccanica) oppure trasformazione in una forma termodinamicamente stabile, non cristallina attraverso un processo di adsorbimento, precipitazione o deposizione [40]. La seconda modalità nota come "metodo d'impregnazione del solvente" garantisce la conversione del farmaco in uno stato amorfo, all'interno di una matrice porosa. L'uso di soluzioni supercritiche per il confinamento di farmaci amorfi non è sistematicamente studiato in letteratura. In realtà, ciò che si evince è che, indipendentemente dal solvente utilizzato, avvengono due fenomeni durante il processo, ovvero l'adsorbimento del farmaco sulla superficie e la sua precipitazione per evaporazione del solvente.

Uno degli strumenti utilizzati per caratterizzare lo stato dei solidi confinati è la diffrazione a raggi X (XRD). La scomparsa di alcuni picchi caratteristici del materiale viene infatti interpretata come prova dell'amorfismo. In realtà i reticoli XRD, nei materiali nano-strutturati confinati, possono non essere distinti da quelli dei solidi amorfi puri, quindi l'interpretazione del diffrattogramma ottenuto dall'analisi XRD non basta per trarre una conclusione definitiva, relativa all'avvenuta amorfizzazione. Altre tecniche di caratterizzazione spesso utilizzate per qualificare le interazioni sono la spettroscopia infrarossa e vibrazionale.

Molteplici studi effettuati hanno permesso di osservare la presenza di un certo diametro critico, al di sotto del quale la cristallizzazione è completamente soppressa; per le piccole molecole esso si attesta tra 0,3 e 1,0 nm. Tuttavia, i farmaci nei pori più grandi sono più soggetti a subire la nucleazione che dà origine alla fase cristallina. Gli studi hanno dimostrato che, in genere, i solidi confinati hanno una distribuzione più ampia e le molecole sono più mobili rispetto alle fasi cristalline. Questo significa che le molecole in superficie mostrano un comportamento simile a un fluido, con una maggiore mobilità rispetto alle molecole nel nucleo dei pori, dove la mobilità è simile a quella della fase cristallina di bulk. Dal punto di vista pratico, questo aspetto può implicare una maggiore reattività dei solidi amorfi rispetto ai cristallini.

2.4 Farmaci

In questo lavoro di tesi è stato effettuato ed analizzato il *Drug Loading* di due diversi farmaci, Ibuprofene e Simvastatina, all'interno del carrier ZnO nano-strutturato, tramite tecnologia sCO₂. In questo paragrafo verranno descritti gli aspetti generali di questi due differenti modelli.

2.4.1 Ibuprofene

Di comune utilizzo per la sua attività antinfiammatoria, antipiretica e analgesica, l'ibuprofene (IBU) è un farmaco antinfiammatorio non steroideo (o FANS), molto utilizzato nelle formulazioni farmaceutiche per il trattamento di molte malattie [41].

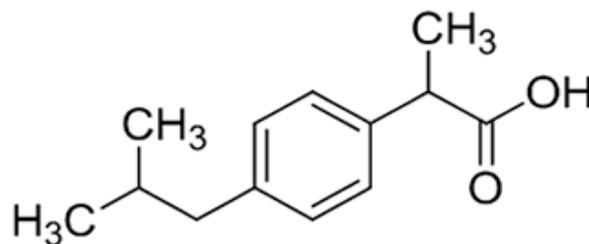


Figura 2.4 Struttura chimica dell'ibuprofene ((2RS)-1[4-(2-methyl propyl) phenyl] propionic acid).
Formula molecolare: C₁₃H₁₈O₂; Peso molecolare: 206.131 g/mol [42].

Convenzionalmente l'ibuprofene è somministrato per via orale come compressa, tablet, sospensione o soluzione ma negli ultimi tempi è stato coinvolto nei processi di trattamento e cura delle ferite nell'ambito biomedicale [43]. Molte ferite fisiche richiedono tempistiche lunghe per la guarigione, per questo negli ultimi anni sono stati studiati dei processi di formulazione dei farmaci da applicare *in loco*, a piccole dosi, per la riduzione del dolore. L'ibuprofene è stato scelto come uno dei due farmaci modello non solo perché molto utilizzato nell'industria farmaceutica ma anche per la sua bassa solubilità in acqua (0.021 mg/ml). Questo farmaco è caratterizzato da una elevata versatilità, infatti oltre ad avere un'elevata affinità con gli alcol, come l'etanolo, esibisce una buona interazione con le ciclodestrine, silici e matrici polimeriche [44]. Per superare le problematiche causate dall'utilizzo di solventi organici all'ambiente e alla salute umana, gli studi odierni mirano al coinvolgimento dell'ibuprofene nei processi di *Drug Loading* tramite sCO₂. L'idea d'incorporare l'ibuprofene in ZnO con creazione di una formulazione adatta al rilascio topico è un approccio innovativo nell'ambito delle applicazioni biomedicali [45].

2.4.2 Simvastatina

La Simvastatina (SIM) è un composto appartenente alla famiglia delle Statine, farmaci che inibiscono la sintesi del colesterolo, infatti la SIM è un potente inibitore selettivo e competitivo dell'enzima HMG-CoA reduttasi deputato alla conversione di 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A in mevalonato [46]. Grazie a questa sua attività la simvastatina viene impiegata per trattare l'ipercolesterolemia e per prevenire le malattie cardiovascolari. L'organo su cui agisce SIM per ridurre il colesterolo è il fegato.

Come per l'ibuprofene, la principale modalità di somministrazione è quella orale sotto forma di capsule e, dopo la somministrazione, SIM è convertita in β,δ -diidrossiacido dal citocromo P450(CYP) 3A.

La simvastatina inoltre è un antinfiammatorio ed è utilizzato per la cura delle malattie diabetologiche [47].

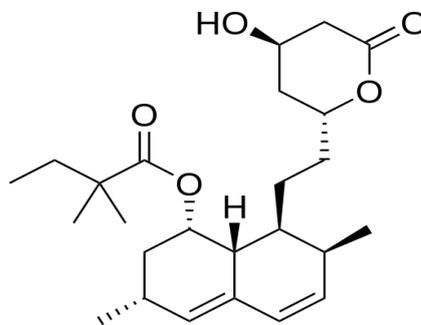


Figura 2.5 Struttura chimica della simvastatina (2,2-dimetilbutanoato di (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-idrossi-6-oxotetraidro-2H-piran-2-il]etil}-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-esaidronaftalen-1-ile). Formula molecolare: C₂₅H₃₈O₅; Peso molecolare: 418.566 g/mol [48].

La simvastatina è una statina liposolubile, la sua solubilità in acqua è pari a 0,00003 mg/ml [48]. Per questo motivo, come visto per l'ibuprofene, nasce, in questo lavoro di tesi, l'intenzione di valutare la sua percentuale di *Drug Loading* in ZnO utilizzando la tecnologia scCO₂ [49].

In letteratura non esistono ricerche e attività sperimentali che hanno coinvolto la simvastatina come farmaco modello in processi di Drug Loading e soprattutto non sono noti eventuali interazioni con l'ossido di zinco. L'analisi di comparazione dei due farmaci, IBU e SIM, incorporati nello stesso carrier, in termini di percentuale di farmaco incorporato, è del tutto innovativa e nuova è l'idea di una loro possibile somministrazione cutanea.

CAPITOLO 3

Materiali e metodi

3.1 Materiali

Cloruro di zinco (ZnCl_2), urea (NH_2CONH_2), acido cloridrico (HCl) (37%), etanolo ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), tampone fosfato salino 7.4 (PBS), ibuprofene ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$), simvastatina ($\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5$), acqua bidistillata sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

3.2 Sintesi dell'ossido di zinco nanostrutturato

L'ossido di zinco nanostrutturato (Ns-ZnO) è stato sintetizzato utilizzando il processo chimico denominato “*chemical bath deposition*”, descritto da Kakiuchi e colleghi. [50]

La procedura, semplice e versatile, non prevede l'utilizzo di solventi organici e porta all'ottenimento di particelle di ossido di zinco, in nanofogli, a partire dalla trasformazione pirolitica di un precursore cresciuto in soluzione acquosa.

Inizialmente sono stati pesati 0.7 g di cloruro di zinco (ZnCl_2) e 6 g di urea (NH_2CONH_2) che poi sono stati inseriti in 100 ml di acqua bidistillata, per ottenere idrossido di zinco carbonato idrato ($\text{Zn}_4\text{CO}_3(\text{OH})_6\text{H}_2\text{O}$), come precursore di Ns-ZnO. Il valore di pH della soluzione è stato portato da 6.5 a 4, utilizzando HCl 1M. Da questa fase di preparazione preliminare, è stata ottenuta una soluzione trasparente, sottoposta ad agitazione magnetica a 350 rpm e ad una temperatura di 80°C per 24 ore in reflux. Al termine del tempo stabilito, è stata osservata la deposizione, al fondo del sistema, di un precipitato bianco, ovvero il precursore, separato dal surnatante tramite filtrazione, usando un filtro Büchner. Il precipitato recuperato, è stato sottoposto ad un trattamento termico per la conversione del precursore in Ns-ZnO: dopo un'ora all'interno di un forno statico a 40°C, è stato calcinato in un forno tubolare (Asalair 1200) in cui, impostata una certa rampa di temperatura, è stato mantenuto a 300°C per 45 minuti. Questa fase finale ha permesso l'ottenimento del carrier utilizzato nel lavoro di tesi, ovvero ossido di zinco nanostrutturato (Ns-ZnO).

3.3 Incorporazione con CO_2 supercritica

L'incorporazione dei farmaci, ibuprofene e simvastatina, nel carrier Ns-ZnO, è stata realizzata, seguendo la procedura descritta in lavori precedenti [35], [51].

A tale scopo, tramite l'utilizzo di una pressa idraulica, sono state preparate due pastiglie, una di farmaco e una di Ns-ZnO da 100 mg ciascuno. Le pastiglie sono state inserite all'interno di un cilindretto di vetro, dal diametro di 1 cm, creato appositamente dal gruppo di ricerca, e separate tra di loro da un filtro di carta, utile per evitare il loro contatto e permettere la loro separazione al termine del processo d'incorporazione. Agli estremi il cilindretto è stato chiuso con della lana di vetro, per rendere il sistema impaccato.

Tre cilindretti, sono stati inseriti all'interno di un vessel in acciaio, separati tra di loro da

lana di vetro. Il vessel, chiuso agli estremi, è stato introdotto in un forno operante a temperatura costante in cui è stata immessa la CO₂ liquida tramite pompa volumetrica. La temperatura del sistema è stata aumentata fino a 35°C, per l'incorporazione di ibuprofene, e a 75°C per la simvastatina. In seguito al riscaldamento, è stata pompata ulteriore CO₂ nel vessel per raggiungere valori di pressione pari a 100 bar e 300 bar, rispettivamente per ibuprofene e simvastatina. Le condizioni operative sono state definite al fine di non compromettere la stabilità dei farmaci e sono state mantenute grazie ad un regolatore di pressione. Il processo d'incorporazione è stato eseguito per 8 ore, durante le quali il farmaco si dissolve nel solvente supercritico e diffonde nel carrier. Al termine del tempo stabilito, l'apparato è stato riportato in condizioni di pressione atmosferica e temperatura ambiente e i cilindretti di vetro sono stati estratti dal vessel. Quindi si è operata la separazione fisica della pastiglia di materiale contenente il farmaco incorporato dalla pastiglia di farmaco libero, successivamente sottoposte alle analisi di caratterizzazione. Nel seguente lavoro di tesi è stata effettuata l'incorporazione di due differenti farmaci nello stesso carrier Ns-ZnO, ovvero ibuprofene e simvastatina. I materiali caricati con i farmaci, ottenuti dall'impregnazione in CO₂ supercritica, sono detti IBU@Ns-ZnO e SIM@Ns-ZnO. Essi sono stati sottoposti a diverse analisi di caratterizzazione.

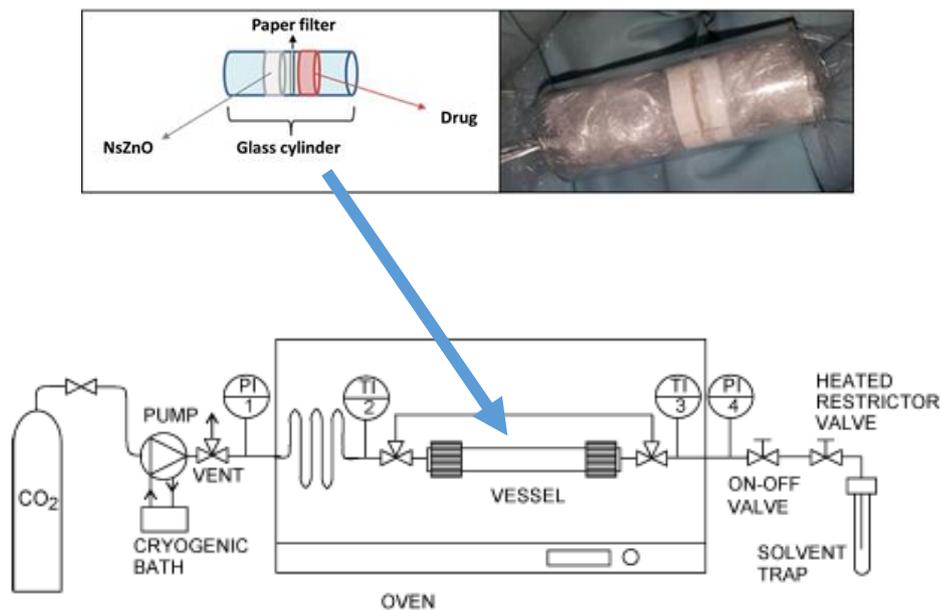


Figura 3.1 Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per l'incorporazione dei farmaci in Ns-ZnO [52] e [35].

3.3.1 Valutazione degli effetti del processo supercritico su Ns-ZnO

Per valutare gli effetti della CO₂ supercritica sull'ossido di zinco nano-strutturato, è stato realizzato un esperimento, simile a quello precedentemente descritto, con l'unica variante quella di inserire nel cilindretto solo tre pastiglie di Ns-ZnO, da 100 mg ciascuna, senza farmaco. Il reattore è stato mantenuto alle condizioni di 35 °C e 100 bar, per 8 ore. Al termine dell'esperimento, le pastiglie di solo materiale (Ns-ZnO_scCO₂) sono state estratte dal vessel e sottoposte a caratterizzazione con le seguenti tecniche: analisi di fisisorbimento di azoto, spettroscopia infrarossa e microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo.

Nella tabella 3.1, sotto rappresentata, sono riassunti i parametri fisici di pressione e di temperatura, adottati nei diversi processi d'incorporazione effettuati:

Tabella 3.1 Parametri fisici adottati nei processi supercritici

	Ibuprofene	Simvastatina	Ns-ZnO_scCO₂
Temperatura (°C)	35	75	35
Pressione (bar)	100	300	1100

3.4 Quantificazione del farmaco incorporato

Per la valutazione della percentuale di "Drug Loading", ovvero di farmaco effettivamente incorporato all'interno dell'ossido di zinco, è stata determinata la quantità di farmaco rilasciata da una quantità nota di materiale, contenente il farmaco incorporato, utilizzando la tecnica di estrazione con diversi solventi, all'interno di una nota quantità di solvente, in condizioni di agitazione magnetica a 350 rpm, al fine di favorire la fuoriuscita del farmaco dal carrier.

Per eseguire l'esperimento di estrazione, sono state svolte due prove sospendendo circa 0.050 g dei materiali impregnati (IBU@Ns-ZnO e SIM@Ns-ZnO) in 30 ml di etanolo e circa 0.050 g in 30 ml di PBS. L'uso dell'etanolo è stato necessario per garantire una completa fuoriuscita del farmaco dall'ossido di zinco (data l'elevata solubilità dell'ibuprofene in questo solvente, ovvero 60 mg/ml), mentre l'utilizzo del tampone fosfato 7.4 (PBS) ha permesso di simulare un fluido biologico.



Figura 3.2 Prova di quantificazione del farmaco incorporato

Dopo due ore il sistema è stato sottoposto a tre cicli di centrifugazione (ALC centrifuge PK110) a 4000 rpm per 30 minuti ciascuno, per separare l'ossido di zinco precipitato dal surnatante, ovvero dalla soluzione di farmaco. Quest'ultima è stata quindi analizzata con lo spettrofotometro DU 730 Life science UV/Vis, ottenendo un dato di assorbanza, convertito in concentrazione grazie alla retta di taratura del farmaco nel solvente, precedentemente creata.

Sono state costruite le rette di taratura di ibuprofene in etanolo e in PBS e della simvastatina solo in etanolo. Per le rette di taratura dell'ibuprofene è stata preparata una soluzione madre di partenza, sciogliendo 0,025 g di farmaco in 0,025 l di etanolo, quindi con una concentrazione di $1 \frac{mg}{ml}$. A partire da questa sono state realizzate le soluzioni figlie, in etanolo e PBS, con le dovute diluizioni, con concentrazioni pari a 500, 250, 100, 50, 25, $10 \frac{\mu g}{ml}$. La retta di taratura della simvastatina è stata costruita preparando una soluzione madre di concentrazione pari a $1 \frac{mg}{ml}$, disperdendo 0,025 g di simvastatina in 0,025 l di etanolo e, effettuando le diluizioni opportune, sono state preparate le soluzioni figlie di concentrazioni pari a 12.5, 10, 7.5, 5, 2.5, $1.5 \frac{\mu g}{ml}$. Tutte le soluzioni sono state analizzate allo spettrofotometro Uv-Vis per ricavare i corrispondenti valori di assorbanza ai valori di lunghezza d'onda di 264 nm per l'ibuprofene e a 238 nm per la simvastatina, essendo questi i loro rispettivi valori di picco di assorbimento.

3.5 Sistema di rilascio per l'ibuprofene

Dopo la determinazione del quantitativo di farmaco incorporato tramite il processo supercritico, il campione IBU@Ns-ZnO è stato sottoposto ad una prova di rilascio, utilizzando la cella di Franz. Contemporaneamente è stato simulato anche il rilascio di ibuprofene cristallino per evidenziarne le differenze, in termini di cinetica, rispetto al farmaco amorfo, contenuto nel carrier.

Molto utilizzate negli studi di permeazione cutanea, le celle di Franz sono composte da un comparto donatore superiore e uno ricevente inferiore, separati da una membrana in cellulosa, ovvero pelle sintetica. La sostanza da analizzare è inserita nel comparto donatore, disciolta in un solvente: in una cella è stato inserito IBU@Ns-ZnO (circa 50 mg) disciolto in 1 ml di tampone fosfato 7.4 (PBS), nell'altra la quantità di Ibuprofene cristallino equivalente a quella contenuta nel carrier in 1 ml di PBS. La camera ricevente, contenente tampone fosfato 7.4, è dotata di un tubo di campionamento che consente di effettuare dei prelievi. Sono stati effettuati prelievi in diversi intervalli di tempo: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 e 48 ore.

La fase ricevente è stata mantenuta in condizioni di agitazione magnetica a 400 rpm e di temperatura costante a 33 °C, per 48 ore, durante le quali tutta la soluzione ricevente è stata prelevata e sostituita con una fase ricevente nuova.

Tutti i campioni prelevati sono stati analizzati allo spettrofotometro Uv-Vis.

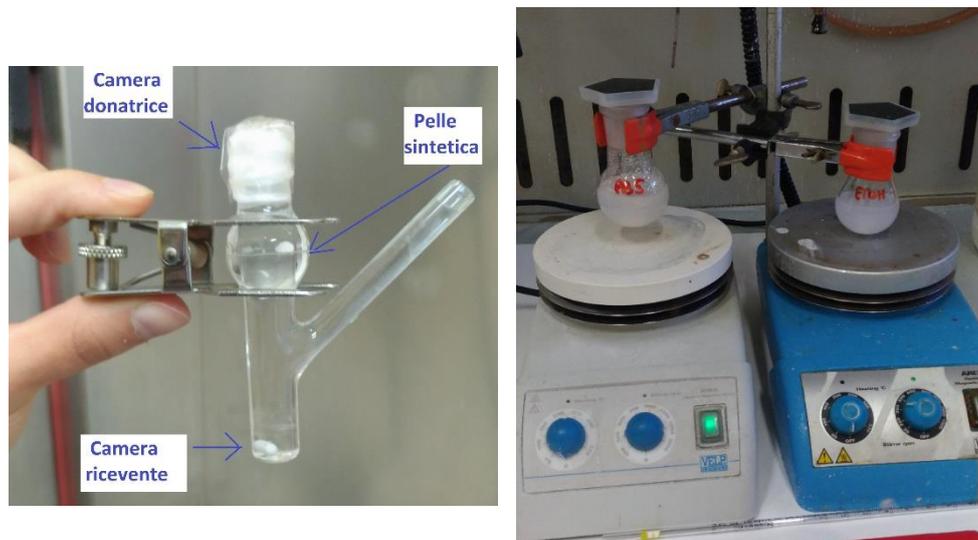


Figura 3.3 sistema di rilascio per l'ibuprofene con Celle di Franz

3.6 Metodi di caratterizzazione

L'ossido di zinco Ns-ZnO sintetizzato e i farmaci acquistati, ibuprofene e simvastatina, sono stati sottoposti ad analisi fisico-chimiche tramite delle tecniche di caratterizzazione quali diffrazione di raggi X (XRD), analisi di fisisorbimento di azoto, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM). Le medesime tecniche sono state utilizzate per caratterizzare i sistemi dopo il processo d'incorporazione in CO₂ supercritica.

3.6.1 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X (XRD) è una tecnica spettroscopica che permette di individuare la composizione chimica e l'aspetto cristallografico del materiale. L'analisi è stata realizzata utilizzando un diffrattometro PANalytical X'Pert (Cu K α radiation) e i dati sono stati raccolti in un range da 5° a 80° (2 θ), utilizzando una tensione di lavoro di 40kV e una corrente pari a 40 mA.

3.6.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

L'analisi di fisisorbimento di azoto è una tecnica di caratterizzazione che consente di valutare l'area superficiale del materiale, le sue caratteristiche geometriche e la distribuzione dei pori, tramite misure di pressione e volumi. Lo strumento, Quantachrome AUTOSORB-1 instrument, richiede una prima fase di trattamento termico di degassaggio che dura 2 ore a 150°C per il materiale senza farmaco e a 40°C per il materiale contenente il farmaco incorporato. Questa prima fase, che permette di ripulire la superficie del campione pesato, pari a 100 mg, dalle impurità fisisorbite, è seguita dall'analisi vera e propria che permette di ottenere i dati di interesse. L'area superficiale specifica è stata valutata utilizzando il modello BET in un range di pressione relativa pari a 0.04-0.1 e la distribuzione dei pori seguendo il metodo DFT (Density Functional Theory) e sfruttando il modello di equilibrio NLDFT (Non Linear Density Functional Theory) per pori cilindrici.

3.6.3 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) è un'analisi spettroscopica che dà informazioni relative ai gruppi funzionali, caratteristici del materiale studiato. Lo studio dei materiali, durante le varie fasi del lavoro, ha previsto l'uso dello spettrofotometro Bruker Equinox 55 e la realizzazione di pastiglie supportate con bromuro di potassio (KBr) in percentuale pari al 20% e 80% rispettivamente per il materiale senza farmaco e per quello contenente il farmaco. Dopo una prima fase di degas, della durata di un'ora, atta a ripulire la superficie da eventuali specie fisisorbite, lo strumento ha permesso la valutazione dello spettro tipico del materiale con lunghezze d'onda tra 600 e 4000 cm⁻¹.

3.6.4 Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo

La microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM) è una tecnica che permette l'osservazione dei campioni con ingrandimenti e risoluzioni superiori rispetto alla microscopia ottica ordinaria. Lo strumento utilizzato, FESEM ZEISS MERLIN, ha permesso di ottenere importanti informazioni sulla morfologia, cristallografia e composizione dei materiali.

CAPITOLO 4

Risultati

Nel seguente capitolo sono riportati i risultati ottenuti dalle diverse fasi caratterizzanti il lavoro di tesi.

4.1 Caratterizzazione di Ns-ZnO

4.1.1 Analisi di fisisorbimento di azoto

Nelle figure 4.1 e 4.2, riportate di seguito, vengono rappresentati i risultati dell'analisi di fisisorbimento di azoto a 77K per l'ossido di zinco sintetizzato Ns-ZnO, ovvero l'isoterma di adsorbimento/desorbimento di azoto e la distribuzione dei pori:

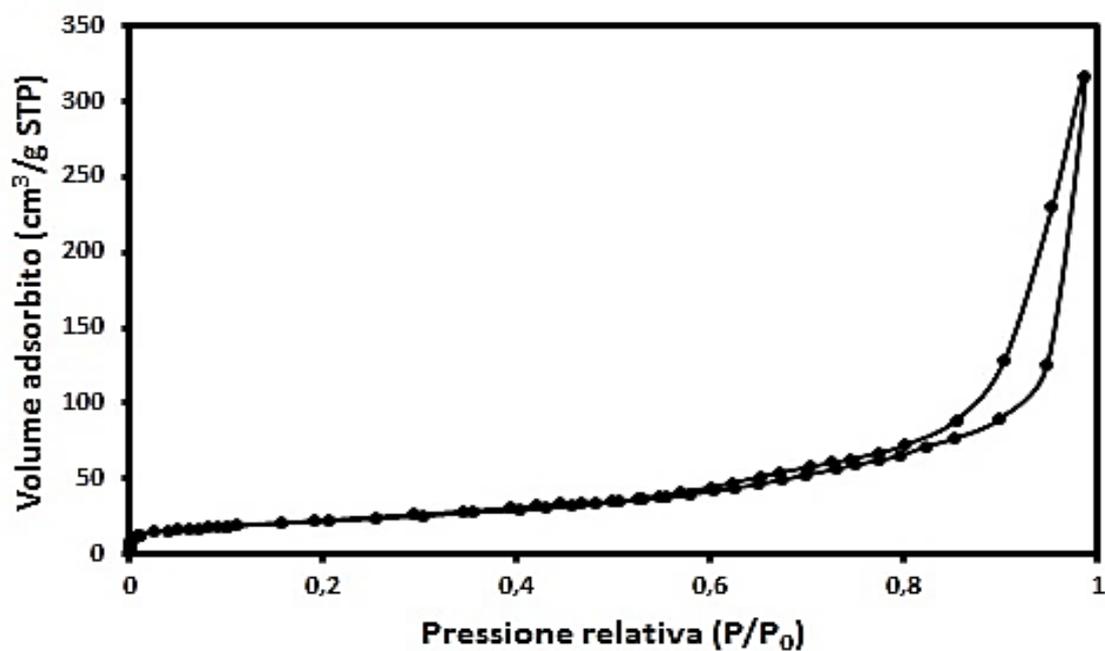


Figura 4.1 Isoterma di adsorbimento/desorbimento dell'ossido di zinco Ns-ZnO

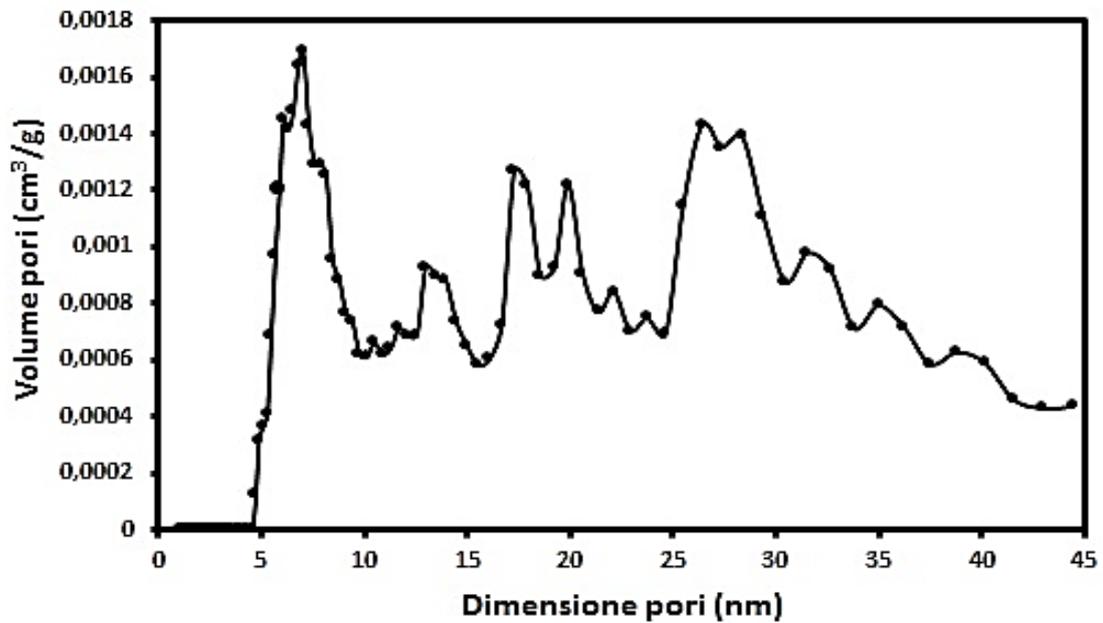


Figura 4.2 Distribuzione della dimensione dei pori di Ns-ZnO

L'isoterma di adsorbimento, ottenuta dall'analisi, è classificabile come Isoterma di tipo II. Il cappio d'isteresi nel tratto finale (figura 4.1) è dovuto a porosità interparticellare. Le porosità sono altamente eterogenee, come evidenziato dalla distribuzione dei pori (figura 4.2).

L'andamento relativo alla distribuzione dei pori è multimodale e sottolinea la struttura disordinata dei pori che costituiscono il materiale.

Il valore di area superficiale specifica (SSA) e volume medio dei pori (V_p) di Ns-ZnO sono riportati nella tabella 4.1:

Tabella 4.1 Valori di area superficiale e volume medio dei pori dell'ossido di zinco Ns-ZnO

Campione	SSA ($\frac{m^2}{g}$)	V_p ($\frac{cm^3}{g}$)
Ns-ZnO	78	0.33

Il valore di area superficiale ottenuto, pari a $78 \frac{m^2}{g}$, risulta essere maggiore di quello ottenuto in un lavoro precedente [52]. In questo lavoro di tesi, infatti, la fase finale di calcinazione del precursore, per ottenere Ns-ZnO, non è stata realizzata in una muffola ma in un forno tubolare con la possibilità d'impostare una certa rampa di temperatura prima di raggiungere il valore di $300^\circ C$, a cui il materiale è stato mantenuto per 45 minuti.

4.1.2 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Nella figura 4.3 sottostante viene riportato lo spettro FT-IR del carrier sintetizzato Ns-ZnO:

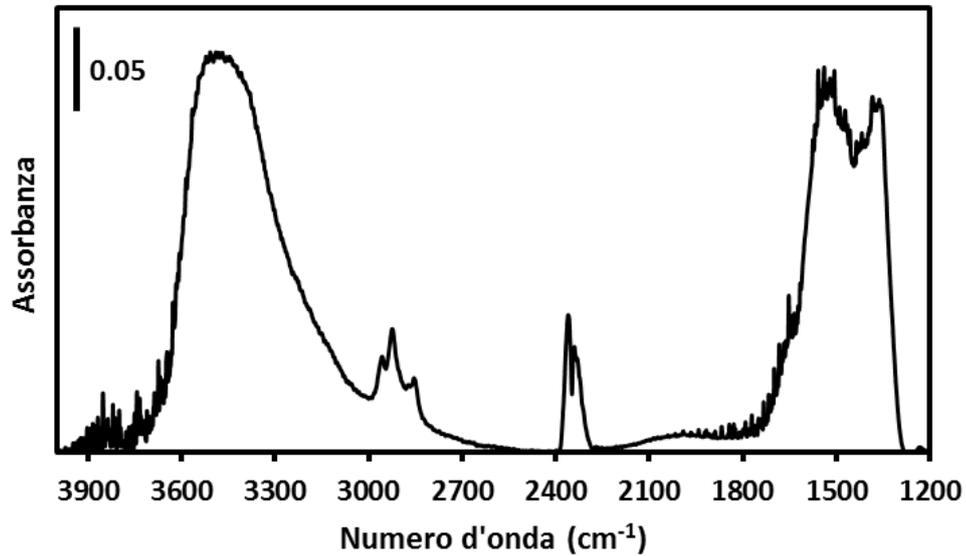


Figura 4.3 Spettro FT-IR dell'ossido di zinco Ns-ZnO

Analizzando lo spettro ottenuto, si osserva che il picco presente per valori di lunghezza d'onda intorno a 3400 cm^{-1} è dovuto alle vibrazioni di stretching degli ossidrili superficiali e all'acqua adsorbita superficialmente. Tra 1290 cm^{-1} e 1725 cm^{-1} le bande presenti sono legate alle vibrazioni di stretching dei carbonati superficiali, dato il chemisorbimento di CO_2 sulla superficie del materiale. Per valori di numero d'onda compreso tra 2800 cm^{-1} e 2990 cm^{-1} le bande presenti sono legate alle impurezze d'idrocarburi, probabilmente dovute alla fase di preparazione del campione.

4.1.3 Diffrazione a raggi X

L'analisi XRD per Ns-ZnO ha portato all'ottenimento dello spettro rappresentato nella figura 4.4 seguente:

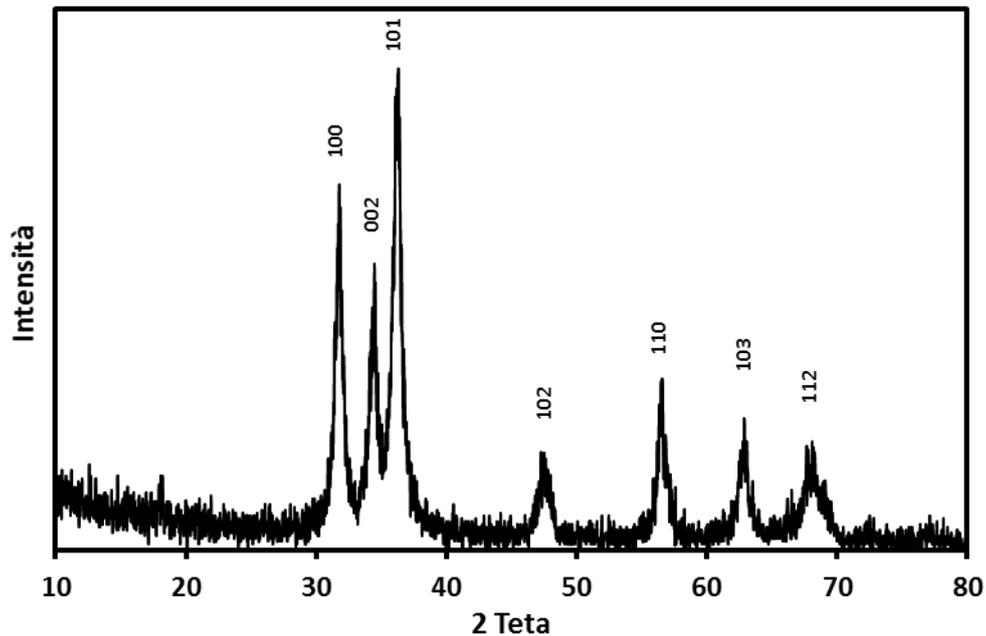


Figura 4.4 Spettro XRD di Ns-ZnO

I risultati ottenuti confermano la natura cristallina e wurtzite del materiale. Nello spettro sono stati evidenziati i picchi ottenuti per valori di 2θ pari a 31.77° , 34.48° , 36.32° , 47.50° , 56.56° , 62.87° e 67.67° , corrispondenti ai riflessi (100), (002), (101), (102), (110), (103) e (112). Quanto ottenuto è conforme ai dati presenti in letteratura [50] e riproduce il pattern cristallino dell'ossido di zinco nanostrutturato puro.

4.1.4 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo

Le analisi FESEM, fatte sul campione, mostrano che Ns-ZnO è organizzato in nano-fogli, con spessore medio di 38 nm, fatti da particelle ovoidali assemblate.

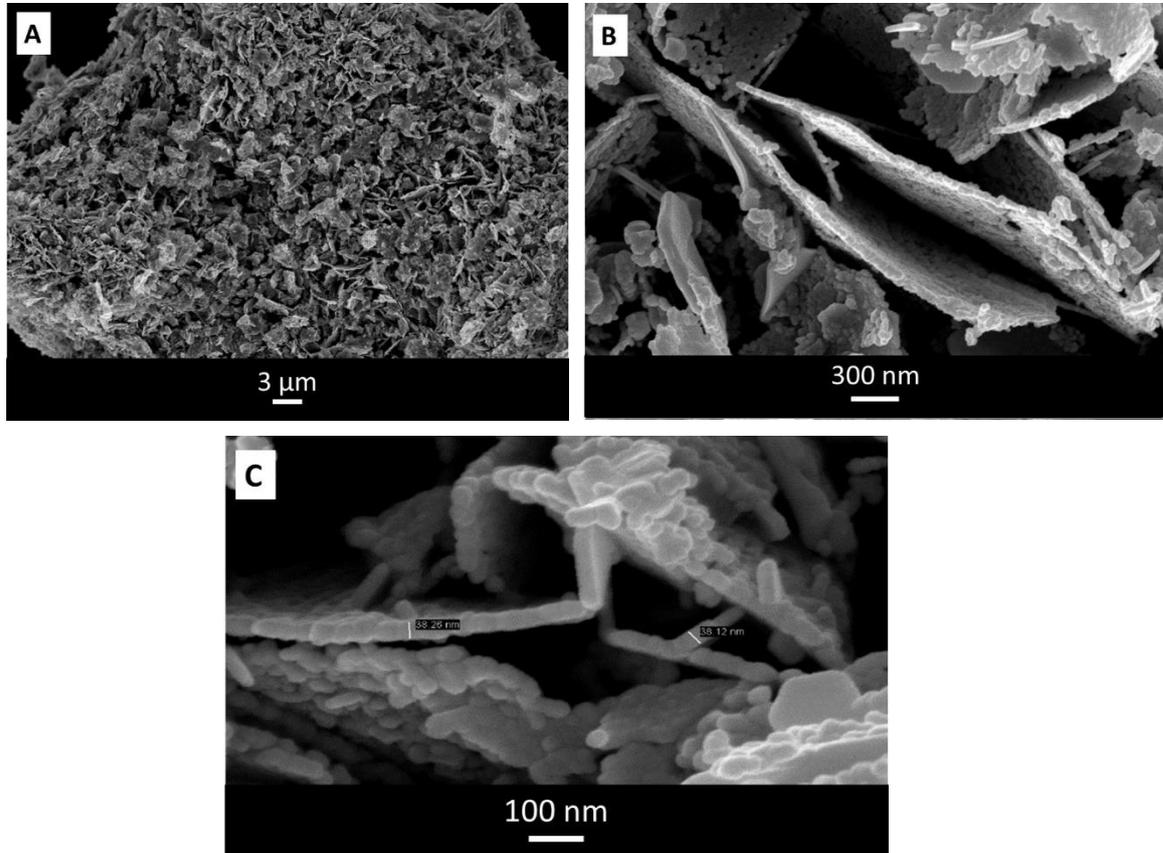


Figura 4.5 Immagini FESEM del campione Ns-ZnO a diversi ingrandimenti: A)10 kX B) 100 kX C) 300 kX

4.2 Caratterizzazione dell'ibuprofene

4.2.1 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

La figura 4.6 seguente mostra lo spettro FT-IR del farmaco supportato con il 90% di KBr:

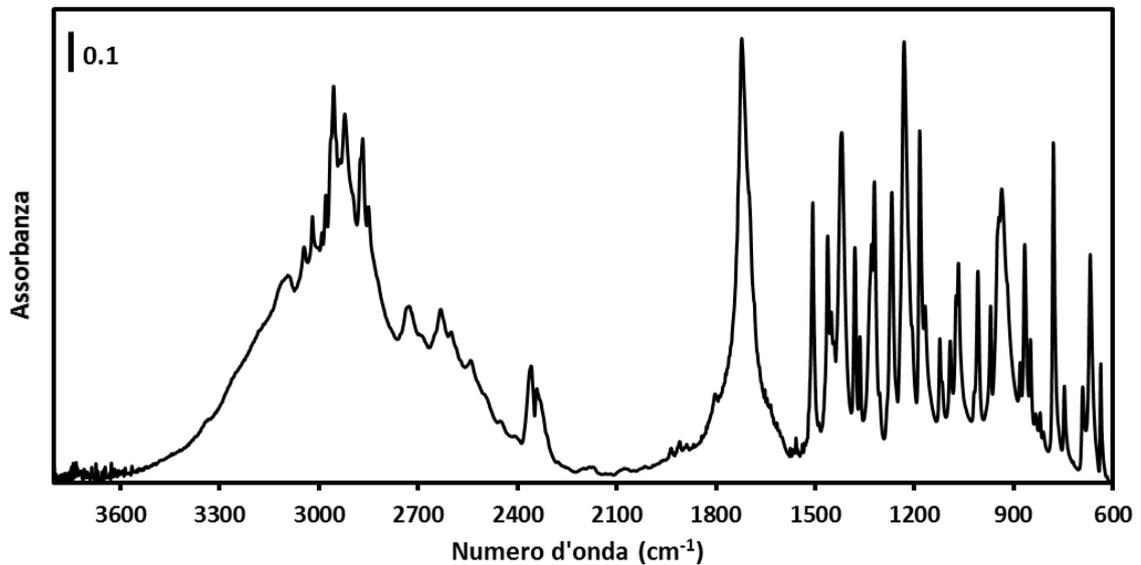


Figura 4.6 Spettro FT-IR dell'ibuprofene

La banda ottenuta per valori di numero d'onda compresi tra 2840 cm^{-1} e 2970 cm^{-1} è legata alle vibrazioni di stretching dei gruppi CH. Sotto questa banda, tra 2300 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} , è presente un'ampia banda dovuta al gruppo ossidrilico O-H, impegnato con il legame idrogeno. Il picco a 1720 cm^{-1} è legato alle vibrazioni di stretching del gruppo carbonilico.

Di seguito viene ricordata la struttura chimica dell'ibuprofene:

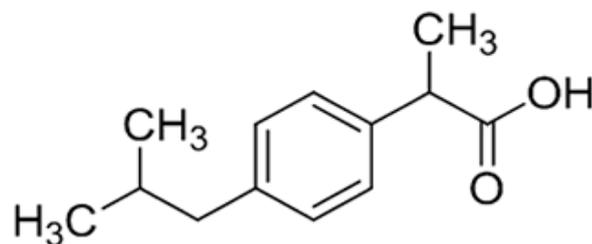


Figura 4.7 Struttura chimica dell'ibuprofene ((2RS)-1[4-(2-methyl propyl) phenyl] propionic acid).
Formula molecolare: $C_{13}H_{18}O_2$; Peso molecolare: 206.131 g/mol [42].

Quanto ottenuto dall'attività sperimentale riproduce i risultati presenti in letteratura [53]. Altri studi, effettuati dai ricercatori, hanno evidenziato la posizione del gruppo carbonilico dell'ibuprofene a valori di numero d'onda pari a 1710 cm^{-1} [54] o 1738 cm^{-1} [55], questo è

legato alla variabilità del gruppo carbonilico dell'ibuprofene, coinvolto nel legame idrogeno.

4.2.2 Diffrazione a raggi X

L'analisi XRD, a cui è stato sottoposto il farmaco commerciale, ha confermato i risultati presenti in letteratura [56]. Dalla figura 4.8 sono ben evidenti i picchi caratteristici della struttura cristallina, tipici dei piani cristallografici dell'ibuprofene, sottolineandone la natura cristallina del farmaco.

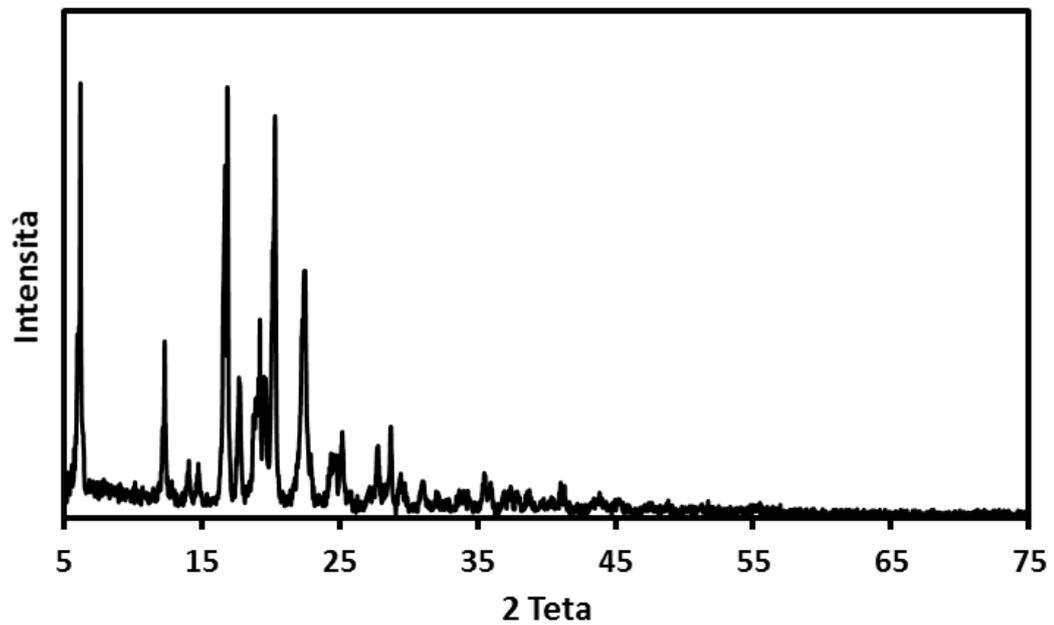


Figura 4.8 Spettro XRD del farmaco ibuprofene

4.3 Caratterizzazione della Simvastatina

4.3.1 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Di seguito viene riportato lo spettro FT-IR ottenuto dall'analisi del farmaco Simvastatina supportata con 80% di KBr:

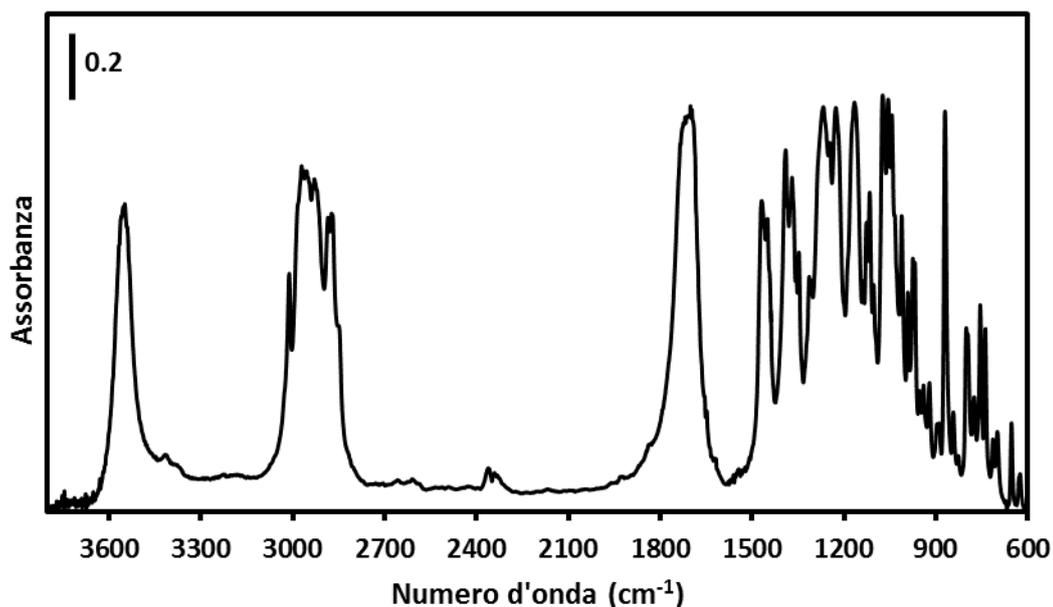


Figura 4.9 Spettro FT-IR del farmaco Simvastatina

Lo spettro FT-IR relativo alla Simvastatina è caratterizzato da un picco a 1690 cm^{-1} tipico dei gruppi carbonilici, da una banda, per valori di numero d'onda tra 2800 cm^{-1} e 3050 cm^{-1} , che è dovuta alle vibrazioni di stretching dei gruppi CH ed infine dal picco definito a 3500 cm^{-1} che è caratteristico dei gruppi ossidrilici OH.

Di seguito viene ricordata la struttura chimica della simvastatina:

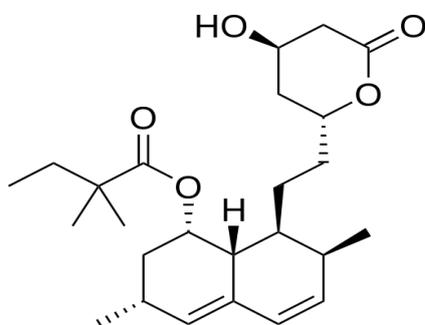


Figura 4.10 Struttura chimica della simvastatina (2,2-dimetilbutanoato di (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{[(2R,4R)-4-idrossi-6-oxotetraidro-2H-piran-2-il]etil}-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-esaidronaftalen-1-ile). Formula molecolare: $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5$; Peso molecolare: 418.566 g/mol [48].

Quanto ottenuto dall'attività sperimentale riproduce i risultati presenti in letteratura [47].

4.3.2 Diffrazione a raggi X

I risultati ottenuti dall'analisi XRD fatta sulla Simvastatina hanno permesso di ottenere uno spettro in cui la forma e l'intensità dei picchi caratteristici, tipici del farmaco, hanno evidenziato la sua natura cristallina. Quanto detto è facilmente osservabile dal grafico seguente:

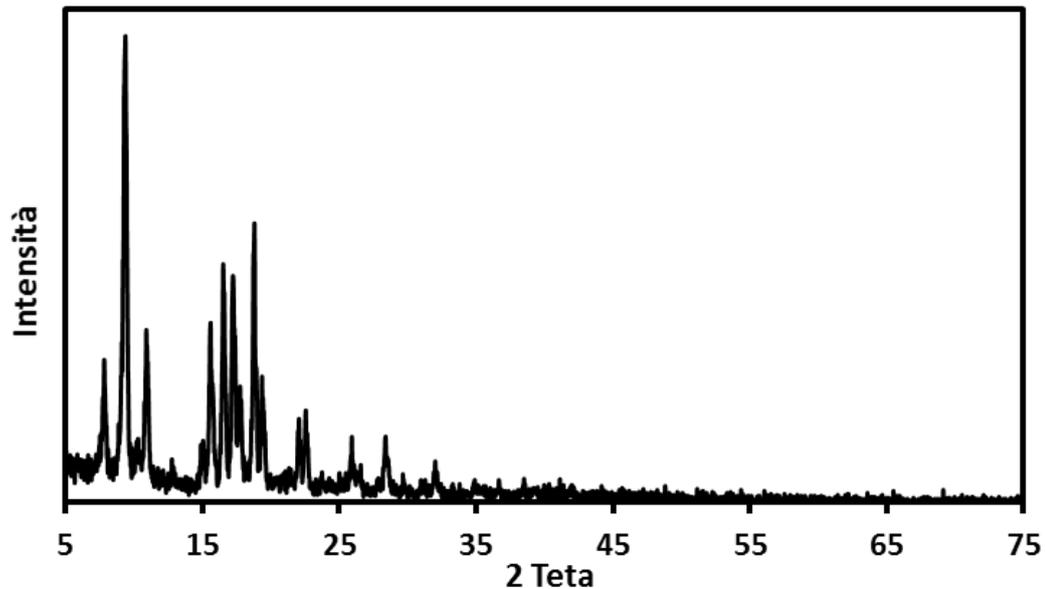


Figura 4.11 Spettro XRD del farmaco Simvastatina

Lo spettro XRD ottenuto è in linea con i dati presenti in letteratura [57].

4.4 Caratterizzazione di IBU@Ns-ZnO

Dopo la prova d'incorporazione in CO₂ supercritica dell'ibuprofene nell'ossido di zinco, il campione IBU@Ns-ZnO è stato caratterizzato con le tecniche di caratterizzazione descritte nel capitolo precedente e i cui risultati sono di seguito riportati.

4.4.1 Analisi di fisisorbimento di azoto

Dall'analisi di fisisorbimento di azoto fatta su IBU@Ns-ZnO è stato possibile costruire l'isoterma di adsorbimento e la curva di distribuzione dei pori, che vengono di seguito rappresentati in confronto con quanto già riportato per il campione Ns-ZnO sintetizzato, (senza farmaco):

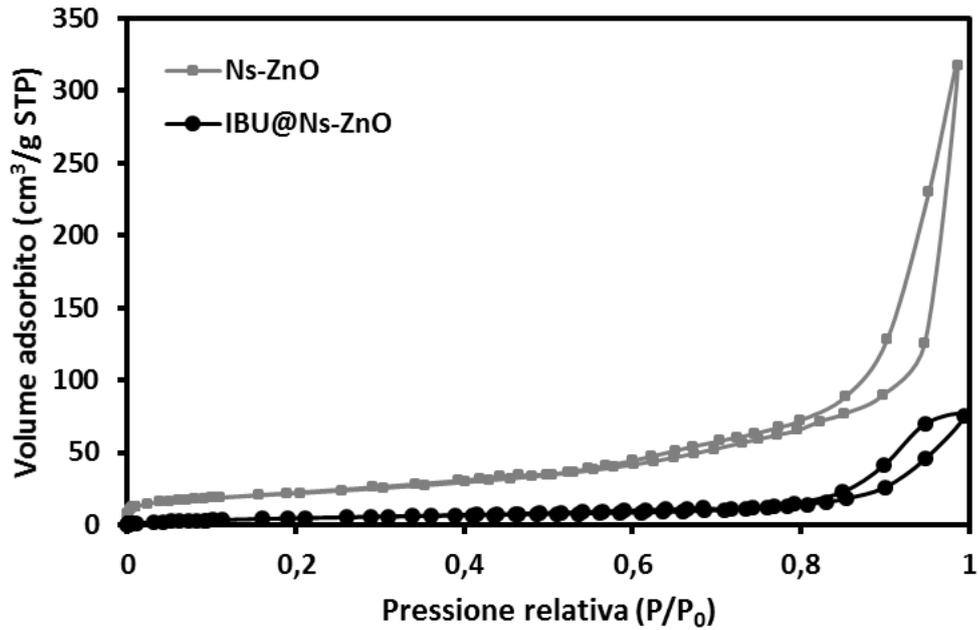


Figura 4.12 Isotherma di adsorbimento/desorbimento di IBU@Ns-ZnO e Ns-ZnO

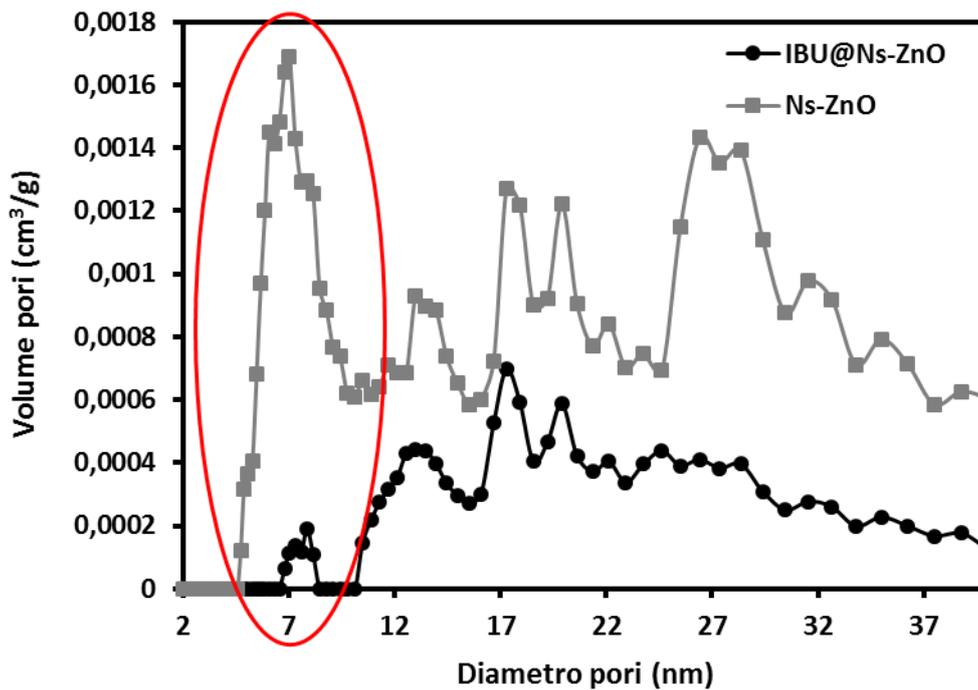


Figura 4.13 Distribuzione della dimensione dei pori di IBU@Ns-ZnO e Ns-ZnO

Nella tabella 4.2 vengono riportati i valori di area superficiale specifica (SSA), volume medio dei pori (V_p) e diametro medio dei pori (D_p) ottenuti dopo l'analisi di fisisorbimento di azoto fatta su IBU@Ns-ZnO e confrontati con i dati, già analizzati, del campione Ns-ZnO:

Tabella 4.2 Valori di area superficiale e volume dei pori di IBU@Ns-ZnO e Ns-ZnO

Campione	SSA ($\frac{m^2}{g}$)	Vp ($\frac{cm^3}{g}$)
IBU@Ns-ZnO	20	0.1
Ns-ZnO	78	0.33

Confrontando i valori di area superficiale e proprietà geometriche dei pori del materiale, prima e dopo incorporazione del farmaco, è possibile valutare la marcata riduzione di area superficiale da $78 \frac{m^2}{g}$ a $19.7 \frac{m^2}{g}$ e del volume dei pori da $0.33 \frac{cm^3}{g}$ a $0.1 \frac{cm^3}{g}$. Questi risultati confermano che il farmaco si è distribuito sulla superficie disponibile del materiale e all'interno del volume poroso. In particolare, il confronto delle distribuzioni delle dimensioni dei pori suggerisce che il farmaco abbia occupato preferibilmente la famiglia di pori più piccoli, con dimensioni intorno a 7 nm (evidenziata dal cerchio rosso nella figura 4.13).

4.4.2 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Nella figura 4.14 viene riportato lo spettro FT-IR di IBU@Ns-ZnO, confrontato con lo spettro dell'ossido sintetizzato Ns-ZnO, Ns-ZnO_scCO2 e dell'ibuprofene cristallino:

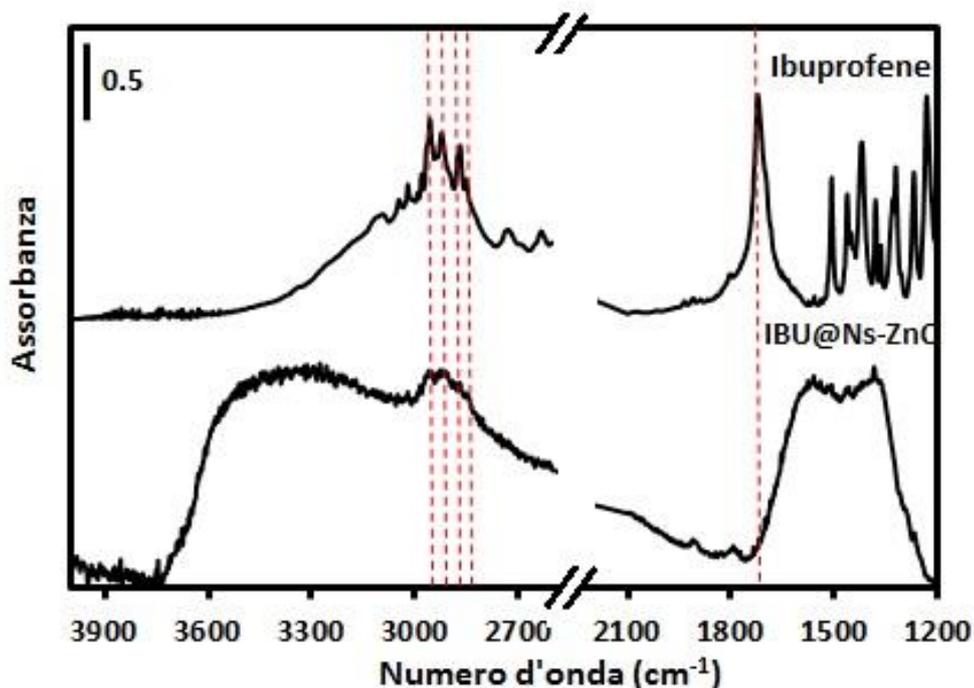


Figura 4.14 Confronto spettri FT-IR di IBU@Ns-ZnO e ibuprofene

L'obiettivo di questa analisi è stata valutare la presenza, nello spettro di IBU@Ns-ZnO, dei picchi caratteristici dell'ibuprofene in seguito ad incorporazione mediata da CO₂ supercritica. La presenza del farmaco, nello spettro del campione IBU@Ns-ZnO, è confermata dalla presenza dei modi, seppur deboli, dei gruppi CH tra 2840 cm⁻¹ e 2970 cm⁻¹ dell'ibuprofene.

Lo spettro di IBU@Ns-ZnO, a 1700 cm⁻¹, non mostra la banda tipica del gruppo carbonilico dell'ibuprofene. La frequenza di stretching del gruppo carbonilico del farmaco subisce uno shift verso il basso, in quanto perturbato da un'interazione acido-base di Lewis molto forte. Infatti, oltre che come accettore, il gruppo carbonilico dell'ibuprofene può essere coinvolto in un'interazione acido-base di Lewis con gli ioni Zn²⁺ del carrier che fungono da siti acidi. La prevalenza di questa interazione sulla formazione del legame idrogeno tra il gruppo carbonilico del farmaco e quello ossidrilico del carrier, perturba lo spettro e non mostra in IBU@Ns-ZnO il picco tipico del farmaco a 1700 cm⁻¹.

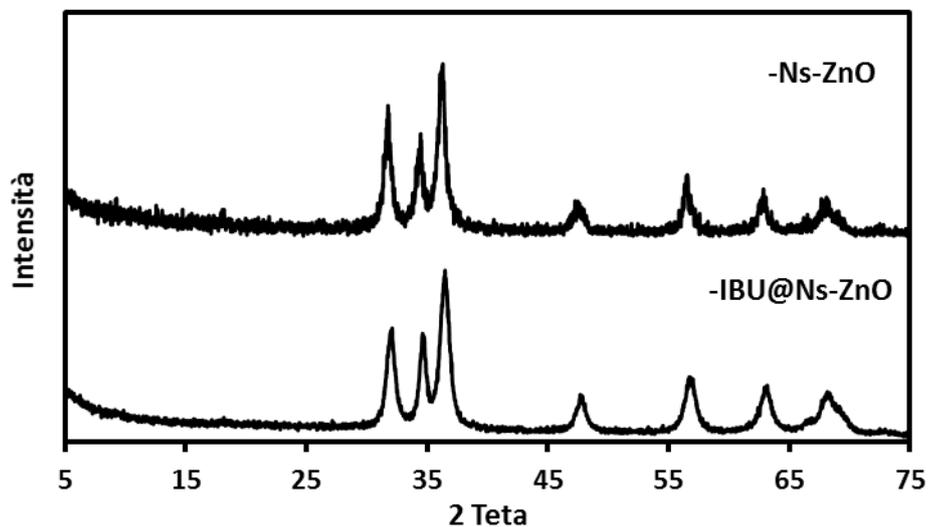


Figura 4.15 Spettri XRD di IBU@Ns-ZnO e Ns-ZnO

Lo spettro di IBU@Ns-ZnO, ottenuto, conferma lo spettro tipico del materiale sintetizzato, indice della mancata comparsa di nuove fasi cristalline. Questo aspetto, insieme alla valutazione dei risultati ottenuti dalla spettroscopia infrarossa, che hanno confermato la presenza di Ibuprofene nel carrier, ci permette di concludere che il farmaco incorporato in Ns-ZnO si trova allo stato amorfo.

4.4.2.1 Valutazione degli effetti del processo supercritico su Ns-ZnO

Nella figura 4.16, riportata di seguito, è stato raffigurato lo spettro XRD di Ns-ZnO_scCO₂, confrontato con quello di Ns-ZnO, per valutare l'effetto del processo mediato da CO₂ supercritica su una possibile carbonatazione sul materiale. Quello che è subito evidente è il cambiamento della natura del carbonato, che esibisce una grande reattività e tende alla

formazione di un'unica banda, come spesso succede nel caso di formazione di carbonati di bulk.

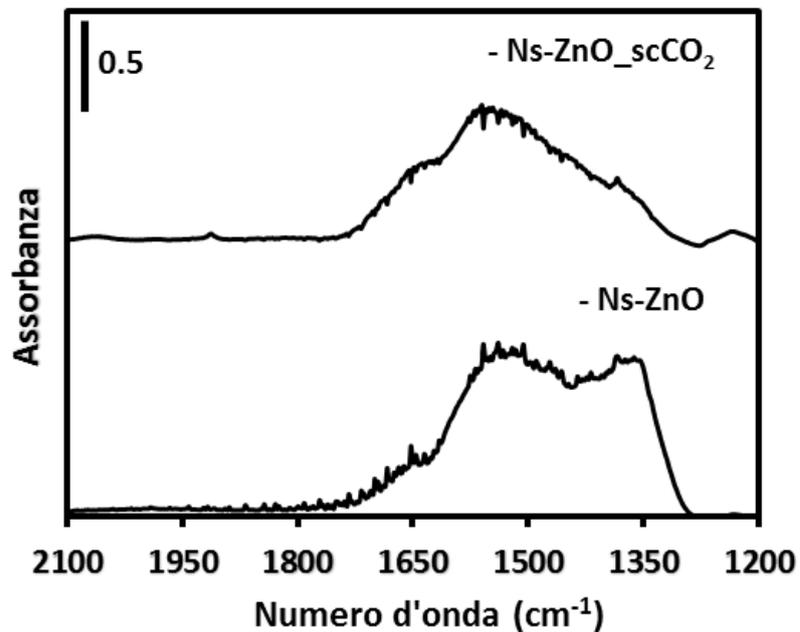


Figura 4.16 Spettri FT-IR di Ns-ZnO e Ns-ZnO_scCO₂

Il cambio di forma della banda dei carbonati, subita da Ns-ZnO dopo processo scCO₂, non era stata evidenziata nell'analisi FT-IR di IBU@Ns-ZnO nella figura 4.14. Questa osservazione evidenzia come il farmaco esibisce un'azione protettiva verso un'eventuale carbonatazione del carrier Ns-ZnO, durante il processo supercritico.

Per avere conferma dell'avvenuta formazione di carbonati di bulk, ovvero della conversione di Ns-ZnO in carbonato di zinco in seguito al processo scCO₂, è stato necessario eseguire l'analisi XRD anche su Ns-ZnO_scCO₂, i cui risultati sono riportati nella figura 4.17, insieme a quelli di Ns-ZnO:

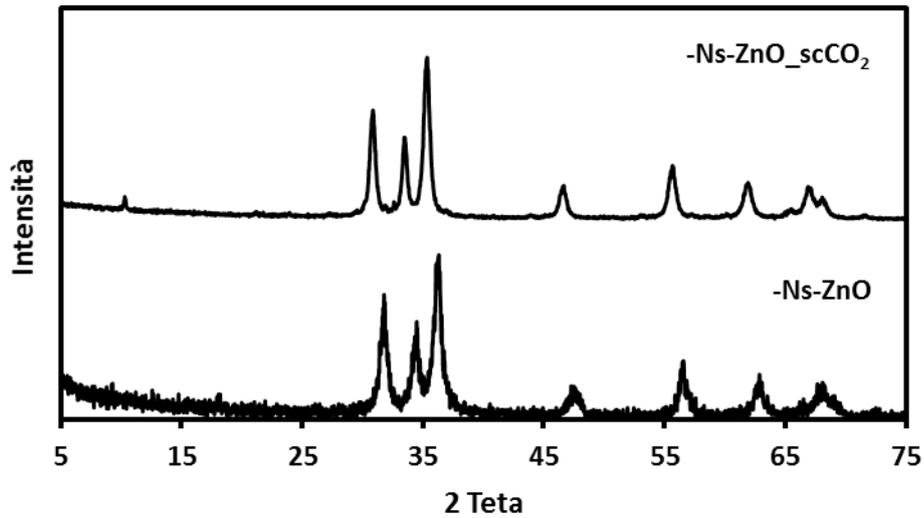


Figura 4.17 Spettri XRD di Ns-ZnO e Ns-ZnO_scCO₂

Lo spettro XRD di Ns-ZnO_scCO₂, ottenuto, nega la formazione di carbonati di bulk in quanto ripropone le stesse fasi cristalline di Ns-ZnO. Quindi è possibile avanzare l'ipotesi che Ns-ZnO, dopo processo supercritico, si converte in una fase amorfa, o che i carbonati presenti siano solo superficiali e non di bulk.

4.4.4 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo

Le immagini FESEM relative al materiale IBU@Ns-ZnO mostrano un marcato mutamento della morfologia del materiale che, in seguito all'incorporazione del farmaco, si riorganizza come a formare una maglia fitta, perdendo così la peculiare struttura in nano-fogli. Di seguito sono riportati alcuni degli ingrandimenti del sistema studiato:

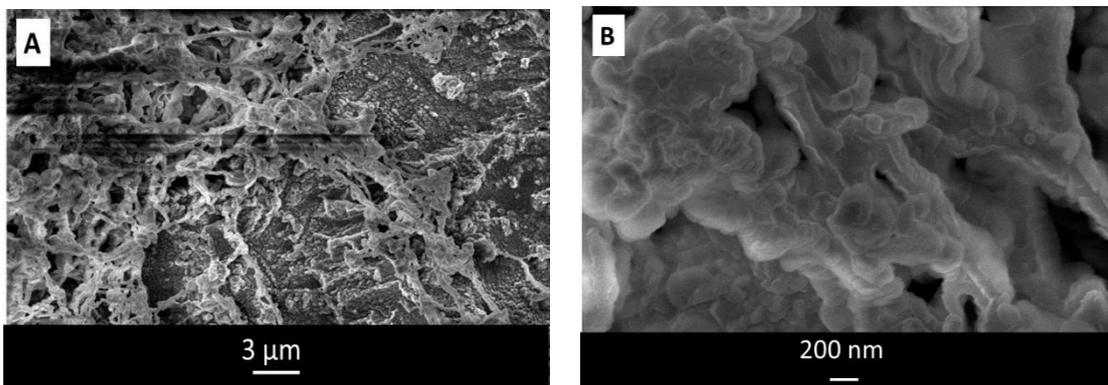


Figura 4.18 Immagini FESEM di IBU@Ns-ZnO a diversi ingrandimenti: A) 10 kX e B) 100 kX

4.4.5 Quantificazione del farmaco incorporato

Nel capitolo precedente è stato descritto il metodo adottato per la valutazione quantitativa dell'ibuprofene incorporato all'interno dell'ossido di zinco nanostrutturato. Il primo *step* ha previsto la realizzazione della retta di taratura del farmaco nei due solventi in cui la polvere di IBU@Ns-ZnO è stata dispersa, ovvero etanolo e tampone fosfato 7.4 (PBS). La tabella 4.4 riporta le caratteristiche delle soluzioni preparate a partire dalla soluzione madre di ibuprofene in etanolo e PBS, in termini di concentrazione e assorbanza valutata allo spettrofotometro Uv-Vis.

Tabella 4.4 Costruzione delle rette di taratura dell'ibuprofene in etanolo e PBS

Campione	Concentrazione (µg/ml)	Assorbanza (Soluzioni figlie in etanolo)	Assorbanza (Soluzioni figlie in PBS)
1	500	0.687	0.878
2	250	0.368	0.450
3	100	0.155	0.191
4	50	0.080	0.105
5	25	-	0.083
6	10	-	0.033
7	0	0	0

Di seguito, nelle figure 4.19 e 4.20, si riportano le due rette di taratura dell'ibuprofene, ottenute mettendo in relazione i valori di assorbanza in funzione della concentrazione:

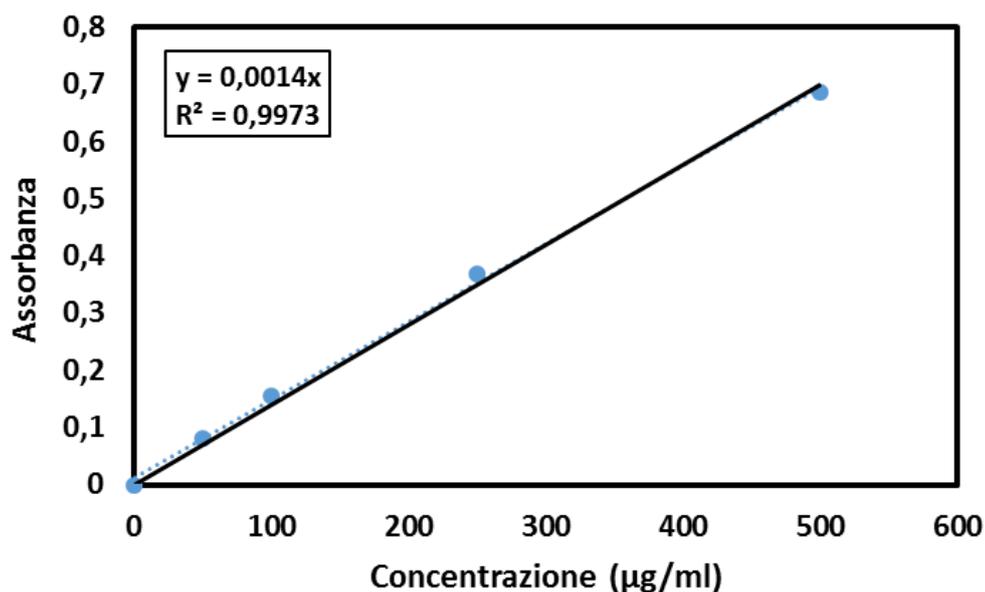


Figura 4.19 Retta di taratura dell'ibuprofene in etanolo

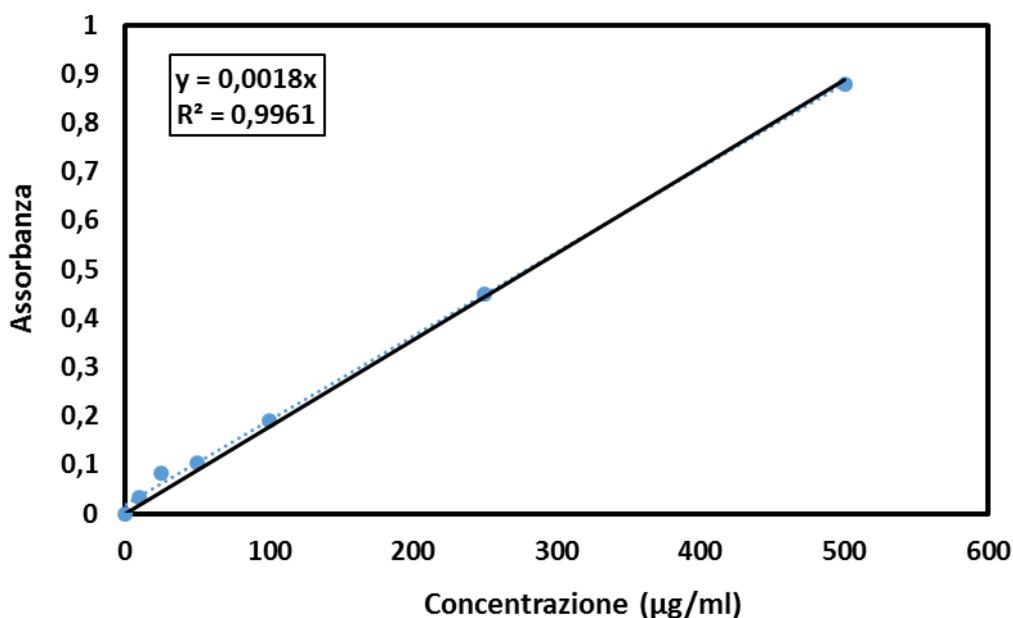


Figura 4.20 Retta di taratura dell'ibuprofene in PBS

Dopo la fase di rilascio del campione IBU@Ns-ZnO in etanolo e PBS, i sistemi sono stati sottoposti a più fasi di centrifugazione e i surnatanti, contenenti il farmaco, sono stati analizzati allo spettrofotometro Uv-Vis, ottenendo i valori di assorbanza e quindi di concentrazione, tramite le rette di taratura. Si è poi valutata la percentuale di Drug Loading utilizzando la seguente equazione (Eq.1):

Equazione 1:

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{\text{Peso del farmaco incorporato}}{\text{Peso del materiale IBU@Ns-ZnO}} * 100$$

Di seguito, nella tabella 4.5, sono riportati i risultati d'interesse:

Tabella 4.5 Massa di ibuprofene incorporato nel carrier e valutazione del Drug Loading

Soluzione di ibuprofene	Concentrazione (µg/ml)	Massa di ibuprofene (mg)	Drug Loading (%)
In etanolo	294.57	8.84	16
In PBS	205.56	6.17	11

Come già osservato, nella figura 4.15 relativa allo spettro XRD di IBU@Ns-ZnO, non sono presenti le fasi cristalline tipiche dell'ibuprofene, quindi l'ibuprofene che è stato incorporato in Ns-ZnO si trova allo stato amorfo [40].

4.4.7 Valutazioni finali

4.4.7.1 Determinazione del numero di molecole per nm² e del numero di molecole per nm³

Nota la percentuale di farmaco incorporata in Ns-ZnO, è stato eseguito il calcolo delle molecole di farmaco occupanti 1 nm² e 1 nm³. Per fare ciò è stata fissata una base di calcolo di 1 g di materiale, contenente quindi, in base ai risultati sopra ottenuti (riportare il numero della tabella), 0.16 g di Ibuprofene e 0.84 g di Ns-ZnO. Noto il peso molecolare del farmaco e considerando i valori di area superficiale specifica e volume medio dei pori del carrier sintetizzato, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Tabella 4.6 Determinazione del numero di molecole di Ibuprofene per nm² e nm³

Campione	Molecole per nm ²	Molecole per nm ³
Ibuprofene	7	2

4.4.7.2 Descrizione dell'organizzazione del farmaco nel carrier

Il sistema IBU@Ns-ZnO è stato sottoposto ad una valutazione finale, atta ad indagare e descrivere la modalità di distribuzione del farmaco all'interno del volume del carrier.

In primo luogo è stata valutata l'area occupata da una molecola d'ibuprofene. Dalla letteratura [58] sono note le dimensioni caratteristiche della molecola:

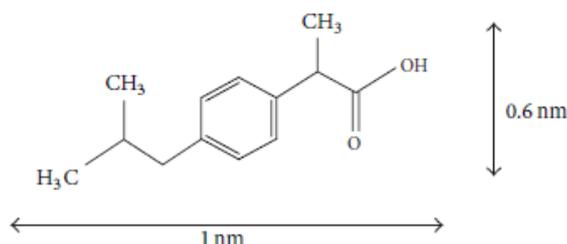


Figura 4.21 Molecola di Ibuprofene [58]

Con l'ipotesi di struttura ellittica, è stato effettuato il calcolo dell'area (A) occupata dalla molecola di farmaco pari a 0.47 nm².

Il risultato ottenuto rivela che 1 nm² di superficie di carrier può ospitare al massimo 2 molecole di farmaco. Il calcolo del numero di molecole per nm², fatto in precedenza, aveva però restituito, per l'ibuprofene, un valore di 7 molecole per nm², quindi posso dedurre che le 7 molecole di ibuprofene si organizzano portando alla formazione di un multilayer, in particolare di 3-4 strati.

La formazione di un multilayer prevede l'occupazione di un certo volume dei pori del carrier. Dai dati ottenuti nella fase di quantificazione del farmaco, riportati nella tabella 4.5, consideriamo la % Drug Loading, pari al 16% e quindi, sulla base di 1 g di IBU@Ns-ZnO, possiamo riferirci a 0.16 g di IBU e 0.84 g di Ns-ZnO. Nota la densità dell'IBU cristallino, pari a $1.03 \frac{g}{cm^3}$, valutiamo il volume occupato da 0.16 g di farmaco incorporato nel carrier pari a 0.16 cm³. Questo valore viene confrontato con il volume del carrier disponibile per l'adsorbimento del farmaco. Dall'analisi di fisisorbimento di azoto è noto il volume medio

dei pori di Ns-ZnO pari a $0.33 \frac{g}{cm^3}$, tabella 4.1. Questo valore si riferisce al volume di 1 g di carrier, mentre se consideriamo 0.84 g, come detto sopra, il volume di carrier disponibile sarà 0.28 cm^3 . Riassunto:

Tabella 4.7 Valutazioni volumi d'interesse

Volume di IBU in Ns-ZnO (cm³)	Volume di Ns-ZnO disponibile (cm³)
0.16	0.28

Si può concludere dicendo che il quantitativo di farmaco incorporato è minore del volume a disposizione, quindi, sebbene il farmaco sia organizzato in multistrato sul carrier, il parametro che più influenza il processo d'incorporazione di IBU in Ns-ZnO è la superficie, non il volume.

Il calcolo effettuato ci porta a dire che il farmaco ha occupato 0.16 cm^3 all'interno di 0.84 g di Ns-ZnO (ovvero 1 g di IBU@Ns-ZnO). Dunque il volume residuo di Ns-ZnO pari a 0.12 cm^3 ($0.28-0.16$) è in ottimo accordo con il dato sperimentale ottenuto dall'analisi di fisisorbimento di azoto, pari a 0.10 cm^3 , riportato nella tabella 4.2.

4.4.6 Sistema di rilascio per l'ibuprofene

La prova di rilascio, fatta tramite cella di Franz sul materiale IBU@Ns-ZnO, è stata confrontata con la medesima prova realizzata sull'ibuprofene cristallino. L'intento è valutare le differenze, in termini di cinetica, tra i due sistemi studiati, uno contenente il campione IBU@Ns-ZnO in cui il farmaco è presente in fase amorfa e l'altro contenente la quantità di Ibuprofene cristallino equivalente a quella contenuta nel carrier.

La tabella 4.8 riporta i valori di concentrazione calcolati tramite la retta di taratura dell'ibuprofene in PBS, la quantità cumulativa rilasciata in ogni tempo specifico e la percentuale di farmaco rilasciato:

Tabella 4.8 Prova di rilascio di IBU@Ns-ZnO in PBS

TEMPO (h)	CONCENTRAZIONE (µg/ml)	MASSA FARMACO (mg)	PERCENTUALE (%)
0	0	0	0
0.5	51.67	0.21	2.34
1	260.56	1.25	14.13
2	285.00	2.39	27.02
3	175.56	3.09	34.97
4	226.67	4.00	45.22
5	286.11	5.14	58.17
6	316.67	6.41	72.50
7	322.22	7.70	87.08
8	491.11	9.66	109.30
24	65.56	9.92	112.27
48	180.56	10.65	120.44

Tabella 4.9 Prova di rilascio di Ibuprofene cristallino in PBS

TEMPO (h)	CONCENTRAZIONE (µg/ml)	MASSA FARMACO (mg)	PERCENTUALE (%)
0	0	0	0
0.5	143.89	0.57	6.51
1	257.22	1.60	18.15
2	181.67	2.33	26.37
3	183.33	3.06	34.67
4	187.22	3.81	43.14
5	135.56	4.36	49.27
6	379.44	5.87	66.44
7	536.67	8.02	90.72
8	167.22	8.69	98.29
24	213.89	9.54	107.968
48	77.78	9.86	111.49

Le figure 4.22 e 4.23 riportano i risultati dell'esperimento di rilascio di ibuprofene, nelle prime 8 ore, con cella di Franz espressi rapportando la percentuale di farmaco rilasciato rispetto alla quantità iniziale e la massa rilasciata in funzione del tempo. Entrambi i grafici mostrano il confronto di ibuprofene rilasciato dal campione IBU@NS-ZnO e dal campione composto da solo farmaco cristallino.

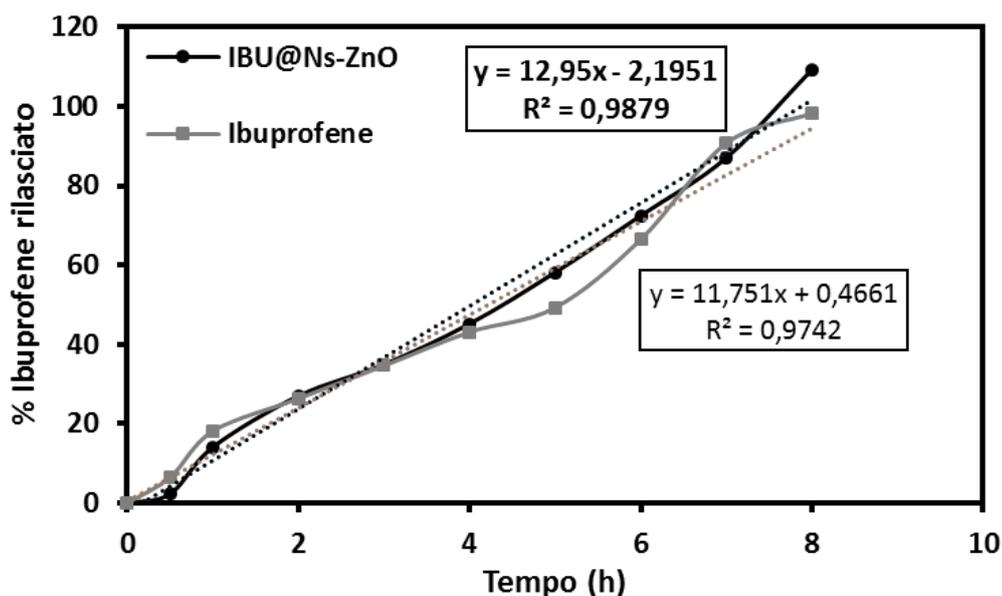


Figura 4.22 Confronto della percentuale di Ibuprofene rilasciato, nelle prime 8 ore, dai due sistemi

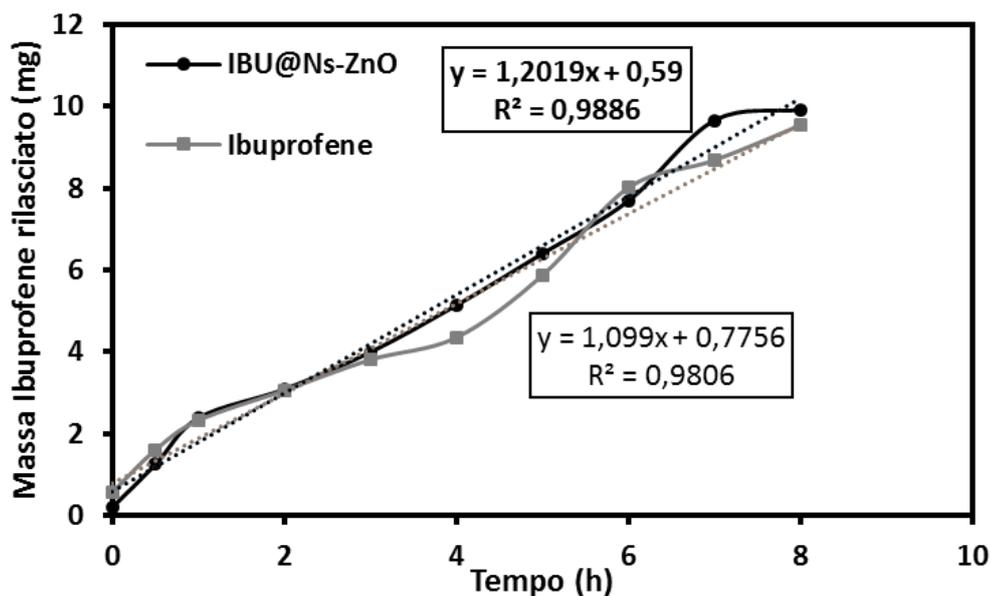


Figura 4.23 Confronto della quantità (mg) di ibuprofene rilasciato, nelle prime 8 ore, dai due sistemi

Ciò che si osserva è un rilascio monotono e lineare nel tempo del farmaco amorfo da IBU@Ns-ZnO. La prova di rilascio in PBS, atto a simulare un ambiente biologico, garantisce la completa fuoriuscita del farmaco dal carrier raggiunte le 8 ore di prova.

4.5 Caratterizzazione di SIM@Ns-ZnO

Di seguito sono riportati i risultati delle tecniche di caratterizzazione applicate al materiale SIM@Ns-ZnO.

4.5.1 Analisi di fisisorbimento di azoto

Dall'analisi di adsorbimento/desorbimento di azoto sono stati ottenuti dei dati che hanno permesso la costruzione dell'isoterma di adsorbimento e la curva di distribuzione dei pori del materiale che, nella figura seguente, vengono confrontati con i dati già noti dell'ossido di zinco nanostrutturato:

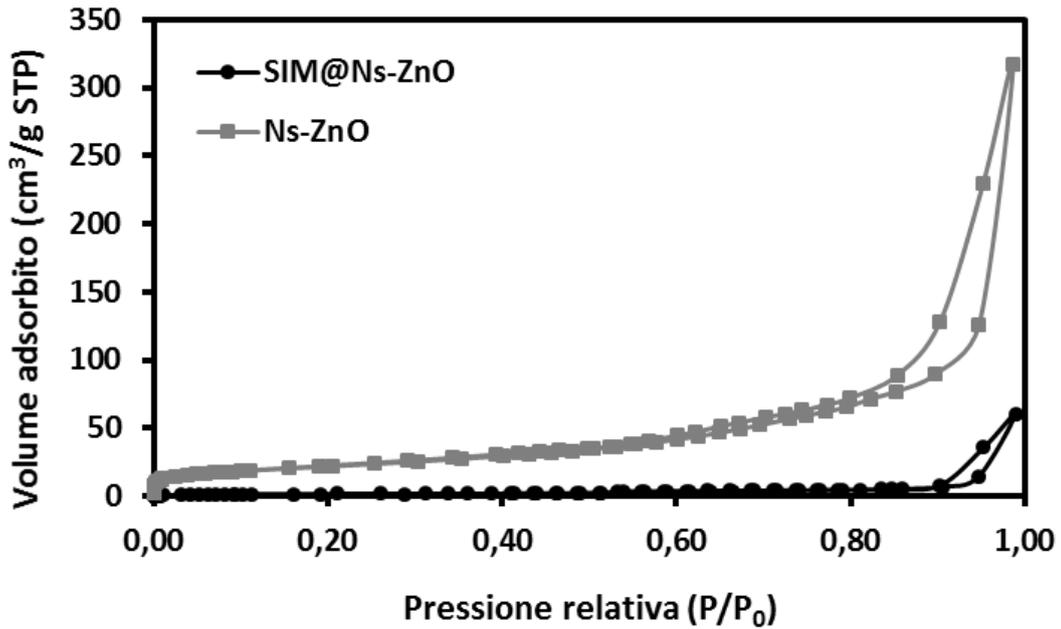


Figura 4.24 Isotherma di adsorbimento/desorbimento di SIM@Ns-ZnO e Ns-ZnO

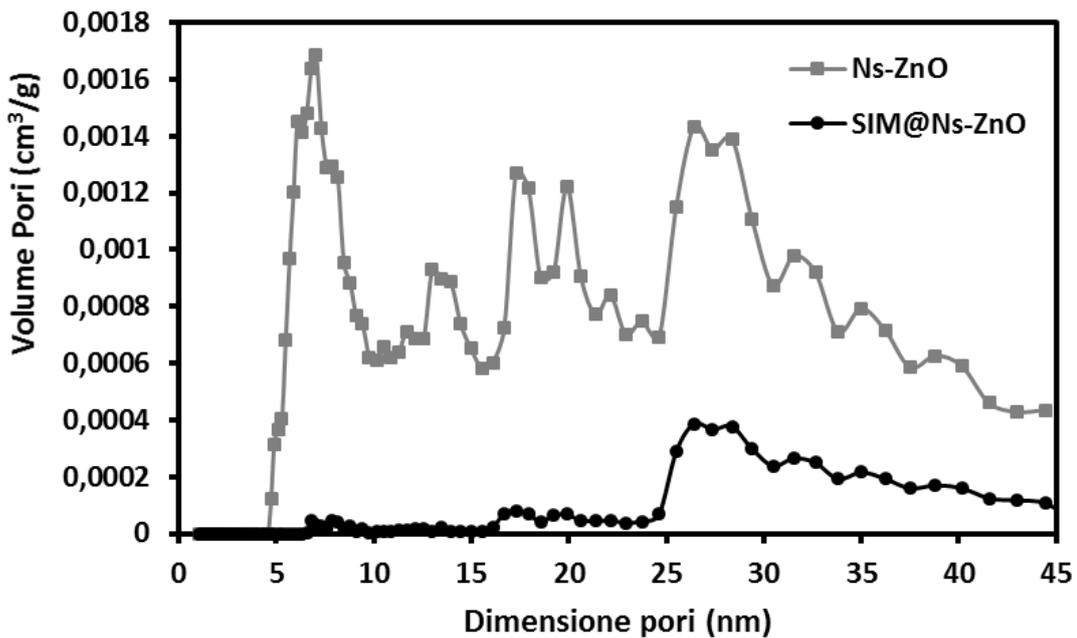


Figura 4.25 Distribuzione della dimensione dei pori di SIM@Ns-ZnO e Ns-ZnO

Nella tabella 4.10, riportata di seguito, sono sintetizzati i parametri d'interesse ottenuti dalla prova di fisisorbimento di azoto a cui è stato sottoposto SIM@Ns-ZnO, ovvero il valore di area superficiale specifica (ASS), volume medio dei pori (V_p) e diametro medio dei pori (D_p), confrontati con i dati relativi a Ns-ZnO sintetizzato:

Tabella 4.10 Valori di area superficiale e volume dei pori di SIM@Ns-ZnO e Ns-ZnO

Campione	SSA ($\frac{m^2}{g}$)	Vp ($\frac{cm^3}{g}$)
SIM@Ns-ZnO	6.9	0.05
Ns-ZnO	78	0.33

Osservando i risultati ottenuti dalla prova a cui è stato sottoposto il campione, si evince una marcata riduzione dell'area superficiale specifica e del volume dei pori. La riduzione dell'area superficiale specifica e del volume poroso è maggiore rispetto al caso dell'ibuprofene. In particolare, risultano eliminate le porosità di dimensioni inferiori ai 15 nm. I risultati ottenuti confermano l'avvenuto adsorbimento del farmaco sulla superficie e nelle porosità di Ns-ZnO.

4.5.2 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Di seguito, nella figura 4.26, sono rappresentati gli spettri FT-IR di SIM@Ns-ZnO, Ns-ZnO e Simvastatina:

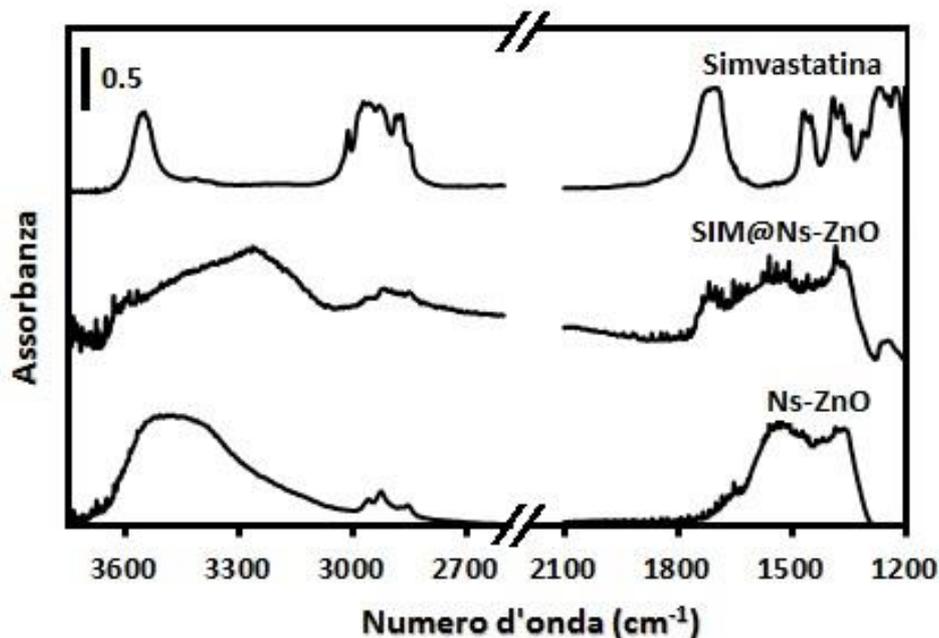


Figura 4.26 Confronto spettri FT-IR del materiale SIM@Ns-ZnO, di Ns-ZnO sintetizzato e della Simvastatina

Dall'analisi di fisisorbimento di azoto è stata osservata una forte riduzione dell'area superficiale, associata all'introduzione del farmaco nel carrier. Questa osservazione è

avvalorata dal risultato dell'analisi FT-IR fatta su SIM@Ns-ZnO che evidenzia la comparsa di nuovi picchi rispetto allo spettro dell'ossido sintetizzato.

4.5.3 Diffrazione a raggi X

I risultati dell'analisi XRD fatta su SIM@Ns-ZnO sono di seguito riportati, insieme allo spettro del campione Ns-ZnO e di Ns-ZnO_scCO₂:

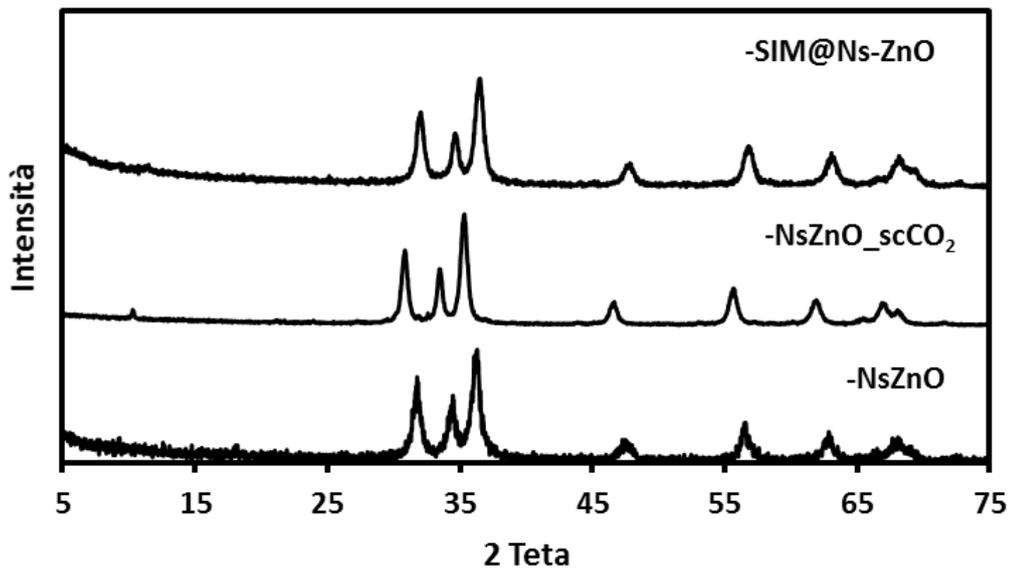


Figura 4.27 Spettro XRD di SIM@Ns-ZnO, Ns-ZnO e Ns-ZnO_scCO₂

L'ottenimento di uno spettro XRD identico a quello di Ns-ZnO, senza che siano comparse nuove fasi cristalline riconducibili al farmaco, conferma che la percentuale di farmaco incorporato nel carrier si trova allo stato amorfo.

4.5.4 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo

L'analisi FESEM ha permesso di ottenere, a diversi ingrandimenti, diverse micrografie della morfologia del materiale SIM@Ns-ZnO:

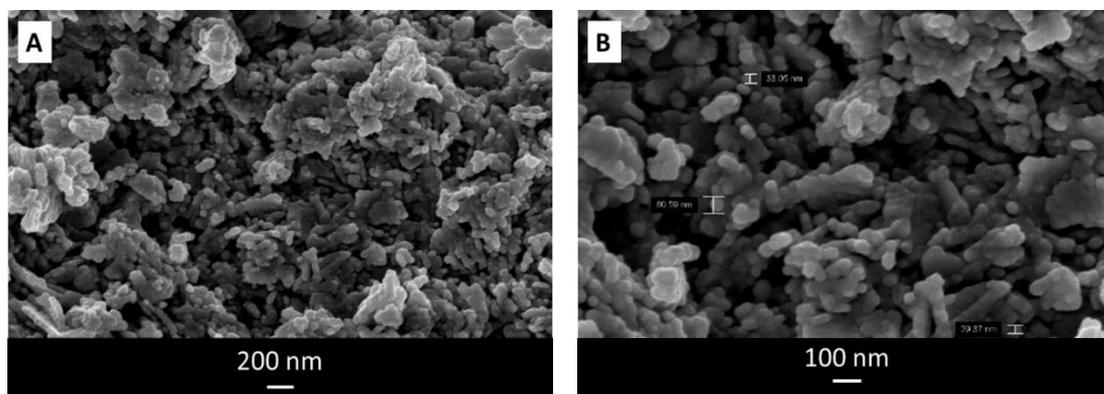


Figura 4.28 Immagini FESEM di SIM@Ns-ZnO a diversi ingrandimenti: A) 100 kX e B) 200 kX

I risultati ottenuti dall'analisi FESEM evidenziano un mutamento di morfologia del sistema incorporato con Simvastatina, rispetto a quello ottenuto con l'Ibuprofene, entrambi molto diversi dalla morfologia di partenza del campione Ns-ZnO dopo sintesi.

4.5.5 Quantificazione del farmaco incorporato

Come per l'ibuprofene, anche il campione SIM@Ns-ZnO, è stato studiato al fine di quantificare il farmaco trattenuto. Per ottenere questo dato è stata costruita la retta di taratura della simvastatina in etanolo, solvente in cui la polvere è stata sospesa per due ore. A partire dalla soluzione madre di concentrazione pari a $1 \frac{mg}{ml}$, sono state create, tramite opportune diluizioni, le soluzioni figlie a concentrazione nota. Di seguito sono i valori di concentrazione delle soluzioni figlie e i rispettivi valori di assorbanza letti allo spettrofotometro Uv-Vis:

Tabella 4.11 Costruzione della retta di taratura della simvastatina in etanolo

Campione	Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	Assorbanza (Soluzioni figlie in etanolo)
1	12.5	0.681
2	10	0.540
3	7.5	0.402
4	5	0.250
5	2.5	0.120
6	0	0

Di seguito, nella figura 4.29, si riporta la retta di taratura della simvastatina, ottenuta mettendo in relazione i valori di assorbanza in funzione della concentrazione:

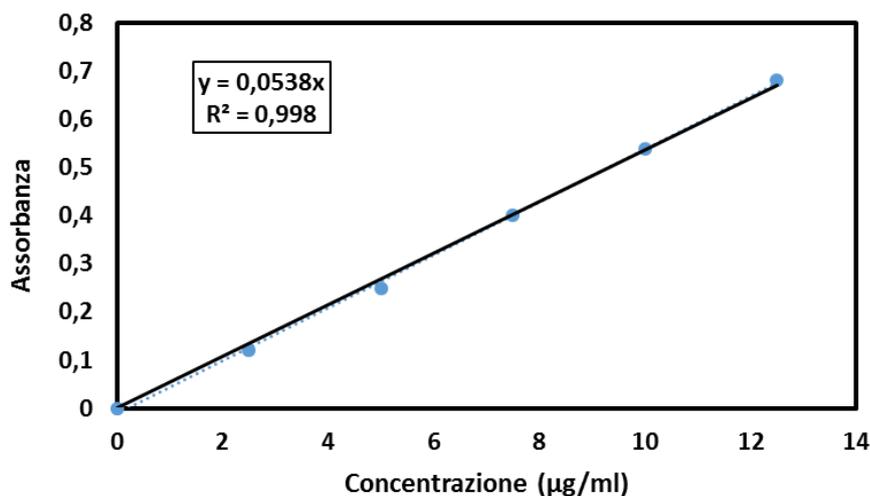


Figura 4.29 Retta di taratura della Simvastatina in etanolo

Costruita la retta di taratura e analizzata la soluzione di farmaco, dopo centrifugazione, allo spettrofotometro Uv-Vis è stato possibile ricavare, come per l'ibuprofene, la quantità di farmaco incorporata in Ns-ZnO e quindi la percentuale di Drug Loading (Eq 2):

Equazione 2:

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{\text{Peso del farmaco incorporato}}{\text{Peso del materiale SIM@Ns-ZnO}} * 100$$

Nella tabella 4.12 sono riportati i risultati ottenuti:

Tabella 4.12 Massa di simvastatina incorporata nel carrier e valutazione della Drug Loading

	Assorbanza	Concentrazione (µg/ml)	Massa di Simvastatina (mg)	Drug Loading (%)
Soluzione di Simvastatina	0.849	31.56	0.57	5

Il dato di *Drug Loading* ottenuto, molto diverso da quello relativo all'ibuprofene pari al 16%, è correlabile alla dimensione maggiore della molecola di simvastatina che, dato il suo ingombro sterico, crea una sorta di "Pore Blocking", ostruendo il passaggio all'interno delle porosità dell'ossido di zinco. Questa osservazione è confermata dalla repentina diminuzione del volume dei pori in seguito all'incorporazione del farmaco, mostrata nella figura 4.25, e dal conseguente valore di *Drug Loading* pari solo al 5%.

4.5.6 Determinazione del numero di molecole per nm² e nm³

Calcolata la percentuale di simvastatina incorporata in Ns-ZnO è stato eseguito il calcolo delle molecole di farmaco occupanti 1 nm² e 1 nm³. Per fare ciò è stata fissata una base di calcolo di 1 g di materiale, contenente quindi, in base ai risultati sopra ottenuti, 0.05 g di simvastatina e 0.95 g di Ns-ZnO. Noto il peso molecolare del farmaco e considerando i valori di area superficiale specifica e volume medio dei pori del carrier sintetizzato, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Tabella 4.13 Determinazione del numero di molecole di Simvastatina per nm² e nm³

Campione	Molecole per nm ²	Molecole per nm ³
Simvastatina	1	0.2

4.5 Valutazione dei fattori che influenzano il “Drug Loading”

Al termine dell’attività sperimentale, la raccolta dei risultati relativi alle prove d’incorporazione dei farmaci nel medesimo carrier, ovvero ossido di zinco nano-strutturato Ns-ZnO, ha reso possibile l’avanzamento di ipotesi riguardanti i fattori che maggiormente influenzano i processi d’intrappolamento del principio attivo, tramite processi supercritici.

Durante l’attività di tesi è stato indagato il processo d’incorporazione, in scCO₂, di ibuprofene e simvastatina; le performance ottenute per questi due sistemi, in termini di “Drug Loading”, sono state confrontate con i risultati noti di un altro principio attivo, ovvero il clotrimazolo, già analizzato dal gruppo di ricerca [52].

Nella tabella 4.14 sono riportati i parametri fisici adottati nelle prove d’incorporazione dei farmaci, mediante processi d’impregnazione in CO₂ supercritica.

Tabella 4.14 Parametri fisici adottati nei processi d’incorporazione supercritici e valutazione della percentuale di Drug Loading

	Temperatura (°C)	Pressione (bar)	Drug Loading (w/w) (%)
Ibuprofene	35	100	16
Simvastatina	75	300	5
Clotrimazolo	100	250	17 [27]

I parametri fisici, adottati nei tre casi, dipendono ovviamente dalla solubilità che il principio attivo mostra in CO₂ supercritica.

I risultati sperimentali evidenziano una percentuale di farmaco incorporato, nel medesimo carrier, molto simile per l'ibuprofene e clotrimazolo e abbastanza più bassa per la simvastatina.

Nella figura 4.30 vengono ricordate le strutture chimiche dei tre diversi farmaci.

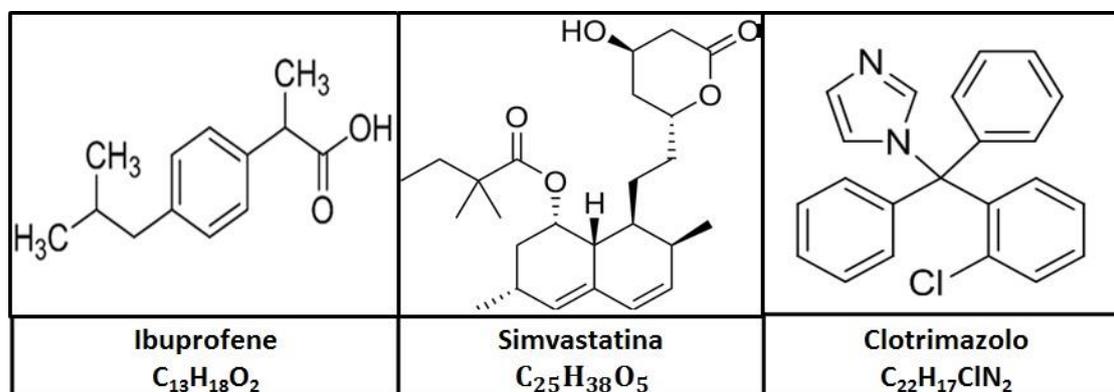


Figura 4.30 Struttura chimica dell'ibuprofene, simvastatina e clotrimazolo

Nella tabella 4.15, riportata di seguito, sono mostrati i dati di solubilità di ibuprofene, simvastatina e clotrimazolo, nelle condizioni di temperatura e pressione utilizzati nei processi d'impregnazione realizzati in questo lavoro di tesi.

Tabella 4.15 Solubilità dei farmaci in CO_2 supercritica alle condizioni fisiche utilizzate nel processo di impregnazione descritto, peso e dimensioni molecolari

	Solubilità in $scCO_2$ y x $10^3 / mol \cdot mol^{-1}$	Peso Molecolare (g/mol)	Dimensioni molecola (nm)
Ibuprofene	0.766 [59]	206.29	1 x 0.6 [58]
Simvastatina	0.335 [49]	418.57	2.2 x 1.7 x 0.6 [46]
Clotrimazolo	0.0327 [60]	344.837	1 [61]

Tra tutti, l'ibuprofene è il farmaco più solubile in CO_2 supercritica, seguito dalla simvastatina; diversamente, il clotrimazolo, che ha garantito l'ottenimento di una elevata percentuale di farmaco incorporato, è quello che presenta una minore solubilità. Dalla valutazione di questi dati si deduce che la solubilità del principio attivo in CO_2 supercritica non è da considerarsi come un fattore influenzante la percentuale di *Drug Loading*. Questa affermazione è avvalorata se si considera che i processi d'incorporazione tramite CO_2 supercritica hanno avuto la durata totale di 8 ore e quindi, anche per bassi valori di solubilità, si sarebbe comunque raggiunta una condizione di saturazione.

Nella valutazione dei fattori influenzanti i processi analizzati, potrebbe essere utile considerare il peso molecolare e le dimensioni molecolari esibite dai tre diversi principi attivi, riassunti nella tabella 4.15.

Il peso molecolare dell'ibuprofene è più piccolo di quello del clotrimazolo, sebbene presentino valori dimensionali molto simili. La simvastatina invece ha un peso molecolare

superiore a quello del clotrimazolo ed è persino il doppio rispetto a quello dell'ibuprofene. Queste osservazioni potrebbero aiutarci nella valutazione delle differenti performance, esibite dai tre differenti farmaci nel processo d'incorporazione supercritico. Si potrebbe concludere facendo una considerazione, ovvero i parametri dimensionali dei principi attivi hanno una certa influenza sul Drug Loading, perché da essi dipende l'affinità del farmaco con i siti di adsorbimento dell'ossido di zinco nano-strutturato.

Partendo da uno stesso carrier, molecole di principi attivi come ibuprofene e clotrimazolo, con dimensioni molecolari e peso molecolari simili, mostrano un'affinità simile con l'ossido di zinco. La simvastatina, invece, caratterizzata da un ingombro sterico nettamente superiore, evidenzia una maggiore difficoltà nel processo di adsorbimento e diffusione nel carrier. A conferma di ciò abbiamo una maggiore riduzione di ASS e Vp a fronte di una minore quantità di farmaco incorporata (fenomeno di *Pore Blocking*).

Conclusioni

L'ossido di zinco nano-strutturato, grazie alle sue proprietà intrinseche, è un materiale versatile, utilizzabile in diversi campi di applicazione. Negli ultimi anni, le industrie farmaceutiche si stanno concentrando su una tecnologia innovativa per la somministrazione topica di farmaci antinfiammatori.

In questo contesto si colloca il lavoro di questa tesi, atta ad indagare la prestanza di Ns-ZnO, come carrier di farmaci, nel processo di Drug Loading e lo sviluppo di formulazioni innovative per applicazioni nell'ambito dermatologico.

La scelta di Ns-ZnO, come carrier di farmaci, nasce dalla volontà di seguire un approccio innovativo, intento a cercare un allontanamento da tutte le tecnologie non rispettose dell'ambiente e della salute dell'uomo. La sintesi dell'ossido, infatti, non prevede l'utilizzo di solventi organici, i cui residui sono fortemente tossici. Ns-ZnO presenta una morfologia particolare, si tratta di particelle ovoidali aggregate in nano-fogli, con elevata area superficiale e distribuzione multimodale dei pori.

Anche per la fase d'impregnazione del carrier, è stata seguita un'impronta *green* scegliendo una nuova tecnologia che prevede l'utilizzo di anidride carbonica supercritica. L'utilizzo di anidride carbonica supercritica risolve le problematiche d'inquinamento e permette di ottenere dei carrier subito pronti per l'uso, senza la necessità di fasi di purificazioni preventive.

L'Ibuprofene (IBU) e la Simvastatina (SIM) sono i farmaci modello scelti per questo studio, vista la loro bassa solubilità nell'acqua. Questi farmaci sono molto utilizzati nell'ambito farmacologico ma per la cura di malattie di diversa tipologia, quindi la loro scelta nasce dalla volontà di sottolineare la versatilità di Ns-ZnO come carrier di farmaci.

L'attività sperimentale, prevista da questo lavoro di tesi, ha permesso di ottenere dei risultati soddisfacenti grazie all'incorporazione dei farmaci in Ns-ZnO tramite l'utilizzo di scCO₂. Questa tecnologia è del tutto nuova e, come tale, pochi sono i dati presenti in letteratura. Durante il processo non è stata osservata la conversione di Ns-ZnO in carbonato di zinco ZnCO₃ ed è stato possibile, a valle del processo, calcolare la % *Drug Loading* per i due farmaci, molto soddisfacente per l'ibuprofene, più bassa per la simvastatina che, date le sue elevate dimensioni geometriche, genera un fenomeno di *Pore Blocking*.

Le tecniche di caratterizzazione dei materiali hanno evidenziato la natura amorfa del farmaco, all'interno del materiale, indice di un profilo di dissoluzione ottimizzato e biodisponibilità utili per gli scopi biomedicali. Inoltre queste analisi hanno evidenziato la capacità del farmaco di proteggere la superficie di Ns-ZnO da un'eventuale carbonatazione, in presenza di anidride carbonica supercritica.

La simulazione di un rilascio topico del farmaco, tramite Celle di Franz, hanno evidenziato un rilascio lineare del farmaco, nel tempo che si completa nell'arco di 8 ore.

Valutazioni finali, atte a valutare i fattori che maggiormente influenzano i processi d'intrappolamento del principio attivo, tramite tecnologia supercritica, hanno permesso di ipotizzare che i parametri dimensionali dei principi attivi hanno un'elevata influenza sul

Drug Loading, mentre la solubilità non andrebbe ad influenzare il processo d'incorporazione supercritico.

Ovviamente questo lavoro di tesi si colloca in un contesto del tutto nuovo che garantisce sviluppi futuri su di più fronti. Ad esempio, può essere realizzato uno studio più approfondito sul rilascio del farmaco e su eventuali formulazioni gel per applicazione cutanea, che permetterebbero d'indagare l'attività multitasking di Ns-ZnO.

Bibliografija

- [1] A. Naveed *et al.*, "Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles : The Dilemma of Ecotoxicity," vol. 2017, no. Table 1, 2017.
- [2] T. Jesionowski *et al.*, "Zinc Oxide — From Synthesis to Application: A Review," pp. 2833–2881, 2014.
- [3] J. M. Chem *et al.*, "Porous ZnO nanorod for targeted delivery of doxorubicin : in vitro and in vivo response for therapeutic applications †," pp. 24145–24154, 2012.
- [4] A. Sirelkhatim *et al.*, "Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism," *Nano-Micro Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 219–242, 2015.
- [5] R. Kumar *et al.*, "Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 5, pp. 3940–3961, 2017.
- [6] G. J. Owens *et al.*, "Sol-gel based materials for biomedical applications," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 77, pp. 1–79, 2016.
- [7] G. Madhumitha *et al.*, "Biotechnological aspects of ZnO nanoparticles: overview on synthesis and its applications," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 2, pp. 571–581, 2016.
- [8] L. C. Ann *et al.*, "Structural morphology and in vitro toxicity studies of nano- and micro-sized zinc oxide structures," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 3, no. 1, pp. 436–444, 2015.
- [9] J. Pasquet *et al.*, "The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 457, no. 1, pp. 263–274, 2014.
- [10] G. Bisht *et al.*, "ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent," *Nanobiomedicine*, vol. 3, p. 9, 2016.
- [11] J. W. Rasmussen *et al.*, "Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 7, no. 9, pp. 1063–1077, 2010.
- [12] T. G. Smijs *et al.*, "Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness," *Nanotechnol. Sci. Appl.*, vol. 4, no. 1, pp. 95–112, 2011.
- [13] P. Zhu *et al.*, "Biomedical Applications of Functionalized ZnO Nanomaterials: From Biosensors to Bioimaging," *Adv. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 1, pp. 1–30, 2016.
- [14] H. M. Xiong, "ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 37, pp. 5329–5335, 2013.
- [15] B. Tian *et al.*, "Hydrophilic, mesoporous structural ZnO nanospheres for pH-triggered release of drug," *Mater. Lett.*, vol. 188, no. May 2016, pp. 165–168, 2017.
- [16] M. Li *et al.*, "Polypeptide/doxorubicin hydrochloride polymersomes prepared through organic solvent-free technique as a smart drug delivery platform," *Macromol. Biosci.*, vol. 13, no. 9, pp. 1150–1162, 2013.
- [17] S. Mitra *et al.*, "Porous ZnO nanorod for targeted delivery of doxorubicin: In vitro and in vivo response for therapeutic applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 45, pp. 24145–24154, 2012.
- [18] A. Stanković *et al.*, "PLGA/Nano-ZnO Composite Particles for Use in Biomedical Applications: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity," *J. Nanomater.*, vol. 2016, 2016.
- [19] Y. Chen *et al.*, "Multiple drug-loaded electrospun PLGA/gelatin composite nanofibers encapsulated with mesoporous ZnO nanospheres for potential postsurgical cancer treatment," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 53, pp. 28011–28019, 2014.

- [20] R. Goyal *et al.*, "Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 240, pp. 77–92, 2016.
- [21] "La cute: organizzazione atomica," 2018. [Online]. Available: <http://medpoint.altervista.org/>.
- [22] B. Baroli *et al.*, "Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, no. 7, pp. 1701–1712, 2007.
- [23] J. S. Boateng *et al.*, "Wound healing dressings and drug delivery systems: A review," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 2892–2923, 2008.
- [24] S. E. Cross *et al.*, "Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation," *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 20, no. 3, pp. 148–154, 2007.
- [25] A. M. Holmes *et al.*, "Relative Penetration of Zinc Oxide and Zinc Ions into Human Skin after Application of Different Zinc Oxide Formulations," *ACS Nano*, vol. 10, no. 2, pp. 1810–1819, 2016.
- [26] V. R. Leite-Silva *et al.*, "The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 84, no. 2, pp. 297–308, 2013.
- [27] F. Leone *et al.*, "A green organic-solvent-free route to prepare nanostructured zinc oxide carriers of clotrimazole for pharmaceutical applications," *J. Clean. Prod.*, vol. 172, 2018.
- [28] K. Grodowska *et al.*, "Organic solvents in the pharmaceutical industry," *Acta Pol. Pharm.*, vol. 67, no. 1, pp. 3–12, 2010.
- [29] R. Brunet *et al.*, "Combined simulation-optimization methodology to reduce the environmental impact of pharmaceutical processes: Application to the production of Penicillin v," *J. Clean. Prod.*, vol. 76, pp. 55–63, 2014.
- [30] I. Pasquali *et al.*, "Are pharmaceuticals really going supercritical?," *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no. 2, pp. 176–187, 2008.
- [31] A. Di, F. Tecnica *et al.*, "Termodinamica Classica," pp. 1–51, 2018.
- [32] J. Zhang *et al.*, "Mechanistic insights into response of *Staphylococcus aureus* to bioelectric effect on polypyrrole/chitosan film," *Biomaterials*, vol. 35, no. 27, pp. 7690–7698, 2014.
- [33] B. A. I. Cooper, "Recent Developments in Materials Synthesis and Processing Using Supercritical CO₂ **," vol. 2, no. 14, pp. 1111–1114, 2001.
- [34] M. Champeau *et al.*, "Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review," *J. Control. Release*, vol. 209, pp. 248–259, 2015.
- [35] M. Banchemo *et al.*, "Supercritical solvent impregnation of piroxicam on PVP at various polymer molecular weights," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 49, no. 2, pp. 271–278, 2009.
- [36] S. G. Kazarian *et al.*, "Spectroscopy of polymer / drug formulations processed with supercritical fluids : in situ ATR – IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP," vol. 232, pp. 81–90, 2002.
- [37] P. Marizza *et al.*, "The Journal of Supercritical Fluids Supercritical impregnation of polymer matrices spatially confined in microcontainers for oral drug delivery : Effect of temperature , pressure and time," vol. 107, pp. 145–152, 2016.
- [38] D. P. Singh, "Synthesis and Growth of ZnO Nanowires Synthesis and Growth of ZnO Nanowires ZnO by," no. October 2010, 2014.
- [39] S. Kalepu *et al.*, "Insoluble drug delivery strategies : review of recent advances and business prospects," *Acta Pharm. Sin. B*, pp. 1–12, 2015.

- [40] P. Gurikov *et al.*, "Amorphization of drugs by adsorptive precipitation from supercritical solutions: A review," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 132, pp. 105–125, 2018.
- [41] R. Bushra *et al.*, "Review Article An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen," vol. 25, no. 3, pp. 155–162, 2010.
- [42] "Ibuprofen." .
- [43] J. Irvine *et al.*, "Formulation and delivery strategies of ibuprofen : challenges and opportunities," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–11, 2018.
- [44] E. Information, "Why combine a foam dressing with ibuprofen for wound pain and moist wound healing ?," vol. 4, no. 1, pp. 1–3, 2007.
- [45] N. Shokri *et al.*, "ZINC OXIDE NANOPARTICLES AS SKIN PERMEATION ENHANCER FOR SOLVENTS AND SURFACTANTS," vol. 13, no. 3, pp. 85–91, 2014.
- [46] M. Hušák *et al.*, "Simvastatin: Structure solution of two new low-temperature phases from synchrotron powder diffraction and ss-NMR," *Struct. Chem.*, vol. 21, no. 3, pp. 511–518, 2010.
- [47] S. Wook *et al.*, "Preparation and characterization of simvastatin / hydroxypropyl- b - cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process," vol. 66, pp. 413–421, 2007.
- [48] "Simvastatin." .
- [49] M. Hojjati *et al.*, "Solubility of some statin drugs in supercritical carbon dioxide and representing the solute solubility data with several density-based correlations," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 41, no. 2, pp. 187–194, 2007.
- [50] K. Kakiuchi *et al.*, "Fabrication of mesoporous ZnO nanosheets from precursor templates grown in aqueous solutions," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 39, no. 1 SPEC. ISS., pp. 63–72, 2006.
- [51] A. Gignone *et al.* ., "Microporous and Mesoporous Materials Incorporation of clotrimazole in Ordered Mesoporous Silica by supercritical CO 2," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 200, pp. 291–296, 2014.
- [52] F. Leone *et al.*, "A green organic-solvent-free route to prepare nanostructured zinc oxide carriers of clotrimazole for pharmaceutical applications," *J. Clean. Prod.*, vol. 172, pp. 1433–1439, 2018.
- [53] S. R. Matkovic *et al.*, "QUANTITATIVE ANALYSIS OF IBUPROFEN IN PHARMACEUTICAL FORMULA- TIONS THROUGH FTIR SPECTROSCOPY," vol. 195, pp. 189–195, 2005.
- [54] Y. Kamari *et al.*, "Preparation and characterization of ibuprofen/modified chitosan/TiO₂ hybrid composite as a controlled drug-delivery system," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 234, pp. 361–369, 2016.
- [55] M. Delle Piane *et al.*, "Large-scale B3LYP simulations of ibuprofen adsorbed in MCM-41 mesoporous silica as drug delivery system," *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 46, pp. 26737–26749, 2014.
- [56] S. Mallick *et al.*, "Physicochemical characterization of interaction of ibuprofen by solid-state milling with aluminum hydroxide," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 34, no. 7, pp. 726–734, 2008.
- [57] R. Masaeli, *et al.*, "Preparation, Characterization and Evaluation of Drug Release Properties of Simvastatin-loaded PLGA Microspheres," *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 15, no. SI, pp. 205–211, 2016.
- [58] G. Gonzalez *et al.*, "Influence of Microstructure in Drug Release Behavior of Silica Nanocapsules," vol. 2013, 2013.
- [59] M. Ardjmand *et al.*, "Measurement and correlation of solid drugs solubility in

- supercritical systems," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 22, no. 5, pp. 549–558, 2014.
- [60] Y. Yamini *et al.*, "Measurement and correlation of antifungal drugs solubility in pure supercritical CO₂ using semiempirical models," *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 43, no. 7, pp. 1091–1096, 2011.
- [61] H. M. A. Ehmann *et al.*, "Dissolution testing of hardly soluble materials by surface sensitive techniques: Clotrimazole from an insoluble matrix," *Pharm. Res.*, vol. 31, no. 10, pp. 2708–2715, 2014.

Ringraziamenti

Come per ogni esperienza di vita che giunge al termine, oggi nasce spontaneo in me il desiderio di guardare indietro e ripercorrere i momenti importanti, quelli che mi hanno toccato, che magari non hanno cambiato il mio modo di essere ma mi hanno dato tanta consapevolezza.

Da qui nasce il mio desiderio di ringraziare le persone che, ancora una volta, sono state pronte a starmi vicino, anche se lontane, le persone che mi hanno accolta in questa nuova città e di me si sono prese cura, le persone nuove che ho avuto il piacere d'incontrare e che porterò con me, come un bagaglio prezioso da custodire.

Grazie alla mia relatrice Barbara Onida che con professionalità ha curato il mio lavoro di tesi.

Un grazie particolare vorrei dedicarlo a Federica, la mia dottoranda. Con professionalità e comprensione mi sei stata vicina e mi hai permesso di imparare molto. Grazie per il sostegno e la disponibilità che mi hai riservato.

Dedico ogni mio obiettivo raggiunto alla mia famiglia che da sempre mi sostiene, mi incoraggia, mi supporta e mi fa sentire protetta ed amata. A mio padre, a mia madre e ai miei fratelli: a voi devo tutto e a voi dedico la gioia di questo giorno.

Alla mia fedele compagna, alla scoperta più bella, a te Francesca un ringraziamento speciale per i momenti che ci siamo regalate, per le confidenze, i sorrisi, i pianti e il confronto che ha permesso a questa nuova amicizia di nascere. Non so cosa ci riserva il futuro ma ti porterò sempre nel mio cuore.

A chi mi ha seguita, ha reinventato la sua vita pur di starmi accanto e ogni giorno è la conferma mia più bella. A te Andry devo tutto, la serenità e la felicità di questi anni, auguro a noi di trovare il nostro posto nel mondo, insieme.

Grazie a Giada e Valeria. Sette anni fa ci siamo scelte e da allora abbiamo condiviso questa esperienza che, anche se a volte difficile, ci ha regalato tanti momenti belli che non dimenticherò. Vi porterò sempre con me.

Un sentito grazie alla mia famiglia torinese che con amorevole affetto mi è stata accanto in questi anni. Grazie perchè siete stati il mio punto di riferimento e il porto sicuro dove rifugiarmi. Grazie Tamara per tutto quello che hai fatto per me, per i gesti, per le parole e le attenzioni: ti sei rivelata una sorella premurosa e questo non lo potrò mai dimenticare.

Grazie agli amici di sempre, che la lontananza non mi ha portato via. A Domenica e Michela un ringraziamento speciale perché l'amore che ci lega va oltre le distanze. Vi voglio bene e so che vi avrò sempre al mio fianco.

Dopo questo sguardo al passato, fatto tesoro di tutto, guardo fiduciosa al mio futuro.
Grazie a tutti!

