

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale



Silici mesoporose come carrier di idrocortisone

Relatori

Prof. ssa Barbara Onida

Prof. ssa Silvia Maria Ronchetti

Candidato
Nicolas Mazzeo

Novembre 2018



POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali



INDICE

ACRONIMI	V
1. INTRODUZIONE	1
2. SISTEMI DI DRUG DELIVERY	3
<i>2.1 Evoluzione dei sistemi di drug delivery (DDSs)</i>	<i>3</i>
<i>2.2 Fattori chiave per i sistemi di drug delivery</i>	<i>4</i>
<i>2.3 La cute umana</i>	<i>5</i>
<i>2.4 Metodi di somministrazione</i>	<i>6</i>
<i>2.5 Vantaggi e svantaggi del rilascio di farmaco per via topica</i>	<i>7</i>
<i>2.6 Tecnologie per applicazioni topiche.....</i>	<i>8</i>
2.6.1 Microemulsioni.....	8
2.6.2 Nanoemulsioni.....	9
2.6.3 Liposomi.....	9
2.6.4 Dendrimeri.....	10
2.6.5 Nanoparticelle lipidiche.....	10
2.6.6 Nanoparticelle polimeriche.....	11
2.6.7 Nanoparticelle inorganiche.....	12
3. PROPRIETA' E APPLICAZIONI DELLE SILICI MESOPOROSE ...	13
<i>3.1 Le silici mesoporose.....</i>	<i>13</i>
<i>3.2 Tipologie di silici mesoporose</i>	<i>13</i>
<i>3.3 MCM-41</i>	<i>14</i>
<i>3.4 SYLOID®</i>	<i>15</i>
<i>3.5 L'influenza delle proprietà strutturali sulle performance delle silici mesoporose</i>	<i>16</i>
3.5.1 Taglia dei pori.....	16
3.5.2 Area superficiale.....	17
3.5.3 Volume dei pori	17
3.5.4 Funzionalizzazione dei mesopori	17
3.5.5 Fenomeno di amorfizzazione.....	20
3.5.6 Effetto del tempo	21
<i>3.6 Applicazioni di silici mesoporose in campo biomedico</i>	<i>22</i>
4. PRINCIPI ATTIVI UTILIZZATI	25



4.1 Idrocortisone.....	25
4.1.1 Caratteristiche strutturali dell'idrocortisone	25
4.2 Clotrimazolo.....	26
4.2.1 Caratteristiche strutturali del clotrimazolo	27
5. TECNICHE DI IMPREGNAZIONE.....	29
5.1 Incipient Wetness Impregnation.....	29
5.2 CO₂ Supercritica.....	30
6. TECNICHE DI ANALISI E STRUMENTI UTILIZZATI.....	33
6.1 Spettroscopia Infrarossa A Trasformata Di Fourier (FT-IR).....	33
6.2 Analisi di adsorbimento di azoto	34
6.3 Analisi Termogravimetrica (TGA)	36
6.4 Diffrazione a Raggi X (XRD)	37
6.5 Spettroscopia Ultravioletta-Visibile	38
6.6 Strumenti Utilizzati.....	39
6.6.1 Strumento per FT-IR.....	39
6.6.2 Strumento per analisi di adsorbimento di azoto.....	40
6.6.3 Strumento per analisi termogravimetrica	40
6.6.4 Strumento per analisi diffrattometrica ai raggi X	40
6.6.5 Strumento per spettroscopia UV/VIS	40
7. CARATTERIZZAZIONE DEI PRINCIPI ATTIVI.....	41
7.1 Idrocortisone.....	41
7.2 Clotrimazolo.....	43
8. CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI CON SUPPORTO SILICE GRACE XDP	45
8.1 Caratterizzazione della Grace	45
8.2 Impregnazione della Grace mediante scCO₂.....	48
8.2.1 Caratterizzazione del campione Grace_HC_scCO ₂	49
8.3 Impregnazione della Grace mediante Incipient Wetness Impregnation (IWI) ..	50
8.3.1 Caratterizzazione del campione Grace_16HC	51
8.3.2 Confronto tra Grace e Grace_16HC	53
8.3.3 Caratterizzazione del campione Grace_10HC	56
8.3.4 Confronto tra Grace_16HC e Grace_10HC.....	56
8.3.5 Effetto del tempo sul campione Grace_16HC	57
8.3.6 Confronto tra Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato	60
8.3.7 Effetto dell'umidità e del tempo sul campione Grace_16HC	62



8.3.8 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido	65
8.3.9 Effetto della Temperatura sul campione Grace_16HC	67
8.3.10 Confronto tra Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h	69
9. CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI CON SUPPORTO SILICE	
MCM-41	71
9.1 Caratterizzazione dell'MCM-41	71
9.2 Impregnazione mediante CO₂ Supercritica dell'MCM-41.....	73
9.2.1 Caratterizzazione del campione MCM41_HC_scCO ₂	73
9.3 Impregnazione mediante Incipient Wetness Impregnation (IWI) dell'MCM41	74
9.3.1 Caratterizzazione del campione MCM41_20HC	74
9.3.2 Confronto tra MCM-41 e MCM_20HC.....	75
9.3.3 Caratterizzazione del campione MCM41_10HC.....	76
9.3.4 Confronto tra MCM41_20HC e MCM41_10HC	77
9.3.5 Effetto del tempo sul campione MCM41_HC_20IWI	77
9.3.6 Confronto tra MCM41_20HC e MCM41_20HC_Invecchiato.....	79
9.3.7 Effetto del tempo sul campione MCM41_HC_10IWI	81
9.3.8 Confronto tra MCM41_10HC e MCM41_10HC_Invecchiato.....	83
9.3.9 Confronto tra MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato	83
9.3.10 Effetto dell'umidità e del tempo sul campione MCM41_20HC.....	85
9.3.11 Confronto tra MCM41_HC_20IWI_Invecchiato e MCM41_HC_20IWI_Umido	88
10. CONFRONTO TRA I SISTEMI CON LE DUE TIPOLOGIE DI	
SILICI MESOPOROSE	91
10.1 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e l'MCM41_20HC_Invecchiato	91
10.2 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e l'MCM41_10HC_Invecchiato	94
11. SISTEMA A 2 PRINCIPI ATTIVI	97
11.1 Caratterizzazione del campione Grace_CTZ.....	97
11.2 Confronto tra Grace e Grace_CTZ.....	100
11.3 Confronto della Grace_CTZ con MSU-H-CTZ	103
11.4 Caratterizzazione del campione Grace_16HC_CTZ	104
11.5 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.....	108
11.6 Rilascio dell' Idrocortisone	111
11.6.1 Retta di taratura dell'Idrocortisone	111
11.6.2 Strumentazione prova di rilascio e condizioni utilizzate	112
11.6.3 Risultati ottenuti dalle prove di rilascio dell'idrocortisone cristallino.....	113
11.6.4 Risultati ottenuti dalle prove di rilascio dell'idrocortisone.....	115



12. CONCLUSIONI.....	119
INDICE TABELLE.....	121
INDICE FIGURE.....	123
BIBLIOGRAFIA.....	127
RINGRAZIAMENTI.....	135



ACRONIMI

Drug delivery system	DDS
Active principle ingredient	API
Nanoparticelle lipidiche solide	SLN
Nanoparticelle di Silice mesoporosa	MSN
Risonanza Magnetica Nucleare	NMR
Incipient Wetness Impregnation	IWI
Anidride carbonica supercritica	scCO₂
Diffrazione a raggi X	XRD
Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	FT-IR
Analisi Termogravimetrica	TGA
Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo	FESEM
Idrocortisone	HC
Clotrimazolo	CTZ
Grace al 16 % in massa di idrocortisone mediante IWI	Grace_16HC
Grace al 10 % in massa di idrocortisone mediante IWI	Grace_10HC
Grace al 16 % in massa di idrocortisone mediante IWI e invecchiata in ambiente asciutto	Grace_16HC_Invecchiato
Grace al 16 % in massa di idrocortisone mediante IWI e invecchiata in ambiente umido	Grace_16HC_Umido
Grace al 16 % in massa di idrocortisone mediante IWI e trattata termicamente a 70°C per 8 ore	Grace_16HC_70°_8h
MCM-41 al 20 % in massa di idrocortisone mediante IWI	MCM41_20HC



MCM-41 al 10 % in massa di idrocortisone mediante IWI	MCM41_10HC
MCM-41 al 20 % in massa di idrocortisone mediante IWI e invecchiata in ambiente asciutto	MCM41_20HC_Invecchiato
MCM-41 al 10 % in massa di idrocortisone mediante IWI e invecchiata in ambiente asciutto	MCM41_10HC_Invecchiato
MCM-41 al 20 % in massa di idrocortisone mediante IWI e invecchiata in ambiente umido	MCM41_20HC_Umido
Grace contenente clotrimazolo, da scCO ₂	Grace_CTZ
MSU-H contenente clotrimazolo, da scCO ₂	MSU-H-CTZ
Grace contenente idrocortisone e clotrimazolo	Grace_16HC_CTZ
Tampone Fosfato Salino	PBS



1. INTRODUZIONE

Le nanotecnologie costituiscono un approccio scientifico che si basa sulla comprensione e la conoscenza approfondita delle proprietà della materia su scala nanometrica. Le straordinarie proprietà fisiche, chimiche e meccaniche unite alle molteplici modalità di funzionalizzazione hanno determinato lo studio delle loro possibili applicazioni in molteplici settori disciplinari con particolare riguardo per i dispositivi nanoelettronici, i biosensori e i sistemi di drug delivery (DDS).

Negli anni lo sviluppo di questi ultimi sistemi è aumentato grazie all'interesse di alcune riviste farmaceutiche, tra le quali il "Journal of Controlled Release" (JCR), una rivista con l'obiettivo di pubblicare articoli di alta qualità ed innovazione [1]. Tutte le tecnologie di DDS sono affrontate dal giornale, dai liposomi ai dendrimeri, dalle microemulsioni alle nanoemulsioni, dalle nanoparticelle polimeriche a quelle lipidiche fino a quelle inorganiche.

Tuttavia, il contributo del JCR è stato fondamentale anche dal punto di vista dell'ottimizzazione del rilascio controllato di farmaci e la riduzione degli effetti collaterali. Infatti, diversi studi pubblicati hanno dimostrato che la farmacocinetica, l'efficacia del principio attivo e la soppressione di effetti collaterali indesiderati in diverse condizioni patologiche può essere migliorato con una adeguata somministrazione del farmaco e controllo dalla cinetica di rilascio [2].

Nel corso di questa tesi ci si è soffermati sull'utilizzo di carrier a base di silici mesoporose per applicazioni biomediche ed in particolare per lo sviluppo di sistemi in grado di rilasciare l'Idrocortisone (HC), un farmaco con funzione anti infiammatoria, mediante via topica.

Le silici mesoporose, infatti, godono di ottime proprietà morfologiche, strutturali, termiche e di atossicità a contatto con le cellule corporee che ne fanno di loro dei promettenti materiali per queste applicazioni.

L'elaborato si articola in differenti capitoli. Oltre questa prima sezione introduttiva, vi è il capitolo due in cui inizialmente è effettuata una panoramica delle evoluzioni dei drug delivery system e dei parametri principali che devono essere tenuti in considerazione per realizzare ed ottimizzare queste complesse strutture. Quindi, sono introdotti i principali metodi di somministrazione soffermandosi sui vantaggi e svantaggi del rilascio per via topica ed infine descritte le più importanti tecnologie di DDS.

Nel capitolo tre sono trattate le silici mesoporose con particolare riguardo all'influenza delle proprietà strutturali sulle loro performance: effetto della taglia dei pori, dell'area superficiale, del volume dei pori, della funzionalizzazione della superficie e dell'effetto del tempo vengono affrontati. Quindi, descritte le differenti categorie di silici mesoporose, sono evidenziate le caratteristiche essenziali delle SYLOID ed MCM-41, ovvero le due classi di carrier utilizzate durante l'attività sperimentale. L'ultimo paragrafo del capitolo si occupa di descrivere alcune delle applicazioni biomediche delle silici mesoporose.

Il capitolo quattro descrive le caratteristiche medico-farmaceutiche, strutturali e chimico-fisiche dell'Idrocortisone e del Clotrimazolo (CTZ) utilizzati durante l'attività di laboratorio.



Il capitolo cinque si sofferma a descrivere le tecniche di impregnazione focalizzando l'attenzione sulla $scCO_2$ (anidride carbonica supercritica) date le promettenti proprietà di economica, riciclabilità, non infiammabilità e non tossicità.

Nel capitolo sei sono riportate le tecniche e gli strumenti di analisi utilizzati, con una breve descrizione del metodo di funzionamento.

Successivamente si è passati alla parte sperimentale. Il capitolo 7 si occupa di descrivere le caratteristiche dei farmaci, ottenute mediante analisi termogravimetrica, spettroscopia a trasformata di Fourier e analisi diffrattometrica.

Nel capitolo 8 si hanno le caratterizzazioni dapprima del supporto Grace XDP, una silice disordinata e amorfa, quindi dei sistemi carrier/Idrocortisone impregnati mediante $scCO_2$ e Incipient Wetness Impregnation (IWI). In seguito, sono riportati i risultati delle tecniche di analisi sui sistemi che hanno subito un trattamento di invecchiamento, in ambienti secchi ed umidi, e termico, al fine di osservare il comportamento del farmaco all'interno della matrice.

Il capitolo nove, strutturato in maniera eguale al precedente, ha visto la caratterizzazione dell'MCM-41 commerciale dell'ACS-Material utilizzata durante l'attività sperimentale e dei sistemi con HC realizzati mediante l'utilizzo di anidride carbonica supercritica ed IWI. Anche questi campioni sono stati fatti invecchiare in ambienti secchi e umidi ed analizzati.

Nel capitolo successivo vi è un confronto tra i sistemi ottenuti nei due capitoli precedenti e la scelta di quello aventi le migliori caratteristiche per applicazioni topiche.

Nel capitolo 11 è riportata la caratterizzazione di un sistema avente 2 principi attivi. Infatti, mediante $scCO_2$ è impregnato il sistema migliore, individuato nella sezione precedente, con clotrimazolo, un farmaco con funzione antimicotica. Inoltre vi è uno studio del sistema Grace-Clotrimazolo con confronto con altri sistemi silice/farmaco. L'ultima prova è quella del rilascio di Idrocortisone da parte del sistema in soluzione tampone fosfato salina ed un confronto con il rilascio del farmaco allo stato cristallino sempre nella stessa soluzione.

2. SISTEMI DI DRUG DELIVERY

2.1 Evoluzione dei sistemi di drug delivery (DDS)

I sistemi di drug delivery sono strutture contenenti il principio attivo con l'obiettivo di garantire un trattamento terapeutico in una determinata area del corpo umano o animale.

La tecnologia di rilascio controllato dei farmaci è progredita negli ultimi sei decenni ed una data indicativa della nascita dei DDS è il 1952, con l'introduzione della prima formulazione a rilascio prolungato. La prima generazione di drug delivery (1950-1980) si è concentrata sullo sviluppo di sistemi di rilascio prolungato orale e transdermico e sulla creazione di meccanismi controllati di rilascio di farmaci. Nella seconda generazione (1980-2010), gli studiosi si sono dedicati, inizialmente, allo sviluppo di sistemi aventi le caratteristiche di:

- rilasciare il principio attivo in maniera continua (i cosiddetti sistemi di ordine zero);
- autoregolare la somministrazione di farmaci;
- essere biodegradabili e non tossici per i tessuti con la quale vengono a contatto durante l'applicazione.

L'ultima parte della seconda generazione si è invece focalizzata sullo studio di formulazioni di nanoparticelle.

Infine, la terza generazione di DDS, che attraversa il nostro periodo, è ancora difficile da prevedere.

La tabella 2.1 elenca alcune previsioni di quelli che potranno essere le evoluzioni per i DDS.

Migliori tecnologie di somministrazione dei farmaci dovranno risolvere i problemi riguardanti: la domanda per lo sviluppo di una migliore consegna di insulina, la capacità di consegna a lungo termine del farmaco, vale a dire 6 mesi o più, per il trattamento delle malattie croniche ed inoltre, si dovranno studiare vari metodi in vitro per prevedere con precisione la farmacocinetica di farmaci [1].

Tabella 2.1 Evoluzione dei DDS dal 1950 [1].

1950	1980	2010	2040
1st Generation		2nd Generation	
Basics of controlled release		Smart delivery systems	
Oral delivery Twice-a-day or once-a-day		Zero-order release Zero vs first-order release	
Transdermal delivery Once-a-day, once-a-week		Smart polymers & hydrogels Environment-sensitive Self-regulated release	
Drug release mechanisms Dissolution, diffusion, osmosis, and ion-exchange		Peptide & protein delivery Biodegradable depot	
		Nanoparticles Tumor-targeted delivery Gene delivery	
		3rd Generation	
		Modulated delivery systems	
		On-off insulin release Glucose-sensitive release	
		Targeted delivery Anticancer drugs, siRNA	
		Long-term delivery systems 6-12 months with the minimal initial burst effect	
		In vitro-In vivo correlation Prediction of PK profiles from in vitro release study	

2.2 Fattori chiave per i sistemi di drug delivery

Lo sviluppo di drug delivery system non è immediato. Esso richiede diversi anni di studio dati gli innumerevoli fattori da considerare, come osservabile in figura 2.1.

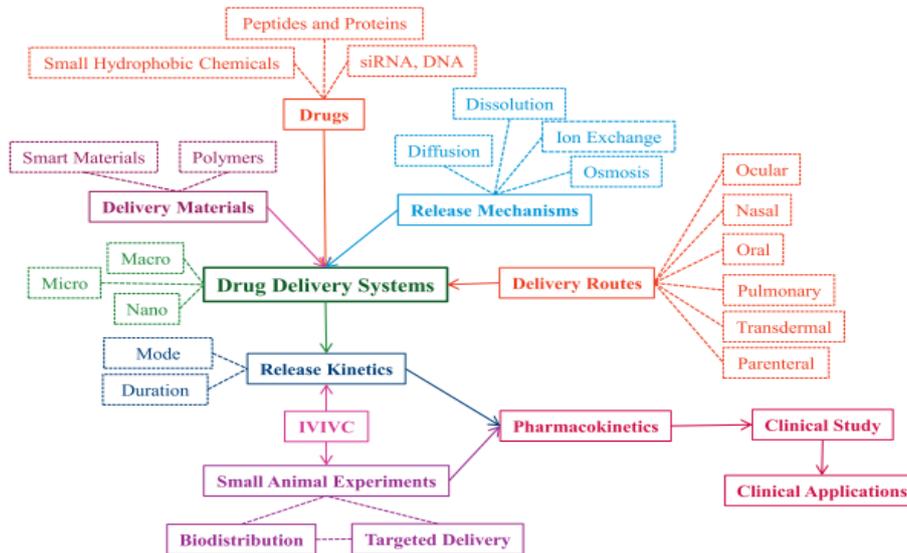


Figura 2.1 Principali fattori che influenzano lo sviluppo dei DDS [1].

Prima di tutto è necessario conoscere il tipo di principio attivo che si vuole trattare non solo dal punto di vista medico-farmaceutico (effetti terapeutici e collaterali), ma anche fisico-chimico. Quindi, bisogna comprendere il metodo di somministrazione (oculare, nasale, orale, topico...), il carrier più adatto per la consegna del farmaco, il meccanismo, la cinetica di rilascio e il target su cui viene applicato il sistema. Questi parametri non sono separati tra loro bensì interconnessi, rendendo più difficile lo studio del sistema e il raggiungimento del prodotto finale. A seguire bisogna testare il sistema mediante opportune prove “in vitro”, in cui si osserva la citotossicità, la capacità di rilascio del farmaco, la durata e la modalità con cui il principio attivo si rilascia. Infine, se gli effetti sono quelli sperati, si procede dapprima allo studio su esseri animali, quali topi e maiali, e successivamente sull'uomo.

La farmacocinetica è uno dei parametri più importanti da studiare durante la progettazione di un sistema per il rilascio di farmaco. Un ottimale DDS deve garantire non solo che il farmaco utilizzato sia corretto per quel determinato fine, ma che esso sia disponibile nel sito di azione per tutta la durata del trattamento e con una concentrazione tra il valore minimo necessario per assicurare l'effetto terapeutico e il valore massimo oltre il quale si avrebbe tossicità.

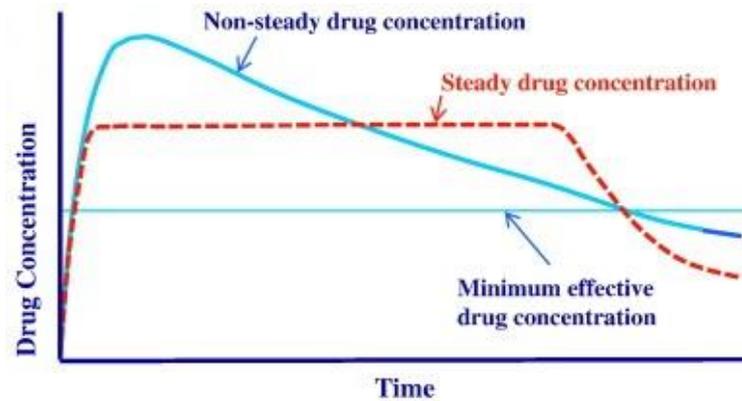


Figura 2.2 Profili per il rilascio costante e non del farmaco mediante sistemi di drug delivery [1].

2.3 La cute umana

Differenti studi hanno mostrato come ottimizzare il corretto tempo e la cinetica di rilascio del farmaco. Tuttavia bisogna tenere in considerazione anche le caratteristiche anatomiche della pelle.

Innanzitutto, la cute, oltre ad avere funzioni estetiche, ha delle funzioni indispensabili per il nostro corpo quali: protezione dai fattori ambientali, controllo della perdita di acqua, regolazione della temperatura interna, assorbimento di sostanze e sintesi di vitamina D. Queste funzioni sono relative alla complessa struttura a strati.

La pelle è il più grande organo del nostro corpo con un'area superficiale tra 1,8-2 m² ed è composta da 3 principali strati; l'epidermide, il derma e l'ipoderma, come mostrato in figura 2.3.

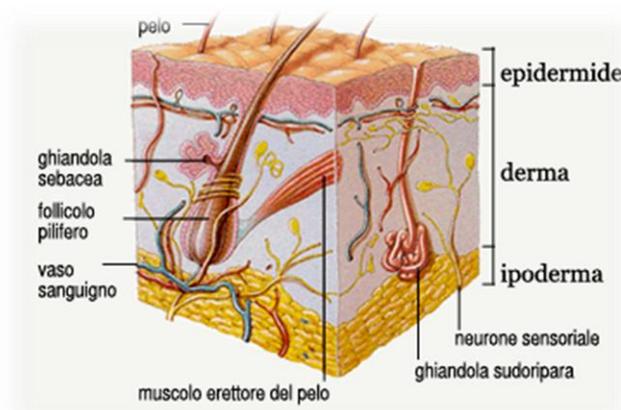


Figura 2.3 Struttura della cute [3].

L'epidermide è lo strato più esterno della pelle e il suo spessore varia da 0.5 mm a 1,5 mm. Fornisce una barriera impermeabile grazie alla presenza dello strato corneo e lo strato sottostante, chiamato epidermide vitale, ed è il luogo dove sono presenti le cellule vitali quali cheratinociti e melanociti. Le prime permettono la sintesi di cheratina, utilizzata nella



formazione di alcuni tessuti viventi, mentre le seconde sono cellule che producono melanina, responsabile della colorazione della cute.

Sotto l'epidermide si trova il derma, avente uno spessore tra 0,3 mm e 5 mm. Esso è costituito da uno strato di collagene che dona elasticità alla pelle, ghiandole sudoripare, follicoli peliferi, una rete di capillari, vasi linfatici e terminazioni nervose [4].

Infine, l'ipoderma o strato sottocutaneo è il tessuto sottocutaneo più profondo ed è costituito da adipociti e da tralci fibroconnettivali [5].

Un impiego efficace e sicuro degli agenti topici richiede, pertanto, la conoscenza delle variabili fisiche e fisiologiche coinvolte nei meccanismi di interazione tra cute e farmaco, che ne influenzano l'assorbimento.

Bisogna ricordare, inoltre, che il passaggio di una sostanza attraverso la cute può avvenire anche attraverso gli annessi ghiandolari e le ghiandole sudoripare o attraverso la via intercellulare e/o trans-cellulare (via trans-epidermica). Va sottolineato come anche alcuni fattori correlati al paziente e alle sue specifiche caratteristiche possono influenzare l'assorbimento. Ad esempio, nel bambino si assiste a un'aumentata capacità d'assorbimento poiché lo strato corneo è molto più sottile e idratato rispetto all'adulto, mentre nell'anziano l'assorbimento è generalmente ridotto, sia per lo scarso turnover dello strato corneo sia per il maggiore spessore.

Anche la sede anatomica può influenzare il livello di assorbimento: infatti lo spessore dello strato corneo varia nelle diverse aree del corpo ed è massimo a livello palmo-plantare, medio in tutto il corpo e minimo a livello scrotale.

Infine, anche lo stato d'idratazione della cute riveste molta importanza poiché una maggiore idratazione cutanea corrisponde a un aumento della diffusione [5].

2.4 Metodi di somministrazione

La scelta su come somministrare un farmaco dipende principalmente dal bersaglio che si deve andare a colpire con quel determinato principio attivo; ad esempio, in presenza di una micosi cutanea o di una forma allergica della cute si andrà a scegliere la via di somministrazione transcutanea o topica.

La somministrazione dei convenzionali drug delivery avviene per:

- via enterale, comprendendo la via orale, la via rettale e la via sublinguale.
- via parentale (o per iniezione), quali i metodi di iniezione endovenosa, endoarteriosa e intramuscolare;
- per inalazione, ad esempio mediante aerosol;
- per via topica [6] [7].

La via orale (attraverso la bocca) è la via più familiare per la somministrazione del farmaco oltre ad essere la meno invasiva. Purtroppo ha problematiche relative all'assorbimento del principio attivo e la possibilità di subire reazioni chimiche a contatto con altre sostanze corporee.

Un'altra tipologia di somministrazione è quella di indirizzare i farmaci direttamente nel corpo tramite l'iniezione, percorso anche noto come somministrazione parenterale di farmaci, col conseguente vantaggio di aumentare la biodisponibilità del farmaco.

Il metodo per inalazione, invece, è il più efficace per somministrare farmaci localmente ai polmoni ed è ampiamente utilizzato per il trattamento respiratorio per malattie come asma e ostruzione cronica.

Infine un'altra via preferita di somministrazione del farmaco è quella topica. Le vie topiche prevedono il contatto diretto del farmaco con il sito di azione, frequentemente la cute o le mucose, con minimo assorbimento da parte dell'organismo. Questi sistemi sono progettati per permettere un adeguato dosaggio locale del farmaco [7]. Quest'ultima via è stata approfondita nel successivo paragrafo.

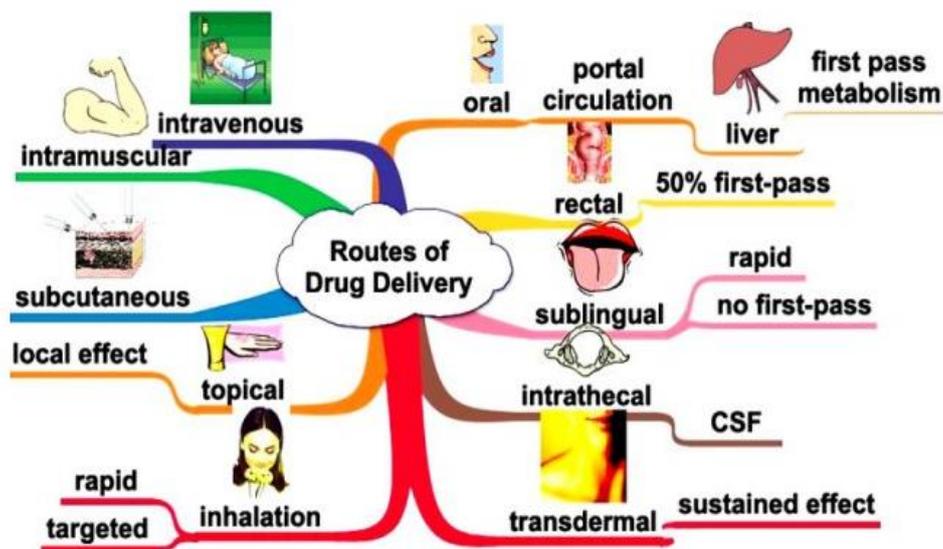


Figura 2.4 Metodi di somministrazione dei farmaci [6].

2.5 Vantaggi e svantaggi del rilascio di farmaco per via topica

Il rilascio per via topica, come precedentemente detto, è un metodo in cui la formulazione contenente il principio attivo viene applicata a una superficie come la cute, il naso o gli occhi [8]. I vantaggi di questo metodo sono:

- Somministrazione indolore e non invasiva;
- La possibilità di evitare le fluttuazioni del livello di farmaco presente nel sangue;
- Minore tossicità a livello sistemico;
- In caso di tossicità, il sistema di rilascio essendo applicato esternamente può essere facilmente rimosso;
- La potenzialità di evitare il meccanismo epatico e gastrointestinale permettendo di avere una quantità di farmaco maggiore in corrispondenza del sito di azione;
- La capacità di diminuire il quantitativo di farmaco da introdurre nel corpo per raggiungere l'effetto terapeutico;
- Maggiore disponibilità del farmaco nel target (sito di azione);
- Maggiore risposta fisiologica e farmacologica del paziente;
- Economicità dei sistemi se comparati con altre terapie su base mensile.

Sebbene i sistemi di somministrazione di farmaco godono di molti vantaggi ci sono anche alcune limitazioni:

- Non tutti i farmaci sono adatti per DDS, ad esempio quelli aventi alto peso molecolare (> 400 Da);
- Irritazione della cute dovuta al farmaco o all'eccipiente;
-
- Possibili reazioni allergiche;
- Denaturazione del farmaco a contatto con gli strati della pelle [7][9].

2.6 Tecnologie per applicazioni topiche

Differenti carrier sono stati proposti nel tentativo di favorire il trasporto di principi attivi attraverso la pelle, gli occhi o il naso, incrementando l'effetto terapeutico, permettendo un rilascio controllato del farmaco e, in taluni casi, riducendo la tossicità [10]. Di seguito verranno mostrati diverse tipologie di sistemi per il rilascio del principio attivo.

2.6.1 Microemulsioni

Le microemulsioni sono sistemi dispersi aventi goccioline di taglia compresa tra 10 e 100 nm e senza tendenza a coalescere [9]. Sono costituiti da due fasi liquide immiscibili tra loro grazie all'utilizzo di surfattanti e co-surfattanti che rendono quasi nulla la tensione interfacciale. I surfattanti costituiti da una testa idrofila e una coda idrofoba, riescono a interpersi tra la fase acquosa e quella oleosa, rendendo minima la tensione interfacciale e stabilizzando quindi il sistema. Le microemulsioni sono stabili nel tempo, hanno una bassa viscosità e isotropia ottica (perché le goccioline della fase dispersa, di dimensioni colloidali da 1 nm a 1 micrometro, non permettono la rifrazione della luce) [11]. Inoltre, l'elevata capacità di solubilità per farmaci idrofili, la capacità di incrementare l'attività chimica dell'API nel carrier e l'insensibilità alle variazioni di temperatura ne permettono l'utilizzo in ambito farmaceutico [12].

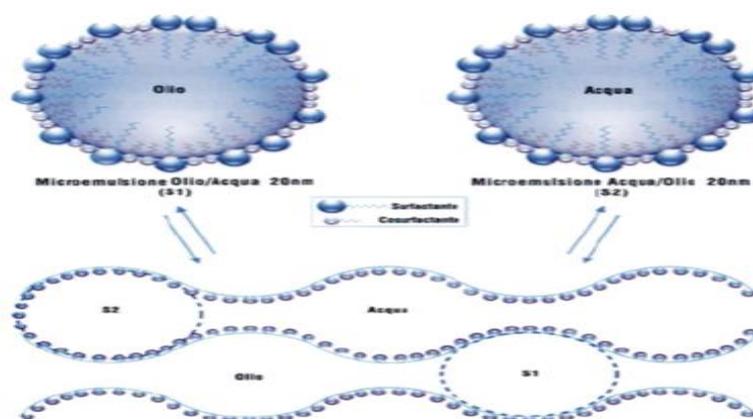


Figura 2.5 Microemulsione [13].

2.6.2 Nanoemulsioni

Le nanoemulsioni sono sistemi isotropici bifasici che si differenziano dalle microemulsioni dalle dimensioni nanometriche. Esse sono caratterizzate da due liquidi immiscibili e stabilizzate da un tensioattivo. La viscoelasticità, le proprietà ottiche, la non tossicità e non irritabilità, tipiche delle nanoemulsioni, hanno permesso uno sviluppo di questi sistemi per funzioni di drug delivery come dimostrano gli articoli di Singh e al. [14] e di Nastiti e al. [11].

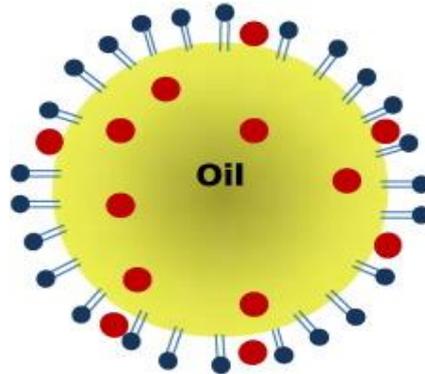


Figura 2.6 Nanoemulsioni [15].

2.6.3 Liposomi

I liposomi sono strutture vescicolari sferiche costituiti di lipidi che hanno la capacità di incapsulare soluzioni acquose e composti idrofobici. I liposomi sono bistrati lipidici con diametri che vanno dalla scala nanometrica a quella micrometrica e a differenza di altre tipologie di carrier, sono realizzati con materiali naturali e possono essere facilmente sintetizzati in laboratorio. La struttura permette il trasporto sia di molecole idrofobiche (tra i 2 strati lipidici) sia idrofile (nella parte centrale in cui è presente la soluzione acquosa) con la conseguente possibilità di poter applicare questi sistemi per poter somministrare un maggior numero di farmaci. Inoltre, essendo i liposomi strutture naturali, è maggiore la biocompatibilità con il corpo umano e/o animale e la tossicità è nulla [16] [17].

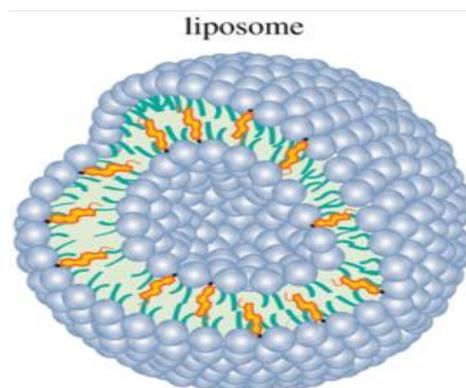


Figura 2.7 Liposomi [16].

2.6.4 Dendrimeri

I dendrimeri sono macromolecole altamente ramificate e monodisperse con morfologia ben definita e un'architettura di dimensioni nanometriche. Vengono preparate mediante procedure sintetiche a più fasi. Ogni parte strutturale del dendrimero deve essere scelto accuratamente poiché influisce in modo diverso sulle caratteristiche chimico-fisiche finali.

Sono costituite da un nucleo centrale, unità ramificate e gruppi funzionali di superficie. La funzionalizzazione dei gruppi superficiali si è dimostrata una strategia fruttuosa per la preparazione di materiali diversificati, compresi i sistemi per il rilascio di farmaci [18]. L'incapsulamento o la coniugazione di molecole bioattive in questi dendrimeri funzionali possono ridurre la loro tossicità, migliorare la loro solubilità e l'effetto terapeutico [9]. Inoltre, appropriati sistemi di somministrazione di farmaci basati su dendrimeri possono consentire il rilascio controllato o attivato e la consegna specifica di molecole bioattive nel tessuto malato o danneggiato.

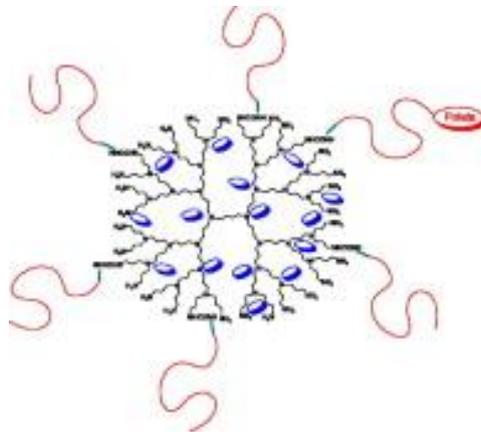


Figura 2.8 Dendrimeri [19].

2.6.5 Nanoparticelle lipidiche

Le nanoparticelle lipidiche solide (SLN) sono state sviluppate negli anni '90 come un carrier alternativo per i sistemi drug delivery [20][21]. Le nanoparticelle solide lipidiche sono supporti colloidali formati da una matrice lipidica, la quale è biodegradabile e ben tollerata dal nostro organismo. Sono sistemi di trasporto solidi a temperatura ambiente e del corpo ed esempi tipici sono il tricaprino, la tripalmitina e la trilaurina [22]. Le SLN sono usate per trasportare e consegnare principi attivi idrofilici e/o idrofobici, macromolecole, proteine e geni. Le nanoparticelle solide lipidiche possono trasportare il farmaco o mediante soluzione solida o mediante core shell-model, come rappresentato in figura 2.9. La scelta del modello dipende dal tipo di applicazione.

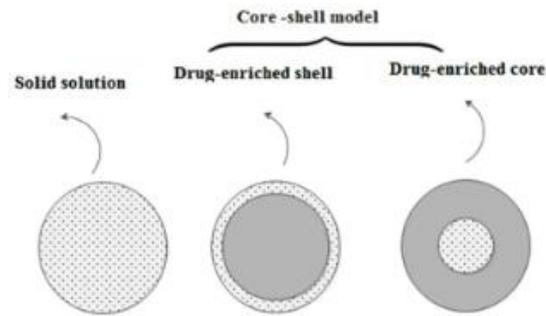


Figura 2.9 Nanoparticelle lipidiche solide [22].

I vantaggi delle nanoparticelle solide lipidiche sono la loro biodegradabilità, l'opportunità di controllare il rilascio del farmaco grazie alla presenza della matrice lipidica, la possibilità di evitare l'uso di solventi durante la preparazione al fine di ridurre la tossicità e l'alta stabilità durante applicazione in vivo rispetto a molti carrier. Tuttavia, hanno anche degli svantaggi quali: la bassa capacità di carico dei farmaci dovuta alla loro struttura cristallina, modifica dei profili di rilascio, la taglia delle nanoparticelle che talvolta sono molto grandi da non poter raggiungere la dimensione sufficiente per evitare che il sistema immunitario li possa considerare innocue [9] [22].

2.6.6 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono sistemi colloidali con dimensioni comprese tra 10 e 1000 nm, preparati mediante l'utilizzo di un materiale polimerico che sia biocompatibile e biodegradabile, ad esempio PLA (acido polilattico) o PCL (policaprolattone), e un agente terapeutico, in ambito medico, che può essere dissolto, intrappolato, incapsulato o attaccato alla matrice nanoparticellare polimerica. I materiali polimerici garantiscono rispetto ad altri materiali una maggiore stabilità, consentono un elevato carico dei farmaci, forniscono il controllo sulla cinetica del rilascio del farmaco e possono essere facilmente modificati [9] [23].

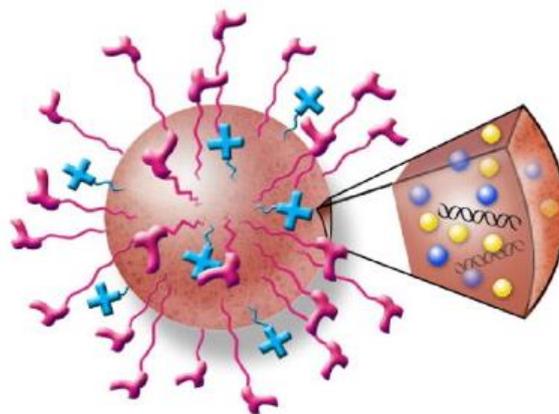


Figura 2.10 Nanoparticella polimerica [23].



2.6.7 Nanoparticelle inorganiche

Le nanoparticelle inorganiche sono state recentemente oggetto di numerosi studi per applicazioni nanomediche e somministrazione di farmaci grazie alle loro proprietà fisiche, chimiche, biologiche e superficiali. Le nanoparticelle inorganiche più utilizzate sono i quantum dots (QDs), quelle di Argento, titania, ossido di zinco e silici.

Un quantum dot è una nanostruttura formata da un'inclusione di un materiale semiconduttore, con una certa banda proibita e con dimensioni tipiche comparabili alla lunghezza d'onda di De Broglie, all'interno di un altro semiconduttore con banda proibita più grande. Sono molto studiati soprattutto per applicazioni elettroniche e ottiche date le elevate proprietà. Inoltre, si ha la possibilità di funzionalizzare la superficie e bioconformarla alle molecole ospiti permettendo lo sviluppo dei QDs in diagnostica medica, specialmente per prevedere cancro o per il monitoraggio di farmaci [24].

Le nanoparticelle di argento (Ag) sono eccezionali agenti antimicrobici e sono ampiamente sfruttati nel trattamento di infezioni batteriche riscontrate nelle ustioni, ferite e ulcere croniche. Ciò a seguito della loro area superficiale estremamente grande e piccoli diametri dei pori, generalmente inferiori a 100 nm, che forniscono un migliore contatto con i microrganismi. Per di più, hanno il vantaggio di offrire un rilascio controllato e prolungato di argento nanocristallino nell'area della ferita. Questa forma nanocristallina consente cambi della medicazione meno frequenti, riducendo in tal modo il rischio di infezione nosocomiale, il costo delle cure ed evita che il paziente venga ripetutamente sottoposto a terapie.

Le nanoparticelle di ossidi di zinco e titanio sono attualmente molto utilizzati per realizzare creme solari avendo la potenzialità di assorbire le radiazioni UV senza apportare a chi la applica problemi di irritazione della cute, allergie o altre problematiche. Un'altra caratteristica è la loro trasparenza e quindi la proprietà di essere esteticamente accettabili.

L'ossido di zinco ha inoltre proprietà antibatteriche, antifungine, anti-infiammatorie, antitumorali e per il trattamento di diabete come riportato nell'articolo Martínez-Carmona et al. [25].

Nel capitolo successivo, verranno descritti le proprietà e le applicazioni delle silici in quanto sono i supporti utilizzati durante il lavoro di tesi.



3. PROPRIETA' E APPLICAZIONI DELLE SILICI MESOPOROSE

3.1 Le silici mesoporose

A causa della mancanza di specificità e solubilità delle molecole del farmaco, i pazienti devono assumerne alte dosi per raggiungere gli effetti terapeutici desiderati. Per risolvere questi problemi, ci sono vari carrier che possono essere utilizzati, come visto nel capitolo uno. Tra di essi i materiali a base silice che, oggi, sono studiati come candidati promettenti in grado di superare i problemi di cui sopra parlato e produrre effetti in modo controllabile e sostenibile. La silice, infatti, è riconosciuta come sicura dalla FDA (Food and Drug Administration) e pertanto è un ottimo materiale utilizzabile per applicazioni biomediche [26].

La silice, o ossido di silicio (SiO_2), è uno dei materiali più abbondanti presenti sulla crosta terrestre e può presentarsi sia in forma cristallina (quarzo, cristobalite, tridimite) che amorfa (colloidale, gel di silice). Tuttavia, la differenza tra le varie forme dipende dai legami tra i tetraedri SiO_4 e non dai tetraedri stessi che sono uguali in tutte le tipologie di silici esistenti ed hanno la caratteristica di essere molto rigidi e difficili da rompere perché vincolati dall'ibridizzazione sp^3 .

Le silici mesoporose sono forme nanometriche sviluppatesi a partire dagli anni '90 con notevole successo in diversi ambiti date le ottime proprietà fisiche, chimiche, superficiali, che li differenziano dagli stessi materiali con dimensioni maggiori.

Esse sono composti inorganici sintetizzati in presenza di surfattanti e utilizzati come template per la condensazione di specie siliciche. Temperatura, pressione, pH e durata della sintesi influenzano il prodotto finale ed in particolare le caratteristiche quali la struttura porosa e la morfologia [27].

Le proprietà che ne fa di loro dei materiali promettenti per drug delivery system sono:

- La loro elevata area superficiale specifica, data la possibilità di avere silici con aree maggiori di $1000 \text{ m}^2/\text{g}$;
- La geometria e le dimensioni dei pori (tra 2 e 50 nm);
- Un alto volume dei pori, circa $1 \text{ cm}^3/\text{g}$;
- la semplicità con cui è possibile controllare la morfologia delle particelle, variandone sia le dimensioni che le forme o la funzionalizzazione, agendo direttamente sul processo di sintesi [28].
- Una superficie contenente una alta quantità di silanoli;
- Ottima stabilità termica;
- Alta stabilità meccanica grazie ai forti legami Si-O che inibiscono il bisogno di qualsiasi altro elemento stabilizzante esterno durante la sintesi;
- Nulla tossicità a contatto con i sistemi cellulari.

3.2 Tipologie di silici mesoporose

Le principali famiglie di silici mesoporose sono: SBA (Santa Barbara Amorphous), M41S (Mobil Crystalline of materials), KIT (Korea Advanced Institute of Science and Technology),

MSU (Michigan State University) HMS (Hexagonal Mesoporous Silica), PCH (Porous Clay Heterostructure) e FSM (Folded-sheet Mesoporous Material) [29].

3.3 MCM-41

La tipologia di silice più utilizzata è l'M41S sviluppatasi nel 1992 e sintetizzata usando tensioattivi di alchilammonio e silicato di sodio. Le silici mesoporose M41S hanno un ordine ben definito e una distribuzione media dei pori fra 1.5 e 10 nm con un'area superficiale specifica di circa 800/1500 m²/g. Variando le condizioni di sintesi si possono ottenere differenti strutture mesofasiche, rappresentate in figura 2.1: una fase esagonale (MCM-41), una fase cubica (MCM-48) o una fase lamellare (MCM-50).

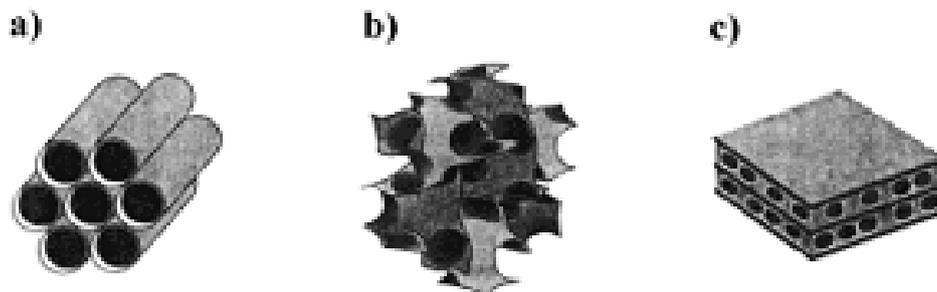


Figura 3.1 Le diverse fasi mesoporose di MCM: a) esagonale, b) cubica e c) lamellare [30].

Per la sintesi della silice mesoporosa MCM-41 si utilizza un agente templante e una sorgente di silice che essendo talvolta instabile per semplici variazioni del pH può portare a significativi cambiamenti della struttura e condizioni di instabilità. Per evitare questo, è necessario porre particolare attenzione alle condizioni di sintesi ed utilizzare opportuni modificatori. La sintesi proposta e perfezionata dai ricercatori della Mobil prevede l'utilizzo di un sale di ammina quaternaria, ad esempio cetiltrimetilammonio bromuro, in soluzione acquosa, quale agente templante, di sodio silicato (TEOS ad esempio) come sorgente di silice, e di un opportuno modificatore di pH, ad esempio acido solforico, fino al raggiungimento di valori intorno a 10.5-11. Successivamente, si effettua un trattamento idrotermale condotto in un'autoclave a 100/150 °C per diverse ore, per ottenere la fase esagonale, favorendo la riorganizzazione micellare e la polimerizzazione del silicato di sodio. In seguito, è necessario rimuovere, per calcinazione in aria a circa 500 °C per 6 ore, l'ammina (agente templante) perché potrebbe contribuire a modificazioni della struttura per via delle interazioni che instaura con la sorgente di silice. In questo modo di forma la fase esagonale viene privata dell'agente templante e resa stabile. La formazione di una fase esagonale regolare è influenzata da molteplici fattori tra cui:

- il rapporto agente templante/silice (con un rapporto minore di 1.0 si ottiene MCM-41);
- la temperatura a cui si effettua il trattamento idrotermale;
- la lunghezza della catena alchilica dell'ammina;
- la concentrazione nella soluzione di tensioattivo, come si vede in figura 3.2;
- il tempo di trattamento idrotermale [29] [30] [31].

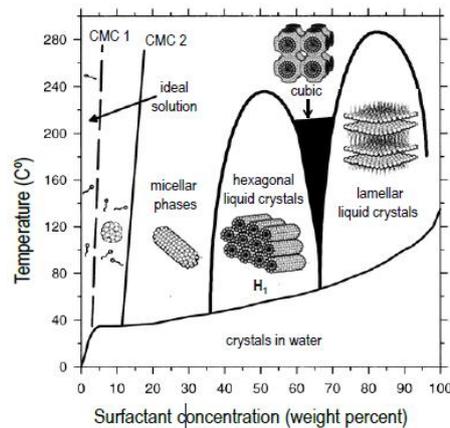


Figura 3.2 Diagramma di fase schematico per il tensioattivo cetiltrimetilammonio bromuro in acqua in funzione della temperatura [32].

Nella figura successiva vi è una rappresentazione del processo di sintesi dell'MCM-41:

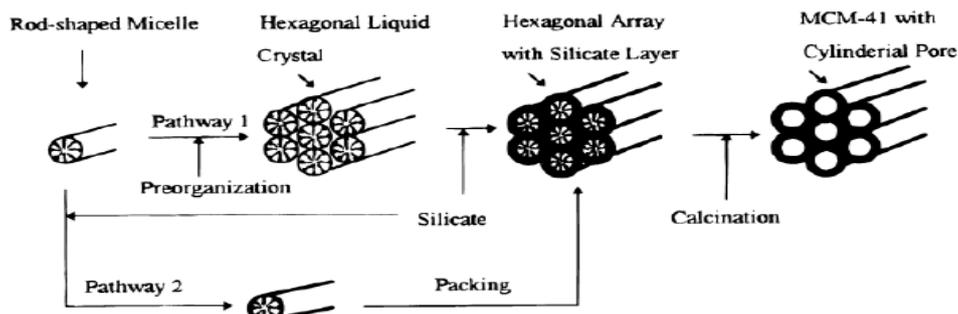


Figura 3.3 Processo di sintesi dell' MCM-41 [30].

3.4 SYLOID®

Le silici Syloid® sono gel di silice mesoporose, amorphe e micronizzate che vengono utilizzati come eccipienti in molte formulazioni farmaceutiche, a causa della loro morfologia unica. Sotto questa tipologia di silici mesoporose si distinguono le seguenti categorie:

- Syloid® FP silica
- Syloid® 3D silica
- Syloid® XDP silica
- SilSol™ 6 Silica

La capacità di adsorbimento combinata ad un'alta porosità, una bassa dimensione delle particelle e un'ampia area superficiale consentono loro di fornire diversi vantaggi migliorandone l'efficacia del prodotto finale tale da poter essere utilizzati per applicazioni alimentari, industriali, cosmetiche e, come detto sopra, farmaceutiche. Sono preparate sinteticamente mediante una reazione chimica di silicato di sodio e acido solforico. Le syloid hanno un'area superficiale maggiore di 500 m²/g e sono insapore e inodore [33]. Una rappresentazione di questa tipologia di silici è rappresentata in figura 3.4.

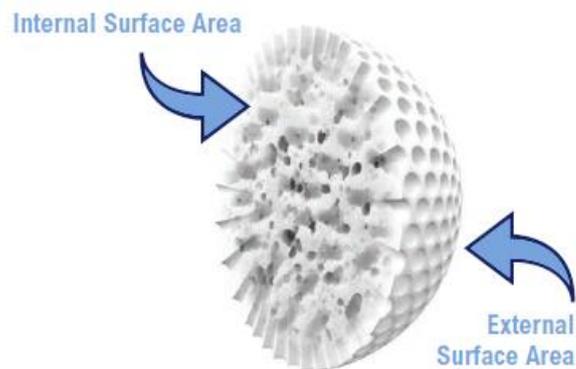


Figura 3.4 Rappresentazione di una tipica silice Syloid.

Le varie tipologie di silice SYLOID® sono progettati per fornire una ampia gamma di applicazioni avendo la possibilità di agire come stabilizzante efficace, protettivo, disidratante, antiaderente e/o antiagglomerante. Inoltre, sono un eccellente carrier per la conversione di oli, droghe oleose e farmaci in soluzioni idrofobe. Possono essere utilizzati come assorbenti in tecniche come la dispersione solida, semi-solidi e in tecnologie basate su lipidi come i sistemi di rilascio di farmaci autoemulsionanti (SEDDS) [33].

3.5 L'influenza delle proprietà strutturali sulle performance delle silici mesoporose

Di seguito verranno attenzionate le proprietà strutturali delle silici mesoporose che, come già accennato nel paragrafo precedente, influiscono sulle performance.

3.5.1 Taglia dei pori

La taglia dei pori dei materiali mesoporosi determina la dimensione massima delle molecole che possono essere adsorbite. Comunemente, un diametro dei pori appena più grande del diametro delle molecole è abbastanza per favorire l'adsorbimento. Una delle più importanti caratteristiche dei materiali mesoporosi è la possibilità di poter ottenere durante la sintesi dei diametri dei pori che vanno dall'unità di nanometro fino a differenti decine di nm grazie alla scelta adeguata della lunghezza delle catene del surfattante. Questo garantisce quindi la costruzione di un carrier con dimensioni su misura per ospitare una molecola. Tuttavia, quando i materiali mesoporosi sono studiati per applicazioni di drug delivery system, la taglia dei pori controlla anche la velocità di rilascio del farmaco. Sistemi con pori più grandi, come dimostrato dagli studi di Lopez e al. [34], tendono a rilasciare più velocemente il farmaco. Tuttavia bisogna considerare anche la connettività dei pori, la geometria e la modalità di degradazione della matrice poiché sono altri parametri che influiscono fortemente sulla cinetica di rilascio. Perfino i trattamenti termici subiti dalla struttura porosa condizionano la stabilità della struttura dei pori e ne influenzano lo spessore delle pareti variandone conseguentemente la cinetica di rilascio. In generale, strutture a gabbia (o "cagelike") o porose sembrano essere eccellenti matrici per il rilascio del farmaco in un tempo lungo.



3.5.2 Area superficiale

La superficie è uno dei più importanti fattori per stabilire la quantità di farmaco che la silice può riuscire ad adsorbire in quanto è il luogo principale in cui avviene l'interazione tra il carrier e la molecola [35]. E' conveniente avere una area superficiale specifica elevata per riuscire a garantire un caricamento della molecola o macromolecola maggiore e quindi per i sistemi di drug delivery una maggiore capacità di fornire agente terapeutico al nostro corpo. Tuttavia bisogna sempre considerare il quantitativo massimo che si può caricare evitando effetti di tossicità. In generale, le nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN) convenzionali possono caricare una dose di farmaco terapeutico di 200-300 mg (massimo di circa 600 mg) di droga su 1 g di silice. Però, nelle MSN cave la struttura del guscio è in grado di raggiungere un carico di principio attivo molto alto perché offre più spazio per caricare i farmaci a causa dei nuclei cavi, tipicamente > 1 g di farmaco / 1 g di silice [31].

3.5.3 Volume dei pori

L'area superficiale e la taglia dei pori sono fattori critici per l'adsorbimento dei farmaci. Mentre l'interazione farmaco-silice è un fenomeno superficiale, le interazioni deboli farmaco-farmaco, in condizioni di carico, potrebbero portare al riempimento dei pori. In questo caso, il volume dei pori è un fattore chiave nel determinare la quantità di principio attivo adsorbito. Recentemente è stato riportato che diversi carichi di farmaco in materiali mesoporosi ordinati portano ad un aumento del riempimento dei mesopori. Questo fenomeno è stato attribuito all'aumento delle interazioni intermolecolari all'interno dei pori, per cui i maggiori volumi dei pori possono comportare un maggiore carico di droga [36] [37].

3.5.4 Funzionalizzazione dei mesopori

I farmaci possono essere introdotti all'interno dei pori di un nanocarrier a base silice attraverso adsorbimento da soluzione, incipient wetness impregnation, il metodo di CO₂ supercritica o il metodo di fusione, che consiste nel riscaldamento sia del supporto che del principio attivo al di sopra della temperatura di fusione del farmaco. Indipendentemente dal metodo di caricamento selezionato, lo scopo è quello di immobilizzare il farmaco sulla superficie attraverso più legami non covalenti, principalmente legami idrogeno e interazioni di van der Waals. Nel caso delle silici mesoporose si ha un'alta densità di silanoli, i quali possono essere usati per graffiare il farmaco sul supporto o per ottenere superfici funzionalizzate con gruppi chimici in grado di legarsi alle molecole del farmaco attraverso legami ad idrogeno o gruppi esteri. Infatti, la polarità del gruppo ossidrilico dei silanoli presenti in superficie spiegano il carattere donatore degli idrogeni, i quali possono formare legami idrogeno con atomi accettori quali N e O. Tuttavia anche l'ossigeno dei silanoli può agire da accettore di atomi di H [38]. Inoltre, le interazioni di dispersione (tipo di London) sembrano contribuire maggiormente alla stratificazione del farmaco sulla superficie. In uno studio riportato da Gignone et al. [39], si sono osservati alcuni tipi di legami idrogeno tra il clotrimazolo e una silice MSU-H. Da studi sperimentali e di simulazione i risultati ottenuti sono stati la formazione dei seguenti legami ad idrogeno: due tra un atomo di azoto (N) e due silanoli, uno tra l'altro N dell'anello e un silanolo già coinvolto in un legame H ed infine uno del silanolo col gruppo clorofenile, come rappresentato nella figura 3.5 [38].

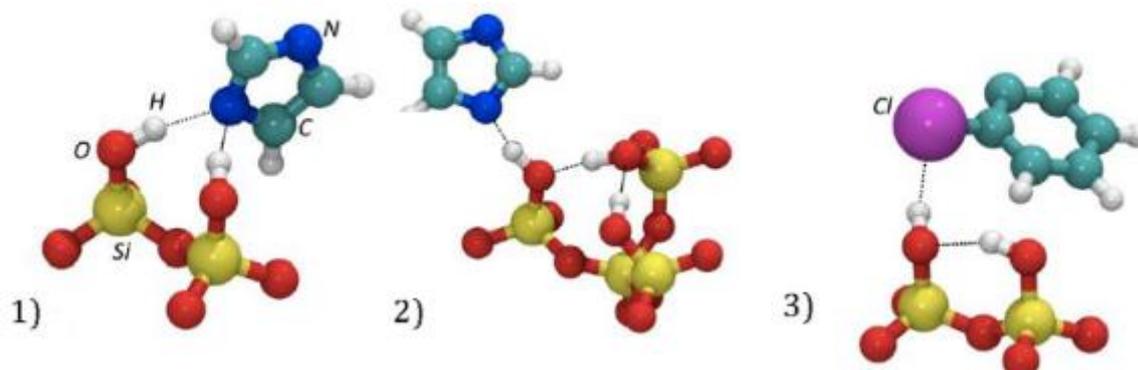


Figura 3.5 Possibili interazioni del clotrimazolo con una silice MSU-H [38].

Un altro dei casi studiati è l'adsorbimento di Ibuprofene su matrici a base di silice mesoporosa. Il principio attivo è presente nel carrier mediante una interazione tra il suo gruppo carbossilico e il silanolo presente sulla superficie del supporto. Tuttavia, non è presente solo questo legame, infatti, si hanno anche interazioni tra le molecole di farmaco che portano alla formazione del dimero di ibuprofene. Questo dimero si forma a seguito di un legame idrogeno intermolecolare attraverso i gruppi carbossilici delle due molecole del principio attivo. Babonneau et al. [40] da studi NMR dimostrarono che le molecole di farmaco mostrano un'elevata mobilità, che è incompatibile con il comportamento delle molecole collegate alla superficie dei pori della silice mesoporosa. Al contrario, questa mobilità concorda con i dimeri fisisorbiti sulla superficie. Questa prova è anche supportata da analisi NMR, sempre condotta da Babonneau et al. [40], i quali hanno rivelato che le molecole di ibuprofene sono legate alla superficie mediante interazioni tra i silanoli della silice e i dimeri del principio attivo.

Il legame dell'ibuprofene, o in generale dei principi attivi, è abbastanza diverso quando la superficie è funzionalizzata. In presenza di gruppi amminici, ad esempio, si ha interazione ionica tra i gruppi carbossilici dell'ibuprofene e i gruppi amminici funzionalizzati sulla matrice, consentendo il rilascio del farmaco controllato mediante questa interazione, come confermato da Song et al. [41].

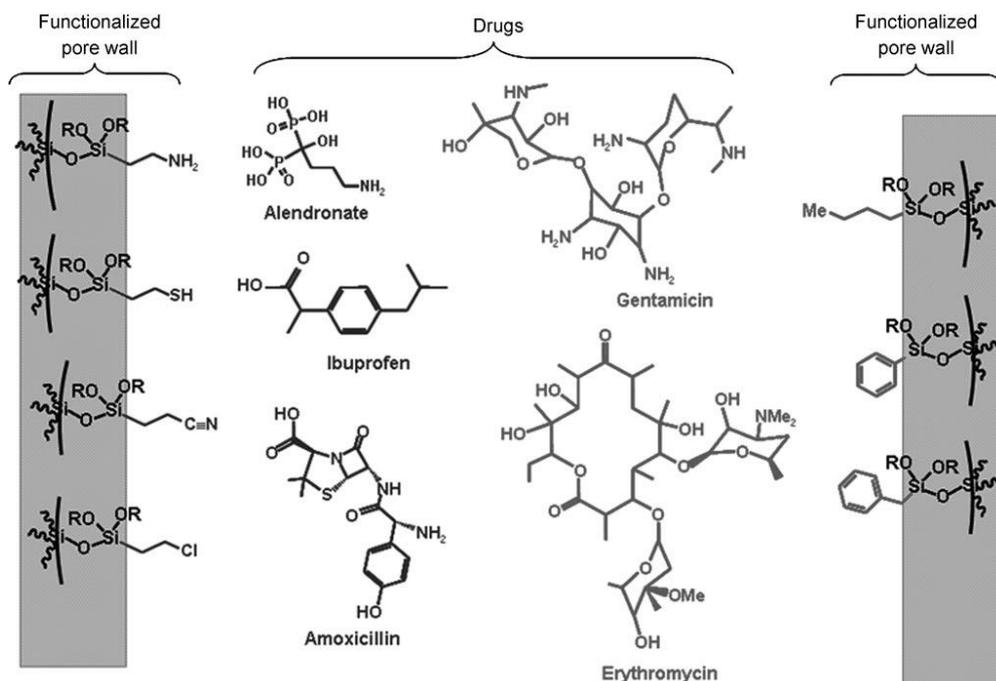


Figura 3.6 Funzionalizzazione delle silici mesoporose [36].

Ulteriori studi condotti recentemente hanno dimostrato che oltre l'effetto di confinamento, a temperatura ambiente la mobilità è molto elevata anche per effetto di uno scambio chimico che avviene tra protoni del gruppo $-COOH$ della molecola organica e i protoni delle molecole d'acqua presenti sulla superficie della silice per materiali ottenuti mediante impregnazione per via umida. Questo fenomeno implica una debole interazione tra la molecola di farmaco e la superficie di silice che è correlata al veloce profilo di rilascio di ibuprofene incapsulato osservato in vitro [42]. Questo è di primaria importanza perché permette di:

- aiutare a comprendere la cinetica a rilascio rapido di ibuprofene osservata in vitro. Infatti, l'interazione matrice-principio attivo e l'interazione farmaco-farmaco sono di minore intensità a causa dello scambio chimico con le molecole d'acqua presenti sulla superficie della silice portando ad una solubilizzazione più rapida rispetto all'ibuprofene cristallino e aumentando la sua biodisponibilità.
- Mostrare l'importanza delle molecole d'acqua sulla superficie della silice che spesso vengono trascurate. Infatti, nel caso di piccole molecole organiche incapsulate, l'interfaccia silice/farmaco è spesso descritta attraverso un'interazione diretta e rigida tra un gruppo $SiOH$ e un gruppo funzionale della molecola organica. Per quanto riguarda la presenza di molecole d'acqua, è difficile dichiarare la loro origine. Infatti, le silici mesoporose sono "attivate" (riscaldamento a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ nel vuoto per desorbire le molecole d'acqua) prima del processo di incapsulamento. Tuttavia, è possibile che la procedura non sia sufficiente per rimuovere tutte le molecole d'acqua, la silice riadsorba rapidamente le molecole d'acqua dall'atmosfera prima dell'incapsulamento oppure le molecole d'acqua residue sono presenti nella soluzione utilizzata per l'incapsulamento.

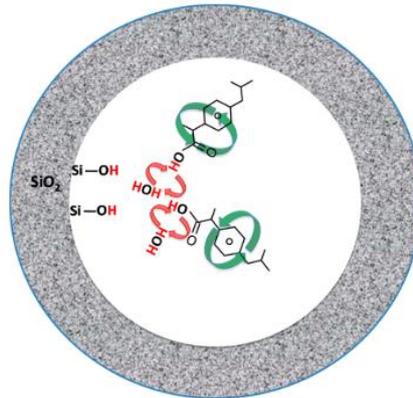


Figura 3.7 Rappresentazione schematica del comportamento dinamico di ibuprofene a temperatura ambiente all'interno dei mesopori di MCM-41. Le frecce circolari rosse rappresentano il rapido scambio chimico tra i protoni dei gruppi COOH e le molecole d'acqua. Le frecce verdi rappresentano il rapido riorientamento della molecola dovuto all'effetto di confinamento [42].

Una seconda strategia per il controllo efficace del rilascio del farmaco è la funzionalizzazione della superficie con specie idrofobiche. In questo caso, non sono necessarie elevate interazioni farmaco-superficie, ma il trasporto del principio attivo fuori dalla matrice è seriamente impedito in quanto il mezzo acquoso non penetra facilmente dentro i pori. Un esempio è il rilascio di eritromicina da SBA-15 funzionalizzato con ottiltrimetossisilano e octadeciltrimetossisilano. Le conseguenze sui mesoporosi sono una diminuzione della dimensione effettiva dei pori e una diminuzione della bagnabilità della superficie in presenza di soluzioni acquose. Tuttavia si può controllare efficacemente il tasso di rilascio di eritromicina che è di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quello dell' SBA-15 non funzionalizzata [36].

3.5.5 Fenomeno di amorfizzazione

Il fenomeno di amorfizzazione si riferisce al cambiamento di uno stato solido del principio attivo da cristallino ad amorfo quando viene intrappolato in uno spazio ristretto. Lo stato amorfo ha un livello di energia più elevato rispetto allo stato cristallino ed è considerato come termodinamicamente instabile (o metastabile). Questo può essere associato a un intervallo metastabile che può essere sfruttato per massimizzare la concentrazione del farmaco. Per questo motivo si cercano dei sistemi in grado di poter immagazzinare il principio attivo allo stato amorfo piuttosto che allo stato puro e cristallino. Ad esempio, sotto una certa dimensione critica dei pori, la cristallizzazione è improbabile dal momento che il contributo della superficie compensa energeticamente il ritorno allo stato di equilibrio tramite cristallizzazione.

Infatti, sotto alcune dimensioni dei pori d^* , nessuna cristallizzazione del farmaco si verifica sulla base dell'equazione mostrata sotto [38]:

$$d^* = \frac{4\sigma_{cl} T_m^\infty}{[(T_m^\infty - T)\Delta H_m \rho_c]}$$



Dove σ_{cl} è l'energia superficiale tra il cristallo e il fuso, ΔH_m il calore di fusione, T_m la temperatura di fusione del bulk e ρ_c la densità del cristallo [38].

Per semplicità, oggi è comunemente proposto che si osservi l'assenza di cristallizzazione in pori aventi dimensioni più piccole di 20 volte la dimensione della molecola. Questo fenomeno è di alto interesse farmaceutico così come la solubilità e la biodisponibilità. Ad esempio, Azaïs et al. [37] mediante analisi di Risonanza Magnetica Nucleare allo stato solido (NMR) hanno studiato il comportamento peculiare dell'ibuprofene adsorbito in mesopori di 3,5 nm e 11,6 nm. Osservarono come il principio attivo non era allo stato cristallino nei pori delle due silici. In generale, il farmaco era trovato amorfo in silici con dimensioni dei pori piccoli mentre le frazioni cristalline erano presenti in quelle con dimensione dei pori > 20 nm. Successivamente, ulteriori studi dimostrarono che, durante il rilascio di ibuprofene in soluzione acquosa, la dissoluzione è più rapida per i sistemi a base di silice mesoporosa aventi più grandi dimensioni dei pori. Tuttavia, in questi casi, la dissoluzione diminuiva dopo 15 minuti e l'API non era rilasciato totalmente molto probabilmente a causa della presenza della frazione cristallina [38].

Inoltre, è stato osservato come l'energia di interazione con la superficie è tanto più forte nei pori più piccoli limitandone la cristallizzazione. Al contrario,

nei pori più grandi, l'energia intermolecolare era più forte provocando un maggiore fenomeno di cristallizzazione. Tuttavia, la capacità di un principio attivo di amorfizzarsi varia in funzione della quantità presente. A parità di dimensioni del diametro medio di pori della silice mesoporosa MCM-41, maggiore è il quantitativo di farmaco con cui si effettua l'impregnazione del supporto maggiore è la possibilità di avere una fase di tipo cristallino. Talvolta possono coesistere fasi amorfiche e cristalline [43].

3.5.6 Effetto del tempo

Tutte le medicine sono associate alla data di scadenza che, se superata, diminuisce l'efficacia del principio attivo a causa di possibili trasformazioni fisiche o chimiche. Pertanto, lo studio dettagliato sulle interazioni farmaco / silice e sui fenomeni di amorfizzazione nel tempo sono fondamentali per garantire una maggiore durata del farmaco e migliorare l'interazione principio attivo/supporto al fine di ottenere dei sistemi ad alte performance.

Diversi studi hanno analizzato la stabilità delle formulazioni a base di silice mesoporosa per mesi. In un lavoro recente, Juère et al. [44] hanno osservato se nel tempo il resveratrolo (anti-ossidante) presente in una silice avesse registrato cambiamenti rispetto al suo stato amorfo iniziale. Il risultato è stato che il farmaco non cristallizzava. Altri studi di Wei et al. [45] si focalizzarono sul confronto nel tempo di una silice caricata con tre diversi carichi di esperidina, rispettivamente 28, 54 o 60% in peso. È stato confermato lo stato amorfo del farmaco per il 28% in peso di carico. Tuttavia, per il caricamento del 54%, dalla DSC si è notato un calore endotermico debole pertanto, il sovraccarico ha probabilmente portato alla deposizione di esperidina sulla superficie esterna dei materiali, impedendo l'effetto di confinamento. Come ci si può aspettare, queste osservazioni erano applicabili anche per il sistema con caricamento del 60% di esperidina, ma in questo caso, le frazioni cristalline del farmaco erano evidenti. In seguito, è stato osservato il rilascio del farmaco in mezzi acquosi concludendo che il carico più basso ha dato il massimo rilascio.

3.6 Applicazioni di silici mesoporose in campo biomedico

Il campo dove le silici mesoporose hanno e stanno riscuotendo maggiore successo è quello biomedico data l'elevata biocompatibilità con il corpo umano.

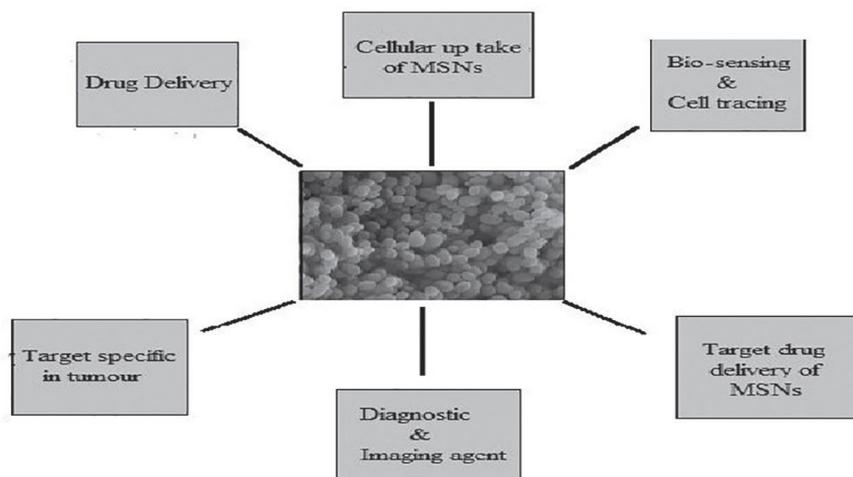


Figura 3.8 Applicazioni di silice mesoporose in vari campi biomedici [31].

Sönmez et al. [46] hanno studiato delle nanoparticelle di silici mesoporose in grado di immobilizzare l'insulina al fine di proteggere l'integrità della molecola dalla degradazione proteolitica che avviene nello stomaco e nella parte superiore dell'intestino tenue. Le nanoparticelle di silice mesoporosa sembrano essere degli ottimi candidati perché permettono di trasportare un alto quantitativo di insulina all'interno del corpo, rilasciare il principio attivo in modo controllato e mantenere livelli terapeutici ottimali per un periodo più lungo. Inoltre, la funzionalizzazione alla superficie delle MSN con glucosio ossidasi (GODx) e acido fenilboronico (PBA) permettono di regolare l'erogazione di insulina evitando il sovradosaggio che porta a ipoglicemia grave. Un ulteriore miglioramento di questi sistemi si ha con la modifica della superficie della silice con un rivestimento polimerico (chitosano, alginato, ecc.) che facilita l'interazione con il muco intestinale.

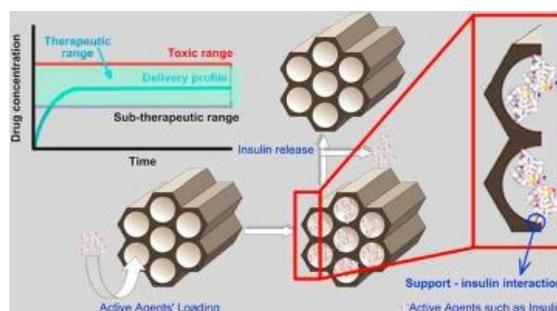


Figura 3.9 Sistema MSN-insulina [46].

Una ulteriore applicazione delle silici porose per la terapia del cancro sta emergendo come un nuovo interessante campo interdisciplinare che coinvolge la chimica, la medicina, la scienza

dei materiali, la biologia e la medicina. Zhong Luo et al. [47] nel loro studio utilizzarono un carrier di silice mesoporosa con innesco redox intracellulare (HMSNs) con specificità tumorale al fine di fornire un farmaco antitumorale (doxorubicina (DOX)) alle cellule tumorali bersaglio con alta efficienza terapeutica e ridotti effetti collaterali.

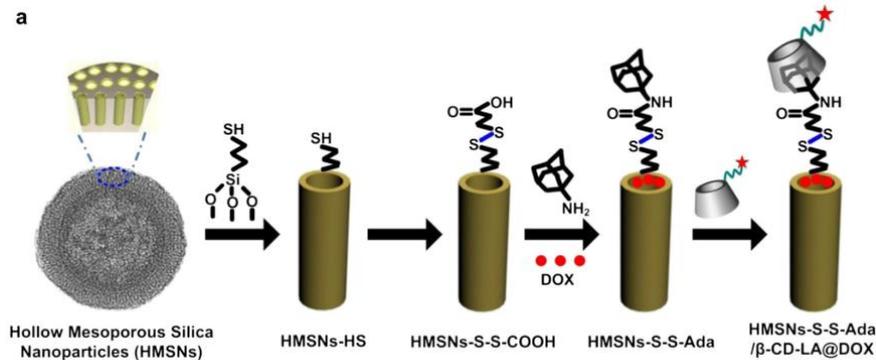


Figura 3.10 MSN con doxorubicina [47].

Anche per applicazioni di rigenerazione dei tessuti ossei lo sviluppo di sistemi a base silice ha apportato notevoli successi. Nanofibre di silice mesoporosa continua, prive di difetti, sono state fabbricate con successo e utilizzate per potenziali applicazioni ingegneristiche dei tessuti duri. Elevata area superficiale, rugosità e preassorbimento di nutrienti e mezzi di crescita hanno consentito una rapida adesione cellulare e proliferazione. Inoltre, la presenza di cellule vive negli scaffold dimostra le eccellenti prospettive di sviluppo per l'ingegneria dei tessuti ossei [48]. Ulteriori studi in questo campo sono stati quelli effettuati da Ezazi et al. [49], in cui si svilupparono scaffold ossei composti da idrossiapatite (HAp), gelatina e silice mesoporosa. Questi materiali sono stati accoppiati con il polimero conduttivo polipirrolo (PPy) per creare un nuovo ponteggio osseo per la medicina rigenerativa.

Il settore in cui la ricerca su silici mesoporose si sta focalizzando maggiormente è quello del drug delivery system. In letteratura sono presenti innumerevoli studi di carrier mesoporosi a base silice contenenti principi attivi e da qualche anno la crescita è aumentata esponenzialmente data la possibilità di poter introdurre nel corpo anche farmaci scarsamente solubili in acqua. Una dei precursori di questa branca della biomedica fu Vallet-Regi, che ha mostrato la capacità di adsorbimento e rilascio dei farmaci, come l'ibuprofene, da parte delle silici MCM-41, i tempi di rilascio e le quantità [35].

Negli ultimi anni ci si è concentrati sullo studio del rilascio di farmaci mediante sistemi silici mesoporosi per applicazioni topiche. In questo caso, il principio attivo non deve entrare nel sistema circolatorio, ma deve agire nel punto in cui il sistema viene applicato o in prossimità. Generalmente questi sistemi contengono molecole che abbiano funzione antifungina, come il clotrimazolo [39] [50], anti-infiammatoria, quali idrocortisone o altri corticosteroidi [34] [42] [51], o antibiotici, quali l'Amikacina [29].



POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali



4. PRINCIPI ATTIVI UTILIZZATI

Quasi la totalità dei farmaci utilizzati per applicazioni mediche ed in particolare topiche sono considerati mediante una formulazione biofarmaceutica di classe II, cioè altamente permeabili ma scarsamente solubili, oppure di classe IV, ovvero, scarsamente permeabili e solubili. I principi attivi utilizzati durante l'attività di tesi sono l'idrocortisone e il clotrimazolo appartenenti alla seconda classe della classificazione farmaceutica [52].

4.1 Idrocortisone

I corticosteroidi sono tra i farmaci più utilizzati in medicina e da più di 50 anni rappresentano la pietra miliare nella terapia dermatologica. Grazie alla loro potente attività antinfiammatoria trovano numerose indicazioni cliniche per il trattamento di svariate condizioni e patologie. Esistono un numero elevato di composti corticosteroidi, tra i quali l'idrocortisone (o cortisolo). L'idrocortisone è un glucocorticoide simile a un ormone naturale prodotto dalle ghiandole surrenali, più precisamente dalla zona fascicolata della loro porzione corticale. Viene usato per sostituire questa sostanza chimica quando il corpo non ne produce abbastanza con una azione anche più leggera rispetto al vero e proprio cortisone, tale da poter essere utilizzato anche in età pediatrica.

Il maggiore utilizzo di questo farmaco si ha per scopi quali: il trattamento di disturbi della pelle come eczemi, la riduzione della risposta immunitaria della pelle responsabile della reazione allergica, oppure anche sulla pelle irritata successivamente a punture di insetti, irritazioni da raggi UV solari, eritemi, scottature di lieve entità, orticaria, per placare prurito e arrossamento [53] e altre condizioni patologiche di insufficienza surrenalica [54]. Inoltre, può trattare alcune forme di artrite e curare disturbi dei reni, degli occhi, della tiroide, dell'intestino (ad es. colite) e dell'asma. Infine, viene anche usato per trattare alcuni tipi di cancro. Diversi studi hanno infatti osservato che esso in combinazione con l'eparina può controllare la crescita di gliomi maligni [55].

Tuttavia, questo farmaco non ha solo risvolti positivi, ma anche effetti collaterali che talvolta possono essere facilmente evitabili se ci si attiene ad un corretto utilizzo. Il principale e più temibile è l'atrofia cutanea, che può essere persistente, inoltre si possono avere follicoliti, eruzioni acneiformi, mal di stomaco, aumento della crescita dei peli, faccia gonfia, gambe o caviglie gonfie, problemi di visione e debolezza muscolare, malfunzionamento del sistema riproduttivo [56] e del fegato.

L'idrocortisone viene usato sulla pelle in modo topico e ha la capacità di persistere nella zona interessata distribuendosi tra i vari strati cutanei e raggiungendo solamente in piccola percentuale il derma, sede di eventuale assorbimento sistemico.

Altri metodi di somministrazione sono quello per via orale (a stomaco pieno, per ridurre la possibile irritazione conseguente l'assunzione) o sotto forma di iniezioni.

4.1.1 Caratteristiche strutturali dell'idrocortisone

La sua struttura di base è rappresentata nella figura 4.1:

Hydrocortisone

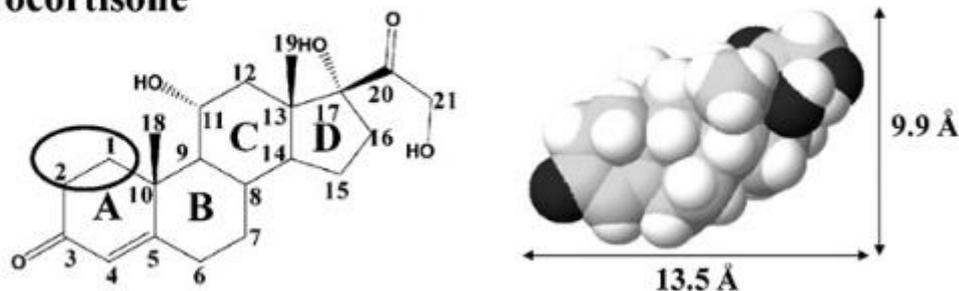


Figura 4.1 Struttura 2D e 3D dell'idrocortisone [51].

L'idrocortisone è costituito da 21 atomi di carbonio che formano il nucleo ciclopentanoperidrossifenantrenico e da una catena laterale 17, 21-diidrossi (OH)-20-chetonica (O). Questa catena laterale è cruciale per l'effetto glucocorticoide. I quattro anelli nella struttura sono designati da A a D. Il gruppo idrossile (OH) a C11, il doppio legame in posizione 4, 5 e il gruppo chetone in posizione 3 dell'anello A sono essenziali per l'attività glucocorticoide [5]. E' un farmaco avente una solubilità in acqua di 300 mg/L.

Altre caratteristiche chimico-fisiche sono riportate nella tabella sottostante:

Tabella 4.1 Caratteristiche Idrocortisone.

Nome IUPAC	Numero CAS	Formula Chimica	Massa Molare, g/mol	Temperatura di Fusione, °C
11 β ,17 α ,21-triidrossipregn-4-en-3,20-dione	50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362,47	220-224

4.2 Clotrimazolo

Il clotrimazolo è un farmaco antimicotico ad ampio spettro scoperto nella seconda metà degli anni '60. E' un composto sintetico facente parte della famiglia degli imidazoli, sottoclasse degli azoli ed è utilizzato per il trattamento di *Candida Albicans*, tinea pedis (infezione che interessa la superficie plantare e gli spazi interdigitali dei piedi), tinea cruris (infezione localizzata all'inguine e al perineo), tinea corporis (infezione della cute glabra), candidosi vulvovaginale e orofaringea oltre a mostrare attività verso batteri Gram-positivi. Esso garantisce attività antimicotica interferendo con la biosintesi dell'ergastolo, un componente importante presente nella membrana citoplasmatica dei funghi, e inibisce il citotroma microsomale comportando una alterazione della permeabilità e della fluidità della membrana.

Oltre alla sua attività antimicotica, il clotrimazolo è diventato un farmaco di interesse contro molte altre malattie come la malaria e alcuni tipi di cancro. È stato anche combinato con altri molecole, come i metalli, per produrre complessi di clotrimazolo che mostrano migliore efficacia farmacologica.

Il clotrimazolo è disponibile in formulazioni topiche di crema, polveri e compresse vaginali ed a volte è formulato con l'idrocortisone o steroidi (bethamethasone). Sebbene la sua disponibilità differisca leggermente da paese a paese, nei prodotti mirati al trattamento delle infezioni fungine della pelle, il clotrimazolo è di solito formulato come crema, lozione, spray o soluzione

all'1%. Nel trattamento della candidosi vulvovaginale, il normale dosaggio è di 100 mg, 200 mg o 500 mg che vengono somministrati giornalmente per 6, 3 o 1 giorni, rispettivamente. Dosi simili possono essere ottenute per applicazione di 1, 2 o 10 % di creme nella zona vaginale. Nel trattamento di candidosi orofaringea, losanghe di clotrimazolo sono generalmente formulati per contenere 10 mg di principio attivo.

Le forme topiche di clotrimazolo disponibili sono considerati ragionevolmente sicuri e senza gravi effetti collaterali. Tuttavia, ci sono stati casi limitati di dermatite allergica da contatto con creme contenenti clotrimazolo che non sono attribuibili alle allergie dovute al carrier, ma sono causati dal principio attivo stesso. Gli effetti collaterali più importanti dei preparati a base di clotrimazolo nell'uso corrente sono quelli associati all'uso di compresse per il trattamento della candidosi orale. Ciò provoca nausea, vomito, sensazioni di bocca sgradevoli, prurito. Può essere usato in sicurezza con il consumo di alcol, non influisce la capacità di guida e non vi è alcuna prova che possa rappresentare un rischio al feto in via di sviluppo in gravidanza. Il clotrimazolo è sicuro anche per l'uso nella popolazione anziane e per le madri che allattano [57].

4.2.1 Caratteristiche strutturali del clotrimazolo

In figura 4.2 è riportata la struttura chimica del principio attivo:

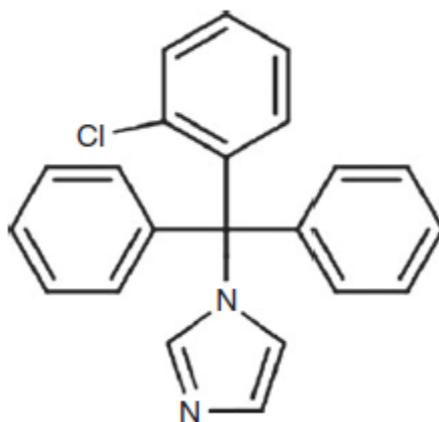


Figura 4.2 Struttura chimica del clotrimazolo [57].

Contiene quattro anelli aromatici legati ad un atomo di carbonio tetraedrico (ibridizzato sp^3), causando un elevato ingombro sterico su questo atomo. Uno dei gruppi aromatici è un anello imidazolico, di cui è nota la capacità di favorire le reazioni di trasferimento di elettroni nei sistemi biologici. I suoi rimanenti anelli aromatici comprendono un sistema trifenilmetilico, una struttura che è nota per formare e stabilizzare radicali intermedi. Uno di questi anelli è caratterizzato dalla presenza di un atomo di cloro. Sebbene il clotrimazolo sia una molecola achirale, i suoi due anelli fenolici sono enantiotopici, con uno che è pro-R e l'altro pro-S.

Altre caratteristiche chimico-fisiche sono riportate nella tabella sottostante:



Tabella 4.2 Caratteristiche del clotrimazolo.

Nome IUPAC	Numero CAS	Formula Chimica	Massa Molare, g/mol	Temperatura di Fusione, °C
1-[(2-clorofenil)-difenilmetil]-imidazolo	23593-75-1	C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂	344,8	147-149 [58]

Il clotrimazolo è altamente idrofobo ed è poco solubile in acqua, la sua solubilità è pari a 29,84 mg/ml. Solubile in acetone, cloroformio, acetato di etile e leggermente solubile in benzene e toluene [58].



5. TECNICHE DI IMPREGNAZIONE

Nel corso degli ultimi decenni diverse ricerche sono state compiute per realizzare delle tecniche in grado di garantire ottimali impregnazioni dei principi attivi su matrici porose rendendo questi sistemi ideali per applicazioni farmaceutiche ed, al tempo stesso, economici e atossici. Infatti, oggi le aziende farmaceutiche ricercano dei processi per la produzione di farmaci sempre più innovativi, al fine di incrementare il quantitativo di principio attivo da inserire nei sistemi e ottenere degli ottimi prodotti finali in grado di curare il paziente. Tuttavia si vogliono anche ottimizzare i processi di formazione dei farmaci eliminando alcune sostanze, quali solventi organici. Questi oltre ad essere molto costosi, sono tossici per gli esseri viventi e per l'ambiente e da qualche anno le normative per ridurre le emissioni sono diventate sempre più stringenti, inducendo le case farmaceutiche a sviluppare nuove tecniche di produzione.

Per aumentare la quantità di principio attivo bisogna considerare le proprietà termodinamiche delle sostanze. Sebbene lo stato amorfo fosse stato a lungo relazionata intimamente con l'instabilità perché disordinato e metastabile, e quindi non adatto alla produzione farmaceutica, negli ultimi tempi ha acquisito una grande attenzione nella scienza e nell'industria farmaceutica dati i vantaggi precedentemente illustrati nel paragrafo 3.5.5. Lo stato amorfo, infatti, può essere associato a un intervallo metastabile, che può essere sfruttato per massimizzare la concentrazione del farmaco e garantire una cinetica di rilascio controllata.

I solidi cristallini possono essere trasformati in amorfi in due modi: conversione diretta (ad es. mediante attivazione meccanica, irradiazione) o attraverso adsorbimenti mediante soluzione, vapore o fusione, seguiti da tempra, precipitazione, deposizione [59].

Due fenomeni avvengono durante il confinamento del farmaco, indipendentemente dal solvente utilizzato: adsorbimento del farmaco sulla superficie e precipitazione del principio attivo a seguito dell'evaporazione del solvente.

In questo lavoro di tesi, intendiamo concentrarci solo sulla seconda metodologia ed in particolare sono stati utilizzati i metodi di Incipient Wetness Impregnation (IWI) e CO₂ supercritica (scCO₂), come discusso nei paragrafi 5.1 e 5.2.

5.1 Incipient Wetness Impregnation

Il metodo Incipient wetness impregnation (IWI) consiste nell'impregnare il carrier con un volume di solvente pari al volume dei pori. Durante questo processo, la soluzione, composta dal farmaco e da un solvente organico (solitamente acetone, diclorometano o metanolo), si adsorbe sulla superficie e penetra all'interno dei pori. Quindi il supporto viene asciugato utilizzando una certa temperatura o per semplice evaporazione del solvente al fine di eliminare i composti volatili e il farmaco viene depositato sul carrier.

Il vantaggio di questo metodo rispetto all'impregnazione da soluzione è la possibilità di non sprecare farmaco, riducendone i costi, aumentando la possibilità di impregnare matrici utilizzando farmaci più costosi, facilitando il controllo della quantità di principio attivo che viene introdotta nel carrier ed infine risparmiando energia rispetto alla tecnica di fusione che implica l'impregnazione del farmaco a più alte temperature [39][59].

Con questa tecnica in letteratura sono presenti un ampio numero di articoli che riportano esperimenti di impregnazione di matrici con farmaci e non solo. In particolare Lopez et al. [34] utilizzarono questa tecnica per impregnare 4 diverse tipologie di silici con cortisolo al fine di valutare il rilascio del farmaco nel tempo ma anche Azaïs et al. [42] utilizzarono questa tipologia di impregnazione per includere Ibuprofene all'interno di silici mesoporose come SBA-15 e MCM-41.

5.2 CO₂ Supercritica

Negli ultimi 20 anni ci sono stati sviluppi significativi riguardo l'uso del diossido di carbonio supercritico. Esso, infatti, è visto come una valida alternativa alle tecniche convenzionali di drug loading, come l'impregnazione per Incipient Wetness Impregnation.

L'utilizzo di scCO₂, oggetto di studio da parte di molte industrie farmaceutiche, oggi potrebbe risolvere diverse problematiche relative all'utilizzo di solventi organici durante la sintesi di principi attivi. I solventi organici, infatti, sono altamente tossici per gli individui che hanno bisogno del farmaco, rimanendo nei prodotti finali anche a seguito di trattamenti di essiccazione, liofilizzazione o evaporazione del solvente sottovuoto oltre ad avere un impatto ambientale estremamente negativo, data l'elevata quantità di inquinanti emessi durante il processo, ed essere particolarmente costosi.

L'anidride carbonica supercritica infatti gode di proprietà chimico-fisiche uniche che possano risolvere queste problematiche. L'scCO₂ è preferita in quanto inodore, incolore, economica, riciclabile, non infiammabile, non tossica ed inoltre, non forma alcun composto di inclusione con farmaci durante la depressurizzazione. Tanto è vero che crea un'atmosfera protettiva priva di ossigeno durante il processo e non deve essere rimossa successivamente mediante opportuni trattamenti. Pertanto, l'anidride carbonica o le sue miscele con i co-solventi possono essere considerate un'alternativa valida e interessante ai solventi convenzionali e questa metodologia di impregnazione potrebbe essere utilizzata per la produzione di prodotti di consumo come prodotti alimentari o farmaceutici [60].

La CO₂ può esistere in fase solida, liquida o gassosa e variando la temperatura e la pressione può cambiare stato come visibile in figura 5.1:

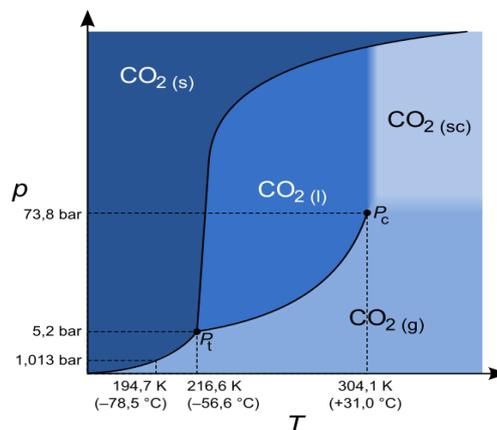


Figura 5.1 Diagramma di fase dell'anidride carbonica [61].

Il punto critico si ha ad una temperatura di 304,1 K (31,1°C) e ad una pressione di 73,8 bar. Al di sopra di questi valori, la CO₂ assume delle proprietà in parte liquide, quali la densità, ed in parte gassose, come le proprietà di trasporto.

Un ulteriore vantaggio che si può facilmente notare è la bassa temperatura di lavoro tale da poter trattare farmaci o molecole che siano poco stabili termicamente.

Sfortunatamente, l'scCO₂ soffre di una serie di problematiche che normalmente sono richieste per ottenere un solvente efficace, come la bassa viscosità, bassa costante dielettrica e bassa tensione superficiale rispetto ad altri comuni solventi. Inoltre, poiché la CO₂ è una molecola lineare senza momento di dipolo netto vi è una significativa difficoltà di dissoluzione delle specie polari e ioniche ma presenta ottime proprietà di solubilità con i soluti non polari [62].

Come sottolineato nell'articolo di Gurikov e Smirnova [59], vi sono soluti altamente, moderatamente e scarsamente solubili in CO₂ supercritica. I farmaci, oggetto di indagine per i sistemi di drug delivery, si possono così selezionare:

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

Il metodo di impregnazione mediante CO₂ supercritica consiste nella dissoluzione del principio attivo nel carrier a determinate condizioni operative per un certo tempo.

Un tipico impianto è rappresentato in figura 5.2:

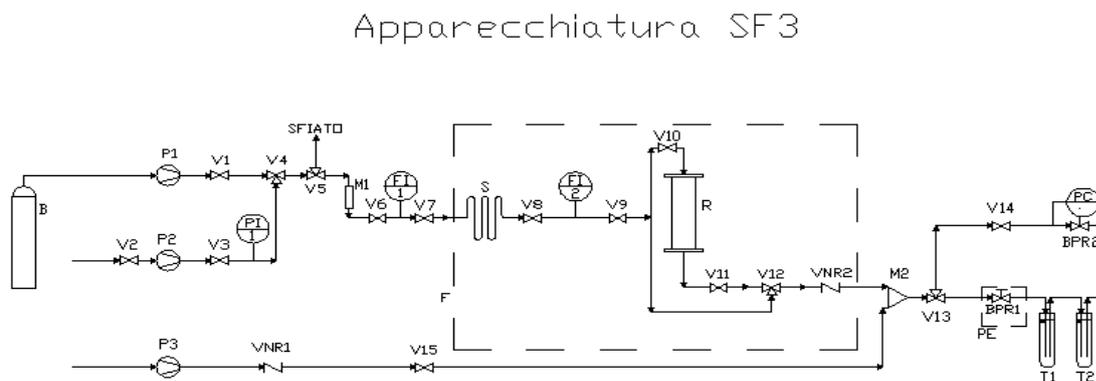


Figura 5.2 Rappresentazione di un impianto per impregnazione del farmaco in un carrier mediante scCO₂ [29].

L'impianto è caratterizzato da un reattore in acciaio inossidabile dentro al quale vengono inseriti sia il supporto che il farmaco. Questo, dopo caricamento, viene posizionato all'interno di un forno a temperatura costante durante tutto il processo. Il primo step prevede la dissoluzione del farmaco (soluti) in atmosfera di anidride carbonica supercritica, quindi si ha l'impregnazione del carrier mediante contatto con questa soluzione creata e infine si ha depressurizzazione, passaggio in cui la CO₂ torna allo stato gassoso rimuovendo anidride



carbonica dal sistema carrier-farmaco. L'apparecchio è inoltre dotato di una pompa volumetrica e di un regolatore di contropressione [29].

Uno dei problemi che si potrebbe avere è la liquefazione dell'anidride carbonica in autoclave la quale potrebbe portare un restringimento della matrice. Per superare questo problema si preriscalda la CO₂ prima di introdurla nella fornace [59]. Un parametro limitante di tutto il processo è il tempo di equilibrio che dovrebbe essere accelerato il più possibile.

Nelle condizioni statiche, la cinetica di adsorbimento è solo una fase del processo generale che coinvolge la dissoluzione del farmaco, il suo trasporto sulla superficie e l'adsorbimento stesso. È evidente che la diffusione nei vasi ad alta pressione e le dimensioni delle particelle influenzano la cinetica del processo.

Nel corso degli anni diversi sistemi a base di silice mesoporosa sono stati impregnati con diverse tipologie di principi attivi utilizzando come solvente l'anidride carbonica supercritica come dimostrano diversi articoli. La review di Gurikov e Smirnova [59] elenca molti sistemi silice-farmaco ma anche Bouledjoudja et al. [63], Gignone et al. [50], Hillerström [64], Smirnova [65] si sono occupati di incorporare in silice mesopora mediante scCO₂ rispettivamente Fenofibrato, Clotrimazolo, Ibuprofene e Ketoprofene.

6. TECNICHE DI ANALISI E STRUMENTI UTILIZZATI

6.1 Spettroscopia Infrarossa A Trasformata Di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è una tecnica non distruttiva che permette di studiare l'interazione della radiazione infrarossa con un campione solido, liquido o gassoso. Quando un fotone viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. Parte della radiazione infrarossa viene assorbita e parte viene attraversata (trasmessa). La determinazione della frequenza di assorbimento permette di identificare i gruppi funzionali di una molecola, poiché assorbono a frequenze caratteristiche.

In un tipico spettro infrarosso in ascissa troviamo il numero d'onda del fotone incidente, e in ordinata l'intensità dell'assorbimento (o assorbanza) o in percentuale di trasmittanza, creando un'impronta molecolare del campione, con picchi che corrispondono alle frequenze delle vibrazioni tra i legami degli atomi che costituiscono il materiale.

Le vibrazioni possono essere di due tipi: stiramento del legame chimico (stretching) e deformazione dell'angolo di legame (bending).

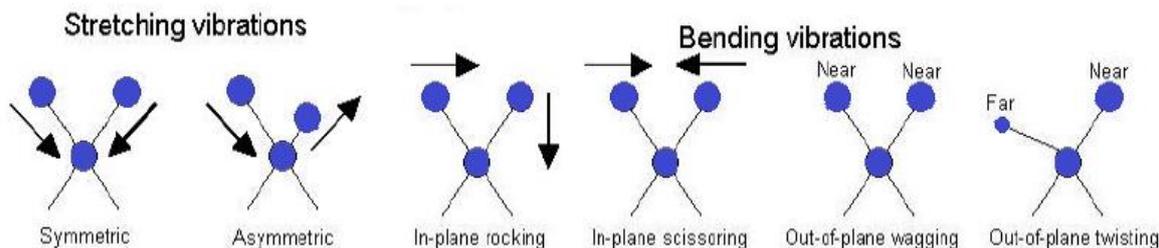


Figura 6.1 Modi vibrazionali [66].

Affinchè i modi vibrazionali siano visibili all'IR è necessario che il momento di dipolo sia diverso da zero perché è questo che comporta una variazione del campo elettrico oscillante che a sua volta va ad interagire con la radiazione infrarossa.

Un tipico range di lunghezze d'onda su cui la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier lavora è tra 4000 e 600 cm^{-1} .

Nello spettro IR possiamo distinguere due zone:

- zona dei gruppi funzionali, che si estende da 4000 a 1300 cm^{-1} e comprende bande dovute sia a stiramenti che a deformazioni di gruppi funzionali (es. legami O-H, C-H, C=C, C=O, ecc.),
- zona delle impronte digitali (fingerprints), da 1300 a 600 cm^{-1} , che deve il suo nome alla presenza di bande caratteristiche di ciascuna molecola perché originate da vibrazioni dell'intero scheletro molecolare [67].

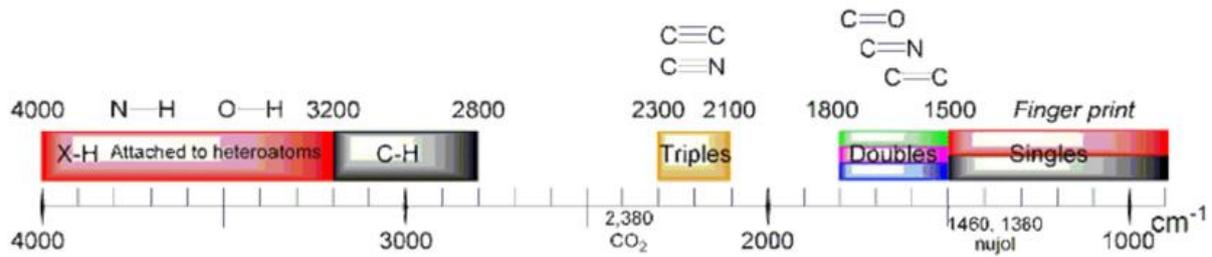


Figura 6.2 Zone dello spettro IR per regioni di frequenza [67].

6.2 Analisi di adsorbimento di azoto

La tecnica di adsorbimento di azoto viene utilizzata per lo studio dell'area superficiale, del diametro medio dei pori, della relativa distribuzione dei pori e del volume totale del materiale esaminato.

Per ottenere questi risultati, si utilizza l'azoto (ma si potrebbero utilizzare anche altre molecole sonda quali He, Ar) che viene fatto fisisorbire sulla superficie e nei pori dell'adsorbente alla sua temperatura di liquefazione, ovvero 77 K.

Il campione, inizialmente, viene degasato per eliminare le impurezze presenti sulla superficie. Quindi, deboli forze attrattive molecolari causeranno un adsorbimento delle molecole di gas sul materiale solido. In particolare viene studiato l'andamento della quantità di gas adsorbito, o desorbito durante il processo inverso, al variare della pressione parziale dell'adsorbato stesso. Il volume di gas fisisorbito è funzione del peso dell'adsorbente, della temperatura, dell'interazione tra adsorbato e adsorbente e della pressione dell'adsorbato. Le isoterme misurate per un'ampia varietà di sistemi gas-solido, sono caratterizzate da una grande diversità di forme. Tuttavia, la maggior parte di queste isoterme risultanti da processi di adsorbimento fisico può essere raggruppata all'interno di 6 classi in base alla classificazione IUPAC, come riportato dalla figura 5.3.

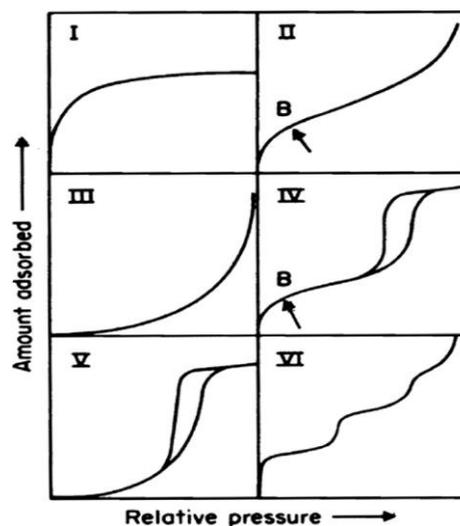


Figura 6.3 Classificazione delle isoterme di adsorbimento secondo la nomenclatura IUPAC [68].

- L'isoterma di **tipo I** è caratteristica dei materiali totalmente microporosi. A pressioni relative molto basse si osserva un aumento rapido, quasi verticale, delle moli adsorbite; a pressioni più elevate presenta un "ginocchio" oltre il quale si ha un plateau indicante che il materiale non sta più adsorbendo nonostante l'aumento di pressione.
- L'isoterma di **tipo II** è associata ad un adsorbimento che avviene su un solido macroporoso o non poroso. Indica la formazione di uno strato di materiale adsorbito il cui spessore aumenta progressivamente con la pressione relativa fino a valori di p/p_0 tendenti a 1. Il ginocchio di questo tipo di isoterma indica la pressione a cui si forma il mono-strato adsorbito e l'inizio della formazione del multistrato molecolare. L'ordinata dá una stima della quantità di adsorbato richiesto per coprire una massa unitaria di superficie di solido con uno strato completo monomolecolare (monolayer capacity).
- L'isoterma di **tipo III** ha una forma convessa e non presenta un ginocchio. Questa caratteristica è rappresentativa di deboli interazioni adsorbente-adsorbato.
- L'isoterma di **tipo IV** è caratterizzata da un andamento iniziale simile a quella di tipo II e tende a stabilizzarsi ad alti valori di pressione relativa. Esibisce un'isteresi; cioè, facendo il ciclo inverso, partendo quindi da pressioni relative prossime all'unità e decrescendo fino alle pressioni più basse (ciclo di desorbimento), la curva non ricalca il tracciato di adsorbimento ma, fissato un certo valore di p/p_0 , il sistema raggiunge l'equilibrio avendo sottratto alla fase gassosa un numero di moli maggiore del corrispondente punto nel ciclo di adsorbimento. Una tale tipologia di curva è tipica dei materiali mesoporosi. Durante il ciclo di adsorbimento, il gas tende inizialmente a riempire il monostrato, iniziano a riempirsi gli strati sovrastanti e ad una certa pressione, il gas adsorbito all'interno dei mesopori non è più stabile in fase vapore e condensa.
- L'isoterma di **tipo V**, come la III, è indicativa di deboli interazioni adsorbente-adsorbato. Esibisce un'isteresi che è associata al meccanismo di riempimento e svuotamento dei pori.
- L'isoterma di **tipo VI** con andamento a scalini, pur essendo molto rara, è presentata per completezza.

Oltre alla classificazione delle isoterme, esiste anche una classificazione IUPAC delle forme di isteresi, visibili nella figura 6.4 presente in basso.

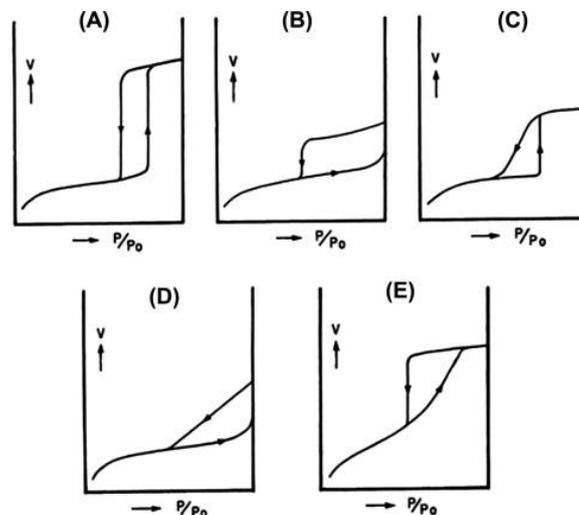


Figura 6.4 Classificazione del ciclo di isteresi [69].



Secondo de Boer, un ciclo di isteresi di tipo A potrebbe essere ottenuto da un numero di diverse strutture di base inclusi i pori cilindrici aperti, pori tubolari con sezioni alternate larghe e strette. Il coppia di isteresi di tipo B è tipico di pori disposti in maniera lamellare mentre quelli di tipo C e D sono tipici di strutture porose coniche. Infine l'isoterma di tipo E indica un modello geometrico dei pori a "collo di bottiglia" [69].

Da una prima analisi di tipo qualitativo di una isoterma di adsorbimento ricavata sperimentalmente, si possono già ottenere alcune informazioni sulla natura porosa/non porosa del materiale analizzato. In particolare, confrontando la forma ottenuta con quelle classificate dalla IUPAC è possibile valutare se il materiale è poroso e di che tipo è la porosità (micro-, meso-, o macro-porosità). Ad esempio, le isoterme di tipo I sono tipiche di substrati microporosi, mentre i tipi IV, V sono caratteristici di sistemi che presentano mesopori. Generalmente i pori > 50 nm di diametro sono chiamati macropori, i pori tra 2 e 50 nm di diametro sono chiamati mesopori e i pori < 2 nm di diametro sono chiamati micropori.

In seconda battuta, in funzione della pressione, è possibile ricavare ulteriori informazioni sul materiale studiato. Il processo di adsorbimento avviene approssimativamente come segue: inizialmente, si ha il riempimento dei micropori che è dominato quasi interamente dalle interazioni tra adsorbato e pareti del poro; segue, a pressioni maggiori, la copertura della superficie esterna, consistente nella formazione del monostrato o adsorbimento multistrato delle pareti dei mesopori e dei macropori, con condensazione capillare nel caso di mesopori. Ciò vuol dire che, la zona a bassi valori di p/p_0 , corrispondente al riempimento dei micropori, è utile per ricavare il volume microporoso e il PSD (distribuzione dell'area dei pori); la zona corrispondente alla formazione del monostrato, permette di calcolare l'area superficiale e la zona di condensazione capillare (presenza di isteresi sull'isoterma) viene utilizzata per caratterizzare i mesopori. Vi sono diverse teorie utili al calcolo del monostrato e del volume condensato, ma nessuna rappresenta una soluzione esatta dato che tutte utilizzano semplificazioni teorico-matematiche necessarie ai calcoli ed alla schematizzazione del fenomeno fisico stesso. La più impiegata è la teoria BET (Brunauer-Emmett-Teller), in cui:

$$S = \frac{V_m N A}{V W} \text{ (m}^2\text{/g)}$$

essendo V_m il volume del monostrato di gas (m^3), A l'area della molecola di gas ($\text{m}^2\text{/molecola}$), V il volume molare (che in condizioni normali è pari a 22,414 l), N il numero di Avogadro (pari a $6,023 \cdot 10^{23}$ molecole), W il peso del materiale (g).

6.3 Analisi Termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica termoanalitica quantitativa che permette di dare delle informazioni sui materiali analizzati misurando la perdita di peso della sostanza durante un aumento controllato della temperatura senza però identificare la natura dei componenti. Infatti, lo strumento ci permette solo di capire eventuali decomposizioni, ossidazioni, perdita del solvente di cristallizzazione o di sostanze polimorfe a determinate temperature o dopo un tempo trascorso dall'inizio della prova. La variazione di peso si può facilmente osservare con le seguenti equazioni:

$$\Delta m = m_{iniziale} - m_{finale}$$

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

Da questa analisi si ottengono delle curve termogravimetriche, come quella presente in figura 6.5, in cui il peso del campione è riportato in funzione della temperatura. Tuttavia è possibile riportare la perdita di peso anche in funzione del tempo.

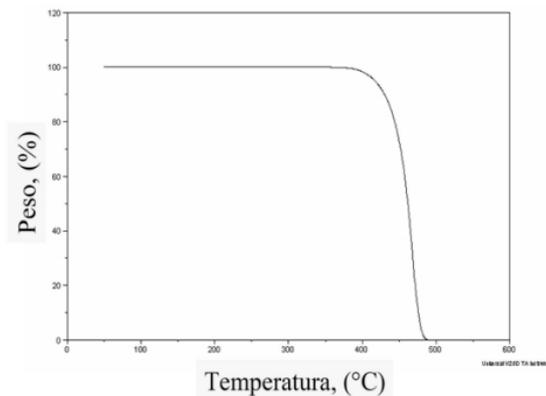


Figura 6.5 Esempio di curva termogravimetrica.

La strumentazione è caratterizzata dai seguenti componenti: bilancia analitica sensibile, fornace, sistema di gas di spurgo che assicura un'atmosfera inerte e la diffusione del calore in ogni punto (si utilizzano generalmente N₂, aria, H₂ e CO), sensore di temperatura per far aumentare, o diminuire, linearmente la temperatura nel tempo e un software per elaborare acquisire e visualizzare i dati.

Questa tecnica permette di analizzare varie tipologie di materiali, dai polimeri ai ceramici, per i più differenti settori anche se questa tecnica riscuote molto successo soprattutto in ambiti farmaceutici, polimerici e petrolchimici. Nel nostro caso è utilizzata per esaminare i campioni di silici commerciali, i farmaci e i sistemi carrier/principi attivi che durante l'attività di laboratorio sono stati creati.

6.4 Diffrazione a Raggi X (XRD)

La diffrazione ai raggi X è una tecnica utilizzata, prevalentemente in ambito chimico e farmaceutico, per identificare le fasi cristalline, stimare le dimensioni dei cristalliti e la distanza tra facce cristalline.

Tale tecnica si basa sulla interazione dei fotoni delle radiazioni X con gli atomi del materiale da esaminare. Quando il fascio di raggi X incidente ha lunghezza d'onda dello stesso ordine di grandezza della distanza tra piani atomici di un cristallo allora si ha il fenomeno della diffrazione (scattering elastico). La diffrazione ha luogo quando è soddisfatta la legge di Bragg:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta$$

dove d è la distanza tra i piani atomici del cristallo, λ è la lunghezza d'onda del raggio incidente, n indica l'ordine di diffrazione, θ è l'angolo di incidenza della radiazione. Affinché vi sia un'interferenza costruttiva, è necessario che la differenza tra i cammini ottici effettuati dai fasci riflessi da due piani atomici successivi sia uguale a un multiplo intero di λ .

E' importante sottolineare come durante l'analisi sia necessario che il fascio di raggi X mantenga sempre una lunghezza d'onda per evitare un'errata valutazione dei risultati finali. Una volta avvenuta l'interazione con il campione, un detector rileva il fascio di raggi X e mediante una elaborazione si ottengono dei grafici in cui l'intensità dei raggi X è riportata in funzione di 2θ , ovvero dell'angolo tra il fascio di raggi X e il detector. Questo permette di identificare la fase cristallina e misurare le distanze interplanari.

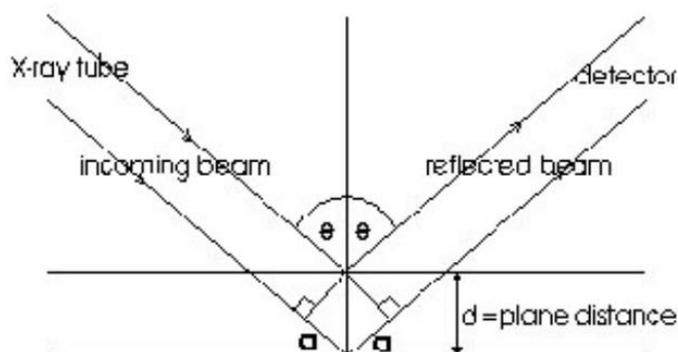


Figura 6.6 Rappresentazione della legge di Bragg.

6.5 Spettroscopia Ultravioletta-Visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica di assorbimento molecolare utilizzata per determinare la lunghezza d'onda, ultravioletta o visibile, a cui assorbe una soluzione chimica. In dettaglio, è possibile identificare sostanze ignote in una soluzione e/o determinare la concentrazione delle sostanze note.

Il funzionamento si basa sull'assorbimento di un fotone dalla molecola, passando da uno stato elettronico fondamentale ad uno eccitato. Questo fenomeno di assorbimento entro un certo intervallo di concentrazioni e in presenza di radiazione monocromatica segue la legge di Lambert-Beer:

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

Dove:

- A è l'assorbanza misurata;
- I_0 è l'intensità della luce incidente a una determinata lunghezza d'onda;
- I è l'intensità trasmessa;
- ϵ è il coefficiente di assorbimento;

- c è la concentrazione molare del soluto in soluzione;
- l è la lunghezza del percorso attraverso il campione.

Uno spettrofotometro UV-Vis si può schematicamente rappresentare come in figura 6.7.

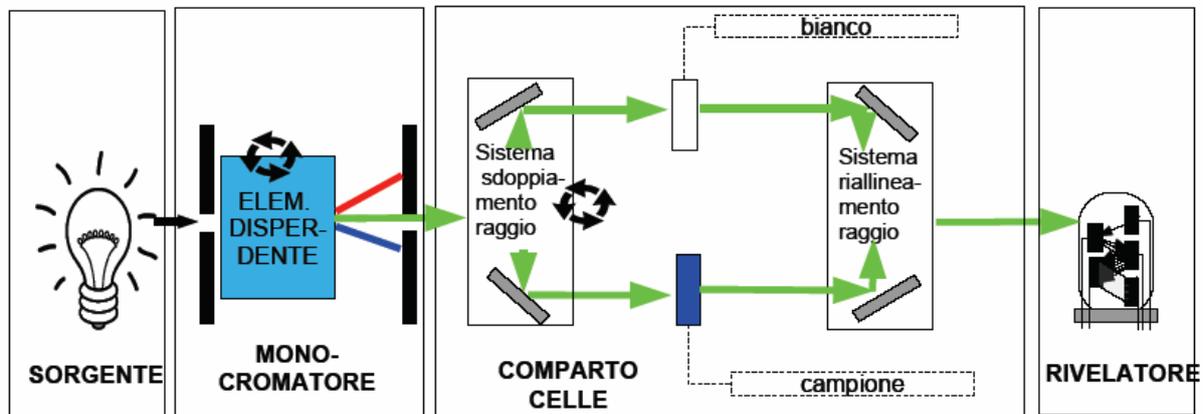


Figura 6.7 Schematizzazione di uno spettrofotometro UV/VIS.

I componenti principali sono:

- sorgente di energia radiante nello spettro UV-visibile;
- monocromatore, il cui scopo è quello di isolare un intervallo il più possibile ristretto di radiazioni emesse centrato nella lunghezza d'onda d'interesse;
- recipiente del campione, chiamato cuvetta;
- rivelatore.

Le sorgenti principalmente utilizzate sono le lampade a incandescenza (al tungsteno), le lampade al deuterio e quelle allo xeno. I monocromatori principalmente utilizzati sono costituiti da specchi concavi e da reticoli in riflessione. Il campione da analizzare viene posto in cuvette che devono essere trasparenti alla lunghezza d'onda alla quale si lavora. Queste cellette hanno forma di parallelepipedo. I rivelatori tipicamente utilizzati sono dei dispositivi fotosensibili che sfruttano l'effetto fotoelettrico; vengono utilizzate fotocelle a vuoto e a gas, fotomoltiplicatori, celle fotovoltaiche, celle fotoconduttive e fotodiodi.

6.6 Strumenti Utilizzati

Durante le esperienze di laboratorio per la caratterizzazione dei campioni sono stati utilizzati i seguenti strumenti.

6.6.1 Strumento per FT-IR

Le analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, presenti nei capitoli successivi, sono state effettuate con lo strumento “**BRUKER EQUINOX 55 SPECTROMETER**”. Le prove sono state effettuate realizzando delle pastiglie autosupportate per i campioni aventi la



silice mentre per i farmaci si sono realizzate delle pastiglie mediante l'utilizzo di circa il 20% di KBr (Bromuro di Potassio) rispetto al peso totale della pastiglia.

Quindi la pastiglia veniva inserita in una lamina d'oro e introdotta in una cella avente, nella parte inferiore, delle finestre in KBr che ne permettono il passaggio della luce infrarossa. Successivamente ogni campione ha subito un processo di degasaggio per circa un'ora a 10^{-3} mbar al fine di eliminare le specie adsorbite fisicamente sulla superficie ed infine la cella veniva posizionata nello spettrofotometro per effettuare la misura.

6.6.2 Strumento per analisi di adsorbimento di azoto

L'analisi di adsorbimento di azoto è stata effettuata mediante l'utilizzo del seguente strumento: "ASAP 2020 Plus" della Micromeritics. Prima di esaminare ogni singolo campione, sono stati fatti dei pretrattamenti in condizioni di vuoto e a 70°C per eliminare i contaminanti fisisorbiti sulla superficie presso le "outgassing station", ovvero camicie riscaldanti. Poi ogni buretta contenente il campione veniva passato alla stazione deputata all'analisi vera e propria. Quindi, le prove sono state condotte in presenza di azoto liquido a 77 K, perché la misura si fa a temperatura costante e di liquefazione dell'azoto. Mediante il modello DFT (Density Functional Theory) è possibile valutare l'area superficiale, il volume dei pori e il diametro medio dei pori.

6.6.3 Strumento per analisi termogravimetrica

Per osservare la perdita di peso del campione in funzione della temperatura è stato utilizzato lo strumento "SETERAM TGA 92". Pochi mg di campione venivano versati in un crogiolo di allumina e introdotti nella fornace di grafite. Una bilancia permetteva di valutare il peso all'inizio. Successivamente, veniva fatta partire la prova utilizzando una rampa di riscaldamento di $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in condizioni di flusso d'aria. Durante la misurazione la bilancia registrava le perdite di peso e finita la prova il software SETSOFT ci permetteva di ricavare i dati di perdita di peso in funzione della temperatura o del tempo.

6.6.4 Strumento per analisi diffrattometrica ai raggi X

Per la determinazione della fase fisica dei campioni esaminati è stato utilizzato il diffrattometro PANALYTICAL presente presso il dipartimento DISAT del Politecnico di Torino. Le prove sono state effettuate utilizzando una tensione di 40 KV e una corrente di 40 mA.

La polvere veniva posizionata su un portacampione e quindi inserita nello strumento che, mediante il movimento del detector e della sorgente dei raggi X, permetteva di effettuare la misurazione. Le misure a bassi angoli sono state realizzate per valutare l'ordine o il disordine delle silici mentre quelle ad alto angolo per valutare la presenza di picchi cristallini del farmaco.

6.6.5 Strumento per spettroscopia UV/VIS

Lo spettrofotometro utilizzato durante l'attività di tesi è denominato "Lambda25", acquistato dalla Perkin Elmer. Con esso è stato possibile definire l'assorbanza dell'idrocortisone alla lunghezza d'onda massima del principio attivo (250 nm) per la realizzazione della retta di taratura e la prova di rilascio dell'idrocortisone in PBS.

7. CARATTERIZZAZIONE DEI PRINCIPI ATTIVI

Nel seguente capitolo vengono elencate le analisi di caratterizzazione dei principi attivi utilizzati durante la parte sperimentale della tesi.

I 2 farmaci utilizzati sono l'idrocortisone e il clotrimazolo.

7.1 Idrocortisone

L'idrocortisone utilizzato è quello della Sigma-Aldrich con una purezza non inferiore al 98%. Esso è fornito in polvere, ha una colorazione biancastra ed è inodore. Sul farmaco sono state effettuate analisi di diffrazione ai raggi X, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier e analisi termogravimetrica.

- Analisi di diffrazione ai raggi X

Lo spettro diffrattometrico dell'idrocortisone mostra la presenza di picchi di cristallinità per valori 2θ di $14,5^\circ$ e $17,5^\circ$, come anche riportato in letteratura [70] [71].

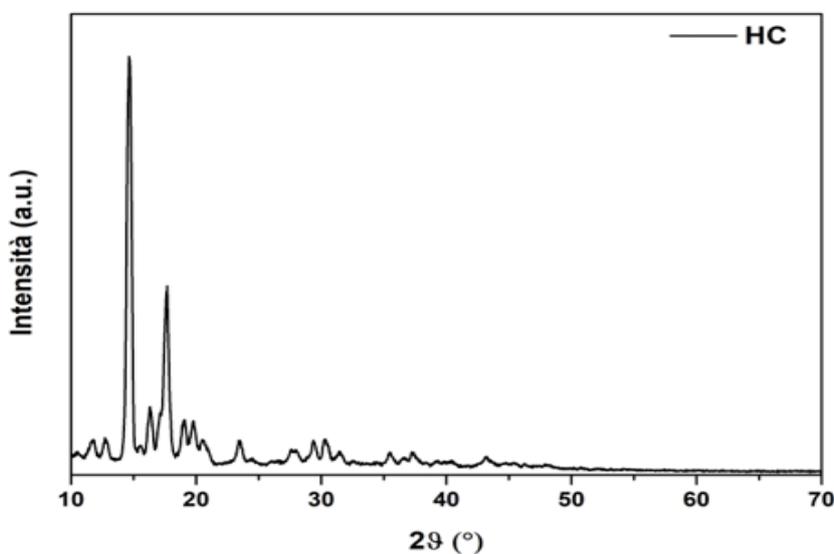


Figura 7.1 Spettro diffrattometrico dell'Idrocortisone.

- Spettroscopia infrarossa a Trasformata di Fourier

Lo spettro infrarosso evidenzia le bande di assorbimento caratteristiche delle molecole del principio attivo. Si osserva come vi sia uno stretching per lunghezza d'onda di 3435 cm^{-1} attribuibile ai gruppi ossidrilici [70]. Quindi vi sono dei modi vibrazionali dai 3000 ai 2850 cm^{-1} rappresentativi dei legami C-H alifatici e la banda a 1710 assegnabile ai modi di vibrazione del gruppo carbonile del gruppo carbossilico impegnato con un doppio legame idrogeno intermolecolare. L'involuppo a 1644 cm^{-1} è attribuibile al gruppo carbonile legato all'anello e

dai doppi legami C=C [72] [73]. Alcuni autori [74] hanno assegnato il modo intorno ai 1650 cm^{-1} al legame CO-OH ma questo non è corretto perché la banda di un carbonile di un gruppo carbossilico non può scendere al di sotto dei 1700 cm^{-1} come dimostrato da Takei et al. [72] a seguito di studi computazionali. Sotto 1500 cm^{-1} vi sono dei modi che possono essere riferibili all'impronta digitale della molecola.

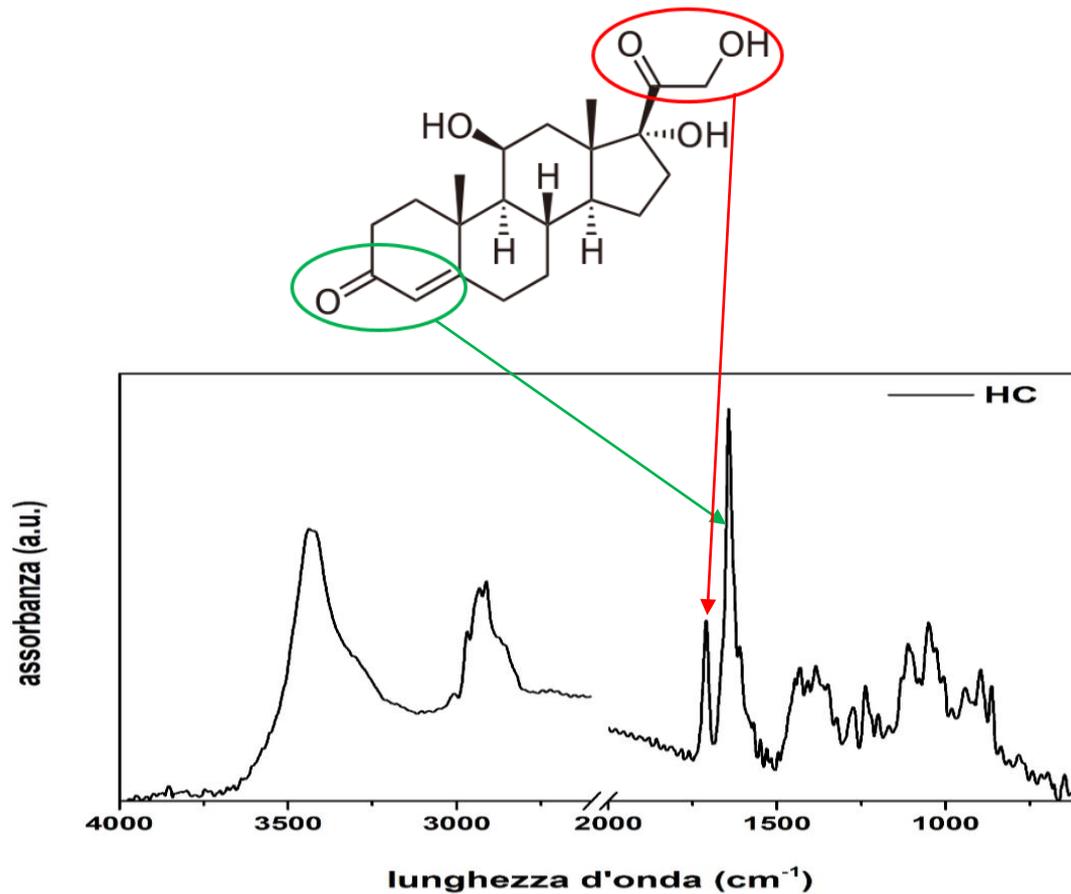


Figura 7.2 Spettro infrarosso dell'Idrocortisone.

- Analisi Termogravimetrica

La curva termogravimetrica dell'idrocortisone, figura 7.3, mostra un plateau fino alla temperatura di circa 225°C. Successivamente si ha una perdita di peso, dovuta alla fusione con decomposizione della fase cristallina del principio attivo. Si può osservare come l'andamento decrescente della curva non è lineare fino alla perdita totale del peso. Questo può essere dovuto al fatto che i gruppi che compongono la molecola del principio attivo tendono a degradarsi a temperature diverse.

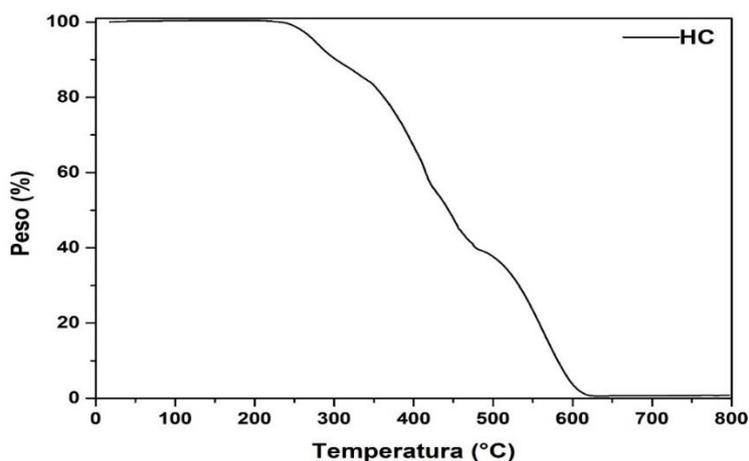


Figura 7.3 Curva termogravimetrica dell'Idrocortisone.

7.2 Clotrimazolo

Il clotrimazolo utilizzato è quello della Sigma-Aldrich, fornito sotto forma di polvere. Esso ha una colorazione biancastra, è inodore ed è poco solubile in acqua ma solubile in solventi quali acetone. Anche su questo principio attivo sono state effettuate analisi di diffrazione ai raggi X e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.

- Analisi di diffrazione a raggi X

Lo spettro ottenuto durante la prova riproduce esattamente quello riportato in letteratura da Ahmed et al.[75]. Si notano diversi picchi di cristallinità tra cui quelli a $9,4^\circ$ e $12,6^\circ$ che sono i più intensi.

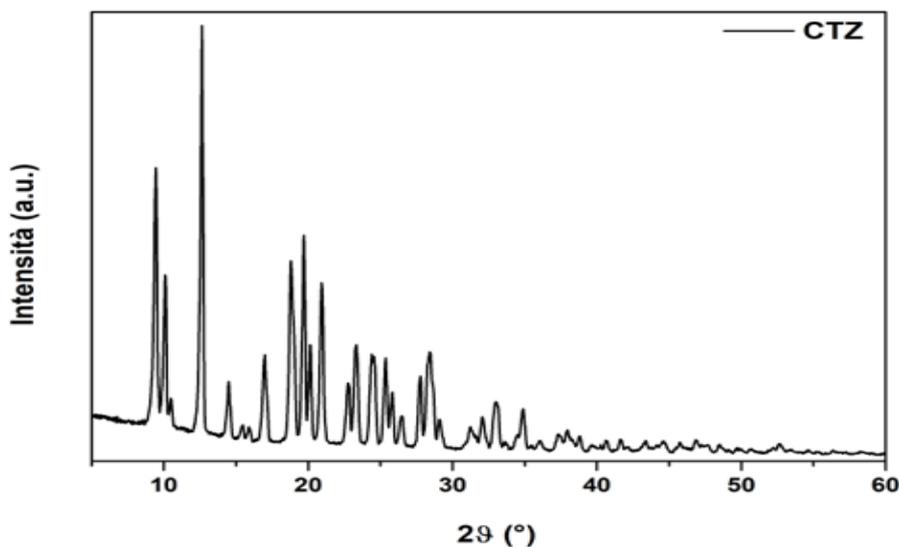


Figura 7.4 Spettro diffrattometrico del Clotrimazolo.

- Spettroscopia infrarossa a Trasformata di Fourier

L'analisi spettroscopica, così come riportato da Gignone et al. [50], mostra la presenza di bande di assorbimento nell'intervallo tra 3200 e 3000 cm^{-1} attribuibili ai legami C-H aromatici della molecola. Quindi si hanno picchi per valori di lunghezza d'onda presenti tra 1600 e 1400 cm^{-1} , relativi ai doppi legami tra atomi di carbonio o carbonio e azoto. I modi visibili per lunghezza d'onda minori rappresentano l'impronta digitale del clotrimazolo.

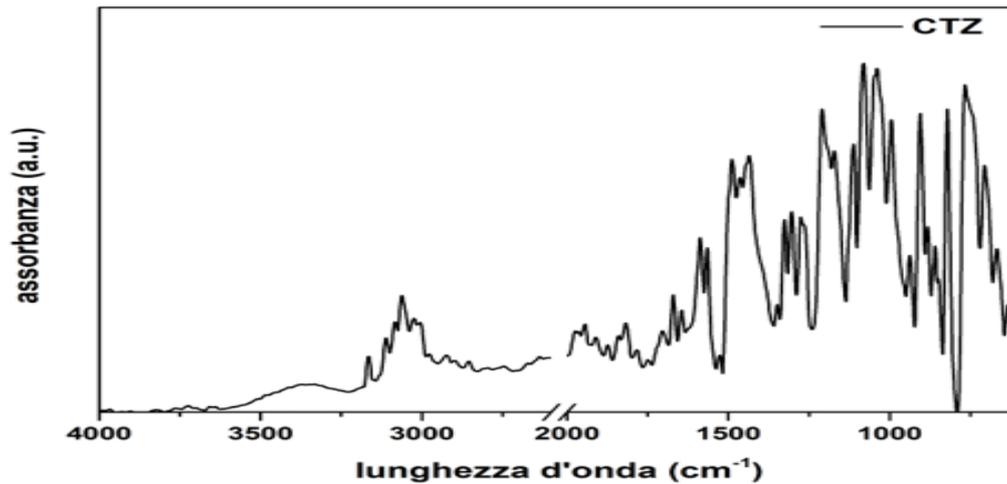


Figura 7.5 Spettro infrarosso del Clotrimazolo.

8. CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI CON SUPPORTO SILICE GRACE XDP

Le 2 silici utilizzate durante il lavoro di tesi sono di tipo commerciale. La prima, trattata in questo capitolo, è la GRACE SP53D-11804 fornita dall'azienda "GRACE". La GRACE SP53D-11804 è una silice appartenente alla classe delle SYLOID® XDP e avente una morfologia amorfa, disordinata e di colore bianco, come rappresentato nella figura 8.1.

Questa tipologia di syloid godono di una elevata porosità che garantisce migliore densità e capacità volumetrica, oltre ad maggiore pore volume che permette una più alta quantità di adsorbimento [76]. Un ulteriore vantaggio di questa tipologia di silici è la capacità di non utilizzare solventi per impregnare il supporto.

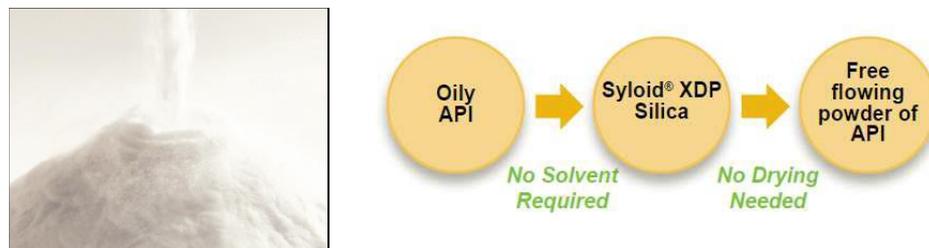


Figura 8.1 Grace in polvere [33].

8.1 Caratterizzazione della Grace

La caratterizzazione è stata eseguita mediante analisi di adsorbimento di azoto, analisi termogravimetrica, diffrazione ai raggi X e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, i cui risultati sono riportati di seguito.

- Diffrazione a raggi X

Lo spettro XRD della Grace commerciale è riportato nel grafico presente in basso. Si osserva la presenza di una struttura amorfa data l'assenza di picchi di diffrazione, indici di cristallinità.

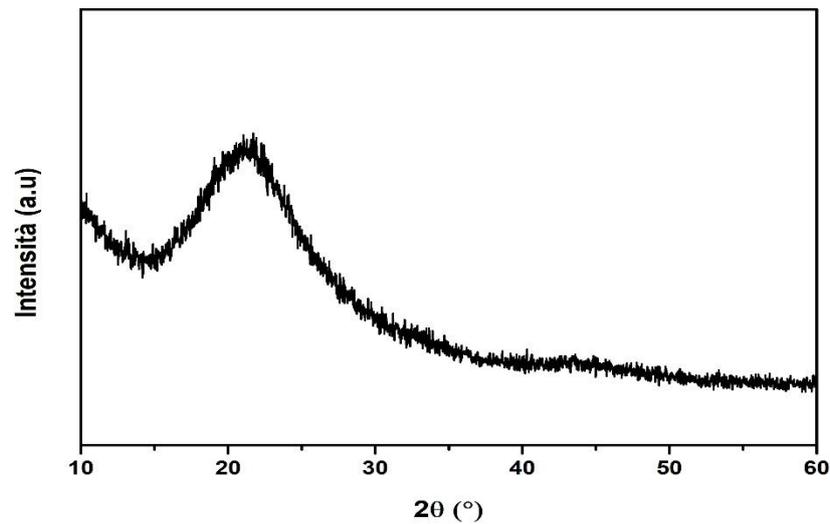


Figura 8.2 Spettro XRD del campione Grace.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Nella figura sottostante viene riportata l'isoterma di adsorbimento di azoto a 77 K della Grace.

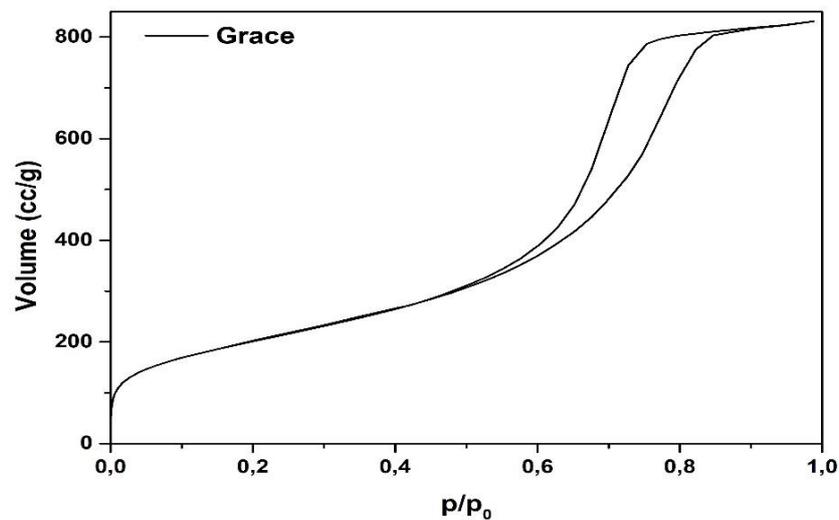


Figura 8.3 Isotherma di adsorbimento del carrier Grace.

L'isoterma di adsorbimento è del tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi, e presenta un'isteresi dovuta ad un diverso andamento della curva durante le fasi di adsorbimento e desorbimento a seguito del fenomeno di condensazione capillare che si crea nei pori. Il coppia di isteresi non ha una forma tipica delle curve teoriche descritte nel paragrafo 6.2 e ciò indica come il campione sia caratterizzato da mesopori disordinati e senza una determinata forma.

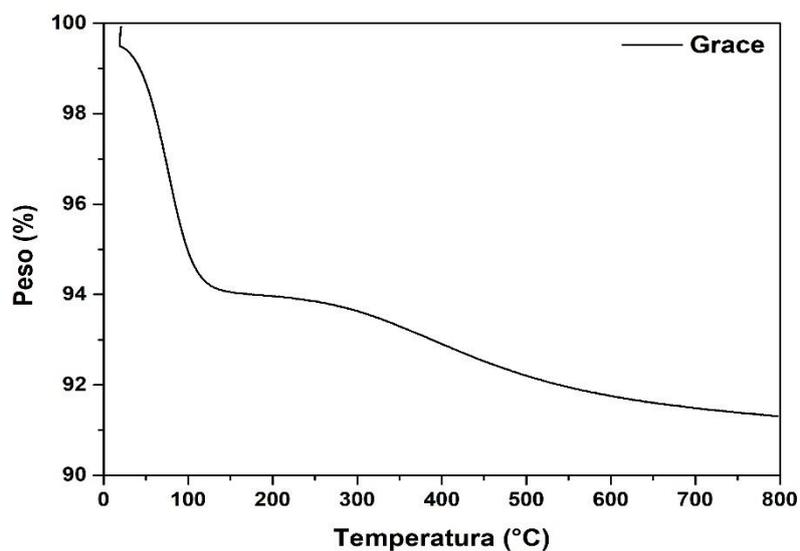
Inoltre mediante modello DFT è stato possibile avere informazioni sul pore volume e sul diametro dei pori che, insieme al valore di area superficiale specifica, sono riportati in tabella 8.1.

Tabella 8.1 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace.

Area Superficiale specifica	732 m ² /g
Volume dei pori	1,29 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	7,6 nm

- Analisi Termogravimetrica

Dalla curva termogravimetrica, rappresentata in figura 8.4, si osserva una iniziale perdita di peso a temperatura ambiente attribuibile a specie desorbite dalla silice. Successivamente, dalla temperatura ambiente ad una temperatura di circa 100 °C, si ha una curva decrescente con ripida pendenza a causa di acqua fisisorbita dalla superficie. Dopo aver perso circa il 6% del peso iniziale, la curva raggiunge un plateau fino ad una temperatura di circa 300°C per poi decrescere fino ad un valore del 91% in peso rispetto al valore iniziale data la perdita di silanoli. In totale, nel range di temperatura che va da 25 a 800 °C si ha una perdita di peso totale di circa il 9 %.

**Figura 8.4** Curva termogravimetrica del campione Grace.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Il campione è stato sottoposto a Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e il grafico ottenuto è riportato nella figura 8.5.

La Grace ha un tipico andamento di una silice con un picco a 3745 cm⁻¹ assegnabile alla presenza di silanoli isolati e una banda larga tra 3600 e 3300 cm⁻¹ attribuibile ai silanoli interagenti.

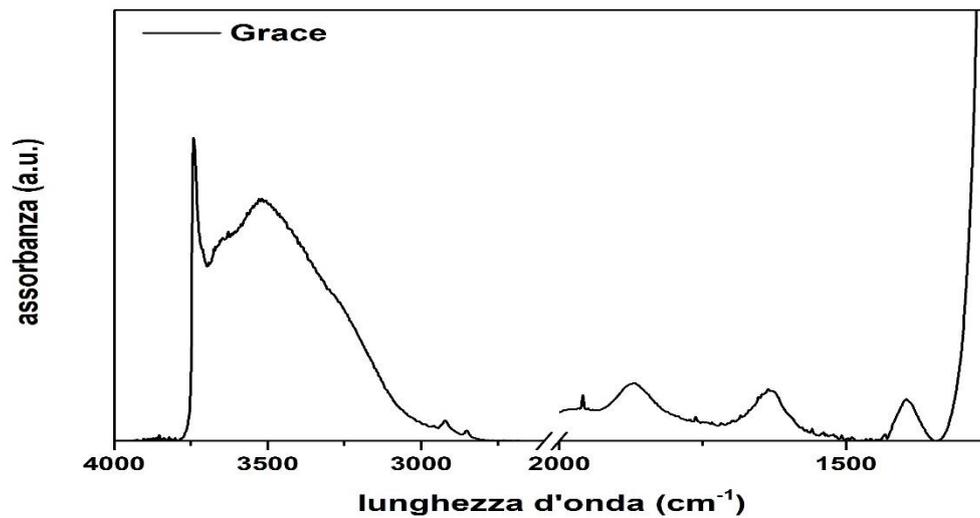


Figura 8.5 Spettro infrarosso del campione Grace.

8.2 Impregnazione della Grace mediante $scCO_2$

L'impregnazione mediante CO_2 supercritica del carrier a base silice è stata effettuata alle condizioni riportate da Ghaderi et al. [77] nell'articolo riguardante lo studio di un nuovo metodo per realizzare microparticelle polimeriche biodegradabili e intrappolare l'idrocortisone usando CO_2 supercritica. I parametri di processo utilizzati sono stati 130 bar e $45^\circ C$.

Il procedimento prevedeva inizialmente la preparazione delle pastiglie di Grace e idrocortisone aventi un diametro di circa 1 cm e un peso di 100 mg ciascuna mediante l'utilizzo di una piccola pressa. Quindi sono stati utilizzati dei cilindri di vetro per contenere le pastiglie. Il sistema è stato realizzato come rappresentato in figura 8.6.

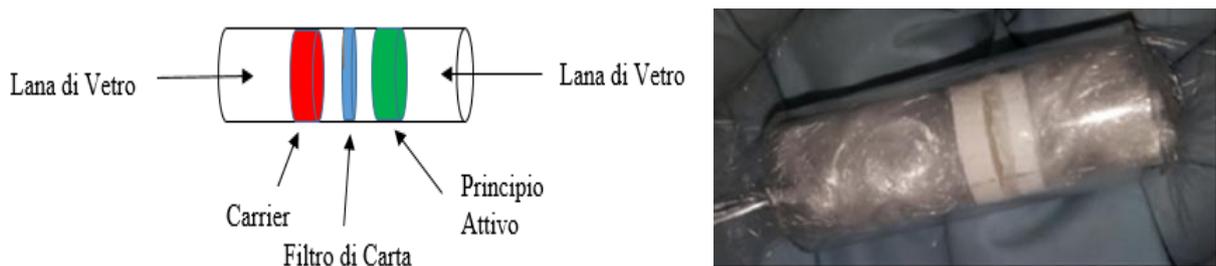


Figura 8.6 Composizione cilindretti per impregnazione con CO_2 supercritica.

Alle estremità del cilindro è stata posta della lana di vetro al fine di proteggere il sistema creato mentre il filtro di carta posizionato tra le 2 pastiglie evita il diretto contatto tra il carrier e il principio attivo.

Il cilindro quindi è stato posizionato nel vessel di acciaio inossidabile. Successivamente, è stata aggiunta anidride carbonica e l'impianto è stato scaldato fino alla temperatura di $45^\circ C$ e portato alla pressione di 130 bar. La durata della prova è stata di 8 ore al fine di permettere la dissoluzione del principio attivo e l'impregnazione del supporto a base silice. Dopo questo tempo, il sistema è stato portato alla temperatura ambiente e depressurizzato. Infine è stato

estratto il vessel dalla fornace, prelevati i cilindri, estratti i materiali ed effettuata la caratterizzazione.

8.2.1 Caratterizzazione del campione Grace_HC_scCO₂

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Dall'analisi FT-IR del campione di Grace impregnato con idrocortisone mediante CO₂ supercritica si può osservare l'assenza di picchi riconducibili al principio attivo. Ciò è indice di una assenza di interazioni tra i 2 materiali dovuta ad una bassa solubilità del farmaco in anidride carbonica supercritica [59]. Infatti il grafico 8.7 ricalca perfettamente lo spettro infrarosso della Grace con la presenza di bande di assorbimento per la frequenza di 3740 cm⁻¹ e tra 3600 e 3300 cm⁻¹ assegnabili rispettivamente ai silanoli isolati e interagenti.

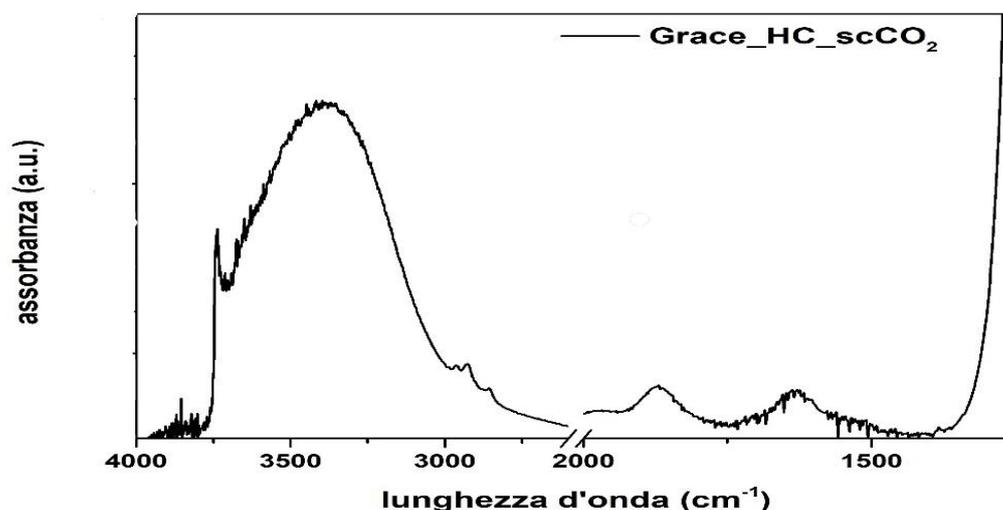


Figura 8.7 Spettro del campione Grace_HC_scCO₂.

Dalla letteratura non sono presenti articoli relativi a carrier che impregnano l'idrocortisone mediante questa tecnica. Tuttavia, Velaga et al. [78] osservarono che preparando particelle di idrocortisone mediante CO₂ supercritica esso agiva da anti solvente e alle condizioni di 130 bar e 45°C si ottenevano delle strutture cristalline di farmaco. Quindi, si dimostrò che con questa tecnica era possibile ottenere microparticelle cristalline perché una sovrasaturazione controllata seguita da veloce nucleazione portava ad una formazione di cristalli con caratteristiche simili ai cristalli di idrocortisone che si formano mediante metodi tradizionali.

Per garantire una impregnazione del carrier col principio attivo al fine di ottenere una fase metastabile e amorfa si è agito in maniera differente, ovvero con un metodo di impregnazione tradizionale, al fine di permettere un adsorbimento dell'idrocortisone sulla matrice, come descritto nel paragrafo successivo.



8.3 Impregnazione della Grace mediante Incipient Wetness Impregnation (IWI)

Il metodo Incipient wetness impregnation (IWI) consiste nell'impregnare il carrier con un volume di solvente pari al volume dei pori.

Per mettere in pratica l'impregnazione bisogna considerare 2 parametri: il pore volume del carrier e la solubilità del farmaco nel solvente scelto per preparare la soluzione.

Infatti il volume dei pori della matrice ci permette di conoscere la quantità di soluzione da utilizzare mentre il parametro di solubilità ci consente di predire la solubilità di un soluto (nel nostro caso il principio attivo) in un solvente.

Il primo parametro si ottiene mediante analisi di adsorbimento di azoto, mentre il secondo confrontando diversi solventi e scegliendo il solvente organico che scioglie meglio il soluto. In questo caso è stato scelto etanolo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) acquistato dalla Sigma Aldrich Italia. Dai dati indicati presso Drug Bank [79] è possibile osservare come a temperatura ambiente la solubilità del principio attivo nell'etanolo è di 15 mg/ml.

La modalità di preparazione prevista è stata la seguente: inizialmente è stata preparata la soluzione in opportuni matracci. Quindi è stato pesato 1 grammo di Grace e versato in un becher. Successivamente, grazie ad una pipetta, che permetteva di far gocciolare la soluzione con la quantità esatta, il carrier è stato impregnato con 1,29 ml di soluzione dato che il pore volume della Grace è di 1,29 cc/g. Poi veniva fatto evaporare il solvente e effettuate altre impregnazioni fino a raggiungere il valore desiderato di farmaco in peso con cui si voleva impregnare la matrice.

Nel caso della Grace sono stati caricati 2 diversi quantitativi teorici di farmaco: uno attorno al 16% e uno al 10% in massa.

8.3.1 Caratterizzazione del campione Grace_16HC

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Dallo spettro FT-IR del campione Grace_16HC, figura 8.8, si osserva la presenza di bande di assorbimento non esclusive della sola silice. Infatti si notano delle bande, relative all'idrocortisone, per valori tra 3000 e 2850 cm^{-1} riconducibili allo stretching dei legami C-H alifatici e dei picchi a 1710 e 1640 cm^{-1} circa, assegnabili il primo al carbonile del gruppo carbossilico e il secondo al carbonile dell'anello e ai doppi legami C=C [73].

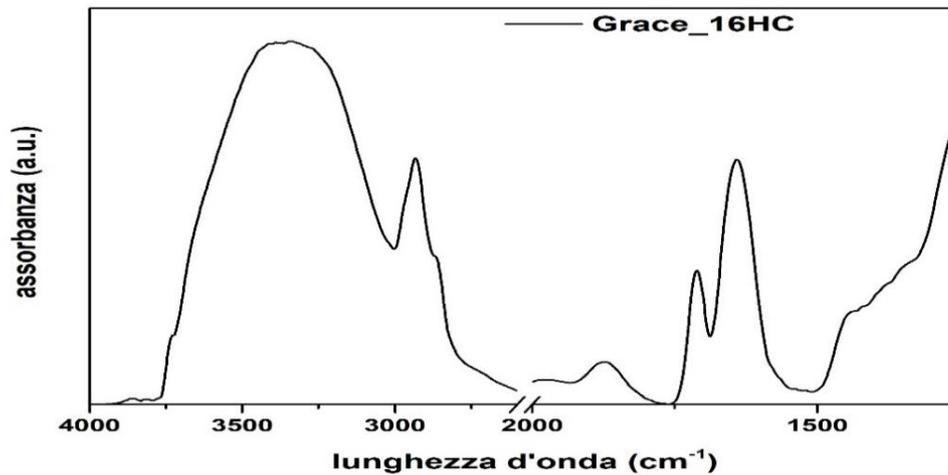


Figura 8.8 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC.

- Diffrazione a raggi X

Lo spettro XRD in figura 8.9 relativo al campione Grace_16HC indica la presenza di una fase cristallina del farmaco a seguito di picchi per valori di 2θ di $14,5^\circ$ e $17,5^\circ$.

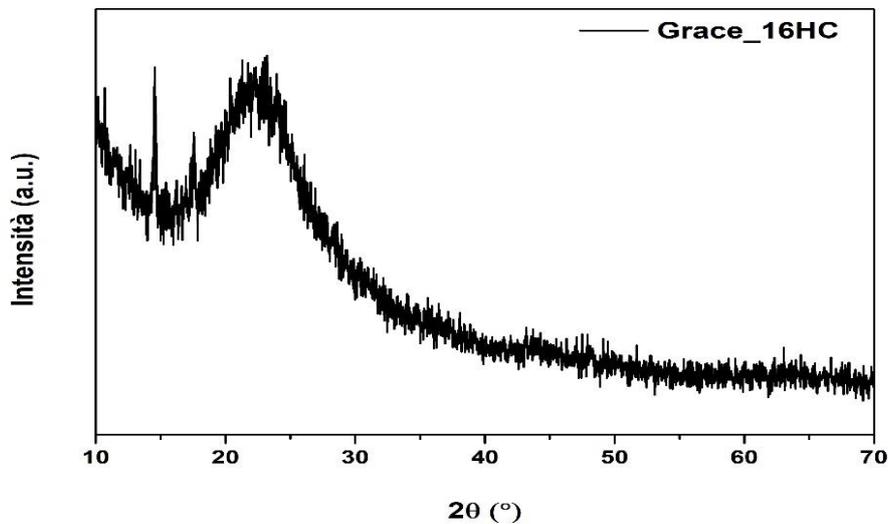


Figura 8.9 Spettro XRD del campione Grace_16HC.

- Analisi di adsorbimento di azoto

L'isoterma del campione Grace_16HC, presente in figura 8.10, mostra un andamento del tipo IV, tipico dei materiali mesoporosi, simile a quello del materiale tal quale.

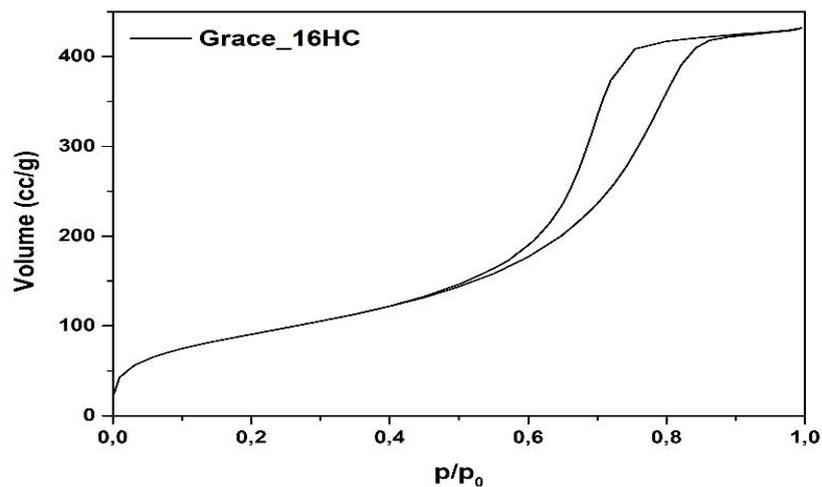


Figura 8.10 Isotherma di adsorbimento del campione Grace_16HC.

Mediante modello DFT sono stati ricavati i valori di diametro medio dei pori, area superficiale, e volume dei pori mostrati nella tabella 8.2.

Tabella 8.2 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC.

Area Superficiale specifica	335 m ² /g
Volume dei pori	0,68 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	7,9 nm

- Analisi Termogravimetrica

L'analisi TG sul campione Grace_16HC mostra innanzitutto una perdita di peso di circa il 7% a seguito di desorbimento di specie presenti sulla superficie e perdita di silanoli. Successivamente, dalla temperatura di circa 225°C si ha una perdita di peso prima con pendenza modesta e poi, a circa 300/320°C, in maniera ripida fino a 600°C oltre il quale si ha un plateau. Il peso finale del campione è circa il 77% rispetto al campione iniziale.

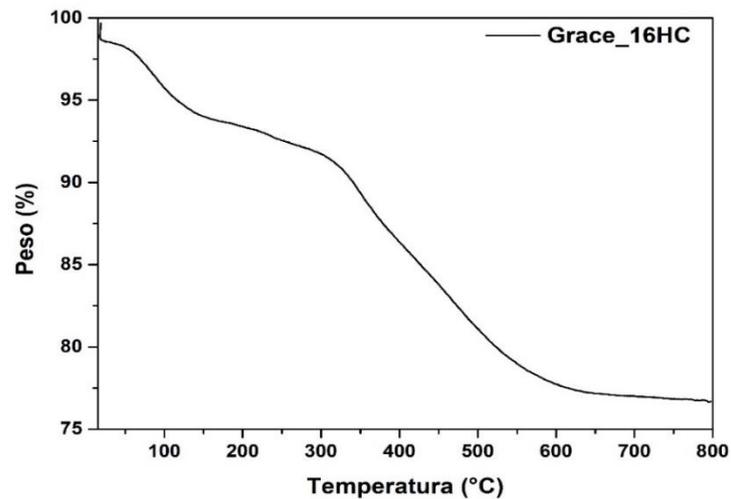


Figura 8.11 Curva termogravimetrica del campione Grace_16HC.

8.3.2 Confronto tra Grace e Grace_16HC

- Diffrazione a raggi X

La presenza dell'idrocortisone nel campione Grace_16HC si può evidenziare dai picchi di cristallinità presenti per i valori di 2θ a $14,5^\circ$ (cerchi blu) e $17,5^\circ$ (cerchi verdi). Di conseguenza si è avuta una impregnazione del farmaco ma questo è rimasto almeno in parte allo stato cristallino.

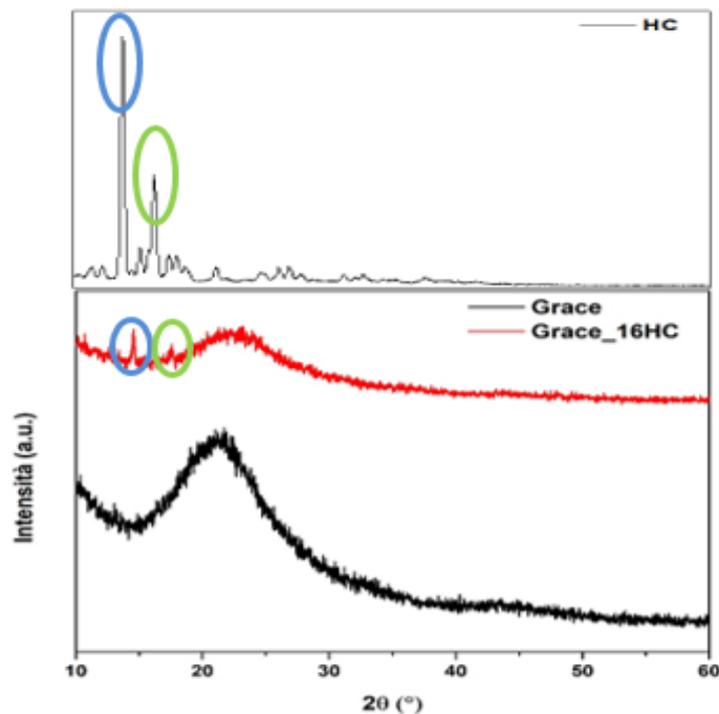


Figura 8.12 Confronto spettri diffrattometrici Grace, Grace_16HC e Idrocortisone.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Il confronto fra gli spettri infrarossi dei campioni Grace, Grace_16HC e Idrocortisone evidenzia la presenza di interazione tra la silice e il principio attivo. Innanzitutto si può notare la quasi totale assenza del modo vibrazionale del silanolo isolato per il campione impregnato. Quindi si ha una banda molto più larga dei silanoli interagenti con un massimo tra 3500 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} . Altre bande assenti nel campione Grace ma presenti in quello Grace_16HC sono quelle attribuibili allo stretching dei legami C-H alifatici tra i 3000 e i 2850 cm^{-1} . Andando per lunghezze d'onda minori si notano delle bande di assorbimento a 1710 e 1640 cm^{-1} relativi al C=O del gruppo carbossilico e al carbonile dell'anello con il doppio legame C=C dell'idrocortisone. Sotto i 1500 cm^{-1} si ha una banda non molto intensa assente nello spettro della sola matrice ma presente nello spettro del farmaco, confermando che dell'idrocortisone si trova nella Grace.

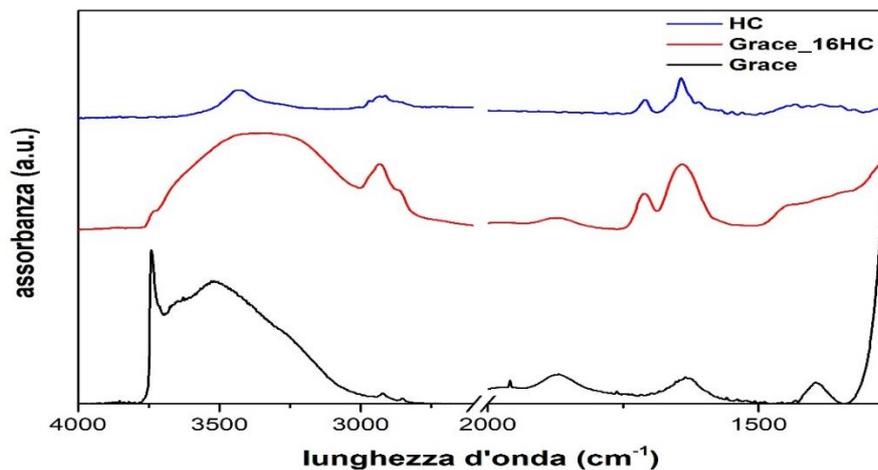


Figura 8.13 Confronto spettri infrarossi Grace e Grace_16HC.

- Analisi di adsorbimento di azoto

L'isoterma di adsorbimento del campione dopo impregnazione di idrocortisone è notevolmente cambiata. Infatti, dalla figura 8.14, si nota sia una diminuzione del volume libero, data la presenza del principio attivo, ma anche una modifica della forma del coppia di isteresi, presentandosi più larga e meno lunga. La pendenza del campione impregnato nel tratto tra 0,1 e 0,3 p/p_0 è meno pendente e ciò indica una diminuzione dell'area superficiale specifica. Questo parametro infatti si è dimezzato dopo impregnazione passando da $732\text{ m}^2/\text{g}$ a $335\text{ m}^2/\text{g}$.

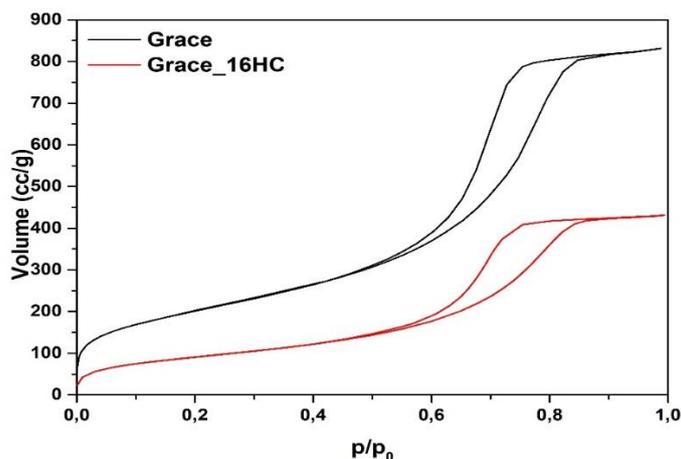


Figura 8.14 Confronto isoterme di adsorbimento Grace e Grace_16HC.

Un altro valore che diminuisce di circa la metà è il pore volume. Tale risultato è attribuibile alla occupazione o occlusione dei pori da parte dell'idrocortisone. Il confronto dei valori è riportato in tabella 8.3.

Tabella 8.3 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace e Grace_16HC.

	Grace	Grace_16HC
Area Superficiale specifica	732 m ² /g	335 m ² /g
Volume dei pori	1,29 cm ³ /g	0,68 cm ³ /g
Diametro dei pori	7,6 nm	7,9 nm

- Analisi Termogravimetrica

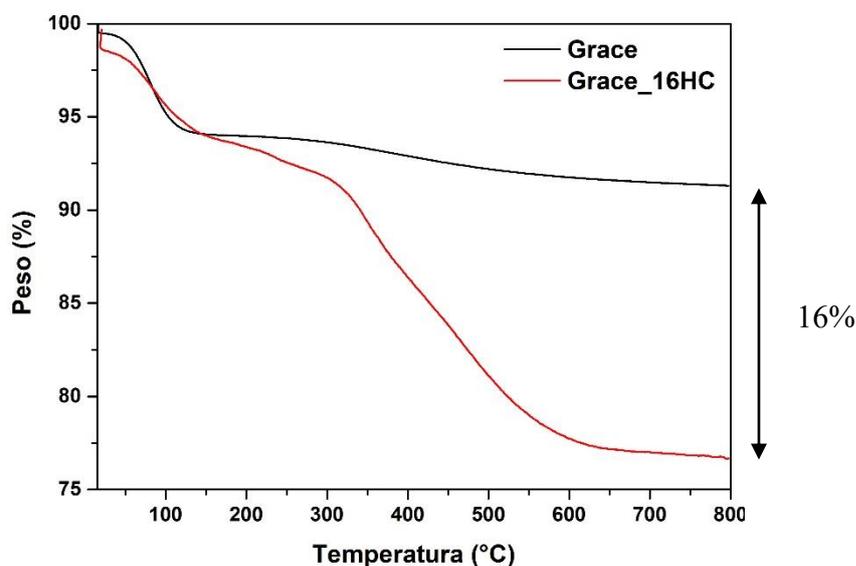


Figura 8.15 Confronto curve termogravimetriche Grace e Grace_16HC.

Il confronto tra le curve termogravimetriche della Grace e della Grace_16HC evidenzia fino ad una temperatura di 220° C un comportamento simile assegnabile al fisisorbimento di specie adsorbite sulla superficie e perdita di silanoli da parte della silice. Successivamente il campione con idrocortisone tende a perdere peso in maniera drastica a seguito della fusione e decomposizione dell'idrocortisone fino a 600°C in cui si raggiunge un plateau. Il peso finale di questo campione è il 76% di quello iniziale. Considerando che circa l'8/9 % è la perdita di peso della sola matrice, la differenza è circa il 15/16% ovvero la quantità teorica di farmaco che è stata introdotta mediante Incipient Wetness Impregnation.

8.3.3 Caratterizzazione del campione Grace_10HC

Data la presenza della fase cristallina nel campione vista in precedenza è stato preparato un sistema carrier/farmaco avente soltanto il 10% in massa del farmaco al fine di osservare se una minore carica del principio attivo possa creare le condizioni per avere una amorfizzazione all'interno del supporto. Quindi è stata effettuata un'analisi XRD, in quanto è la tecnica principale per stabilire la fase solida del campione.

- Diffrazione ai raggi X

Lo spettro di diffrazione relativo al campione Grace_10HC mostra come sia sempre presente il picco per il valore di 2θ di 14,5° e seppur in maniera poco intensa anche quello a 17,5°.

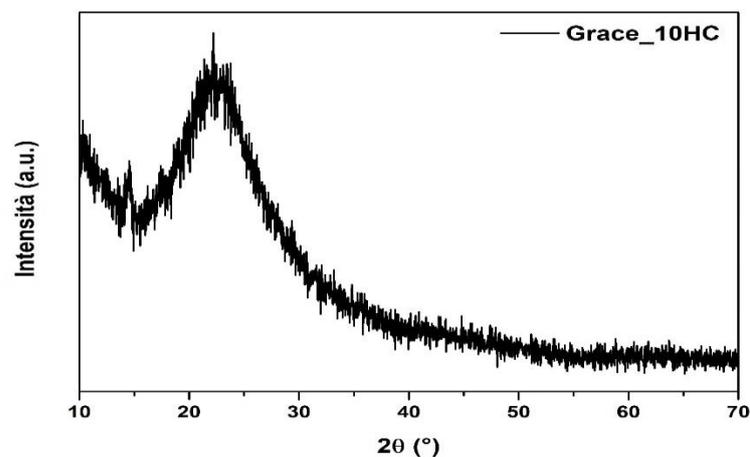


Figura 8.16 Spettro XRD del campione Grace_10HC.

8.3.4 Confronto tra Grace_16HC e Grace_10HC

- Diffrazione a raggi X

Confrontando i due campioni è possibile osservare, con gli spettri in figura 8.17, un abbassamento dei picchi di cristallinità dell'idrocortisone nel campione contenente solo il 10% in peso del principio attivo. In particolare considerando il rapporto tra l'intensità del picco del farmaco e quello amorfo della Grace si ha un evidente variazione dell'intensità relativa. Infatti il rapporto tra i picchi nel campione Grace_16HC è più marcato rispetto al sistema con meno

farmaco. Questo confermerebbe che aumentando il quantitativo di principio attivo nella matrice si va verso una condizione di cristallizzazione, come enunciato da Wei et al.[45].

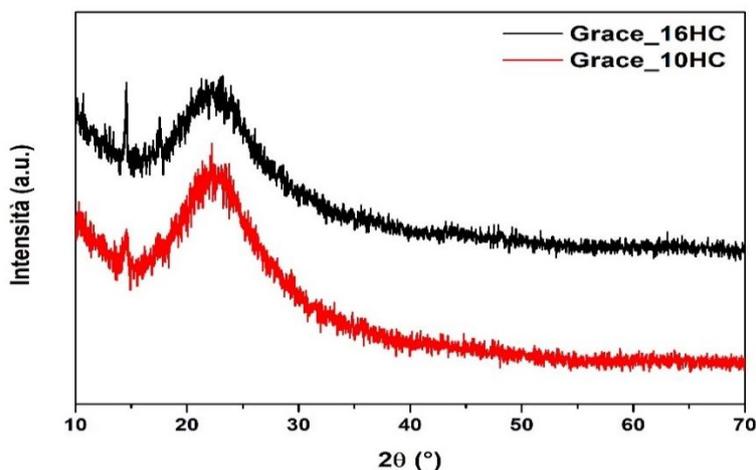


Figura 8.17 Confronto degli spettri XRD Grace_16HC e Grace_10HC.

8.3.5 Effetto del tempo sul campione Grace_16HC

Nel corso dell'attività di tesi sperimentale si è cercato di capire se nel tempo vi fosse un fenomeno di amorfizzazione del farmaco all'interno della Grace. Per cui parte del campione Grace_16HC è stato lasciato invecchiare in un luogo asciutto, secco e buio per 50 giorni. Passato questo tempo, sono state effettuate analisi di diffrazione ai raggi X, analisi termogravimetrica, analisi di adsorbimento di azoto e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier sul campione nominato **Grace_16HC_Invecchiato**, i cui risultati sono riportati in questa sezione.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

La figura 8.18 mostra lo spettro dell'analisi FT-IR del campione invecchiato avente il 16% in massa di idrocortisone. Intorno a 3740 cm^{-1} c'è un piccolo picco attribuibile alla presenza di silanoli isolati, quindi la banda dei silanoli interagenti tra 3600 e 3300 cm^{-1} e poco sotto i 3000 cm^{-1} dei modi vibrazionali dei gruppi $-\text{CH}$. A 1710 cm^{-1} si ha il picco del carbonile del gruppo carbossilico che interagisce con gli ossidrili dei silanoli presenti sulla superficie creando delle interazioni intermolecolari mentre a 1640 cm^{-1} vi è un picco con valore di assorbanza più alto rispetto alla banda precedentemente descritta perché è un involuppo del carbonile dell'anello e del doppio legame $\text{C}=\text{C}$. Sotto i 1500 cm^{-1} vi sono delle bande riferibili all'idrocortisone anche se non estremamente evidenti in quanto si trovano a frequenze in cui sono presenti anche quelli della silice.

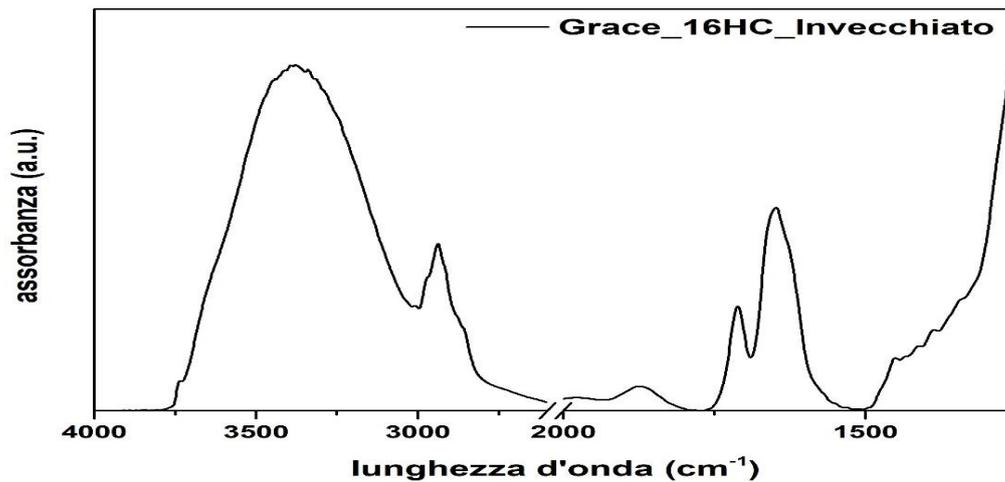


Figura 8.18 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_Invecchiato.

- Diffrazione a raggi X

Dalla diffrazione ai raggi X si osserva la presenza di un picco per il valore di 2θ di $14,5^\circ$ con una intensità maggiore rispetto al picco della Grace. Tuttavia non sono presenti i picchi di cristallinità tipici dell'idrocortisone per valori di 2θ di $16,5^\circ$ e $17,5^\circ$.

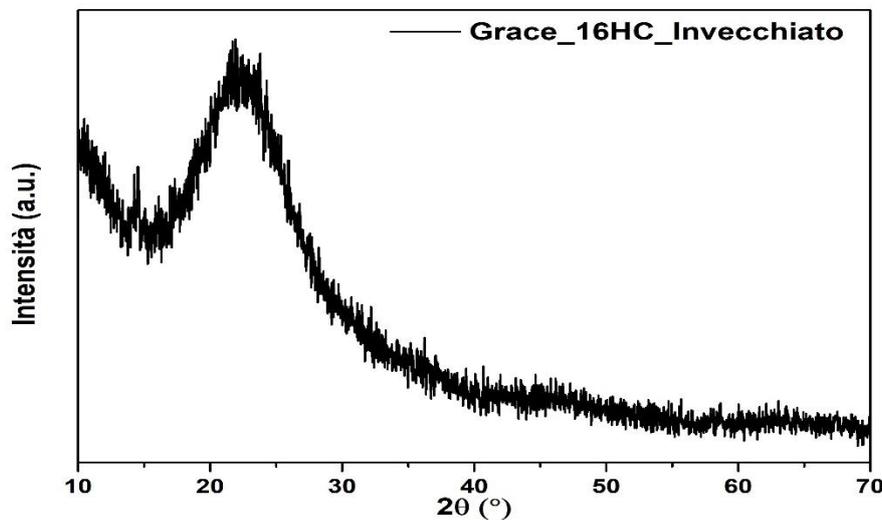


Figura 8.19 Spettri XRD del campione Grace_16HC_Invecchiato.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Mediante analisi di adsorbimento di azoto in condizione isoterme a 77 K si ottiene come varia il volume in funzione di p/p_0 . Nella figura 8.20 è rappresentata l'isoterma:

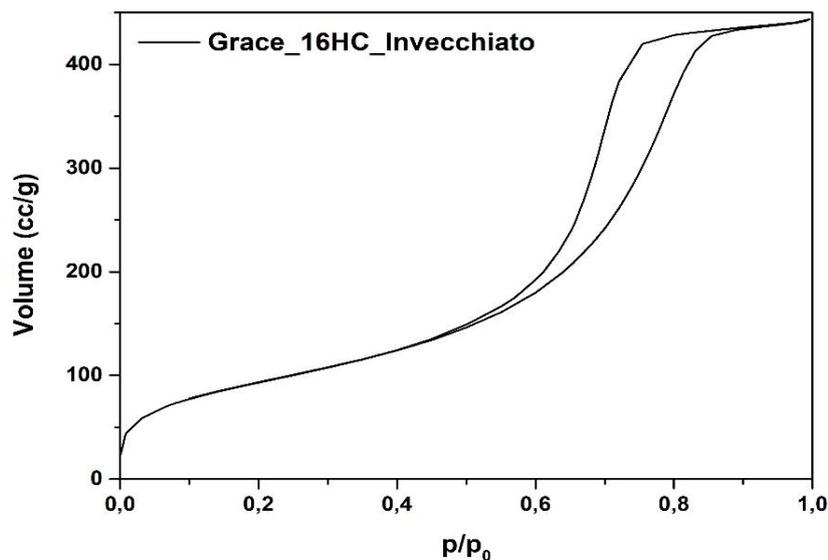


Figura 8.20 Isotherma di adsorbimento del campione Grace_16HC_Invvecchiato.

Si ha un andamento diverso tra la fase di adsorbimento e quella desorbimento di azoto indice di un materiale mesoporoso. Il coppia di isteresi non assume una forma tipica alle tipologie discusse nel paragrafo 6.2 e questo indica una forma dei pori irregolare dopo trattamento di invecchiamento nel tempo. Nel tratto in cui vi è la formazione del monostato si calcola l'area superficiale il cui valore come riportato in tabella 8.4 è di 345 m²/g. Altri parametri ricavati tramite il modello DFT e riportati in tabella sono il pore volume e il diametro medio dei pori.

Tabella 8.4 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC_Invvecchiato.

Area Superficiale specifica	345 m ² /g
Volume dei pori	0,68 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	8 nm

- Analisi Termogravimetrica

Dall'analisi termogravimetrica si osserva un fenomeno di desorbimento di specie precedentemente fisisorbite sui siti attivi superficiali del supporto fino ad una temperatura di 200 °C, comportamento tipico della Grace. Questa perdita di peso è stata stimata essere circa il 7%. Quindi si nota un cambiamento della pendenza della curva a seguito di una degradazione dell'idrocortisone. Vi sono 2 diverse pendenze: dai 220 °C ai 320°C si ha un tratto decrescente poco ripido, probabilmente dovuto alla decomposizione della fase amorfa. Quindi un tratto avente una ripidità accentuata fino a circa 600°C, oltre il quale si ha un plateau. Alla fine si ha una perdita di peso del 77,5 %, il 7% dovuto a specie adsorbite sulla silice e il restante 15,5/16% dovuto alla degradazione della molecola organica.

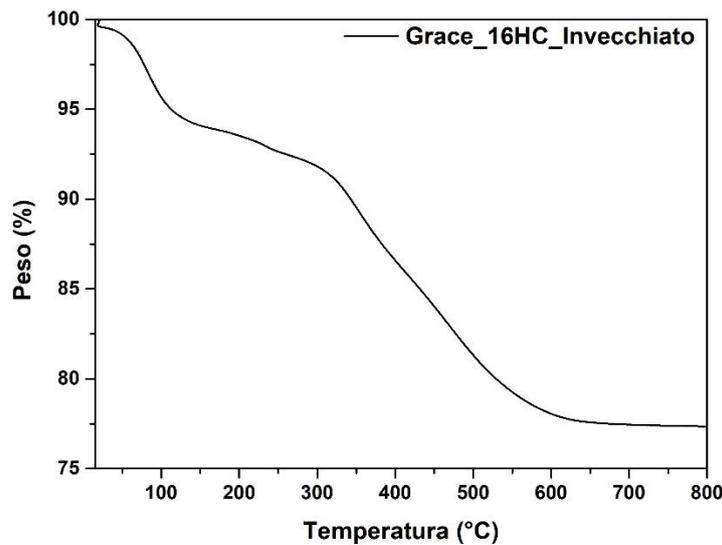


Figura 8.21 Curva termogravimetrica del campione Grace_16HC_Invecchiato.

8.3.6 Confronto tra Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato

- Diffrazione a raggi X

Dal confronto degli spettri diffrattometrici si osserva una diminuzione del picco di cristallinità per valore di 2θ di $14,5^\circ$ per il campione invecchiato. Ciò si può facilmente notare considerando le intensità relative tra il picco di cristallinità del principio attivo e quello della silice amorfa, preso come punto di riferimento. Il campione esaminato subito dopo impregnazione ha un rapporto maggiore rispetto allo stesso sottoposto ad un fenomeno di invecchiamento in luogo asciutto. Questo conferma alcuni studi, tra i quali quello di Juere et al. [44], su come il tempo influisca sulla amorfizzazione del farmaco all'interno della matrice di silice mesoporosa.

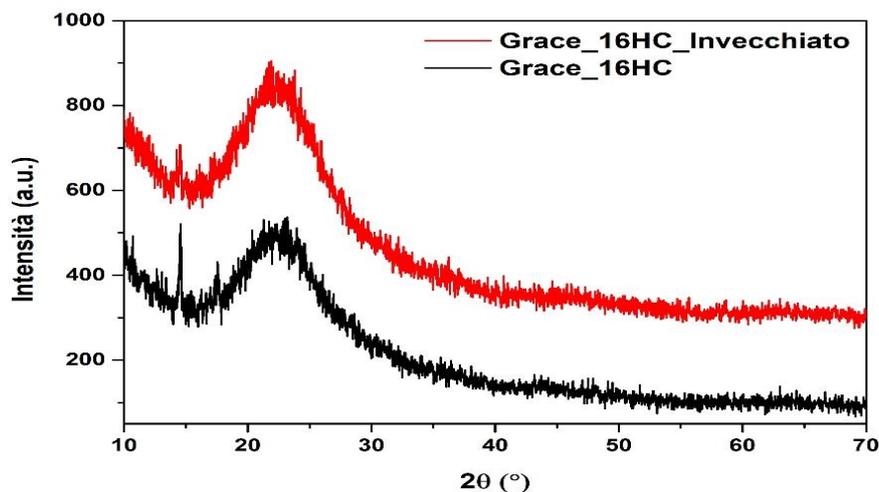


Figura 8.22 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Dalla Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier non si notano evidenti differenze tra i 2 spettri confrontati in figura 8.23.

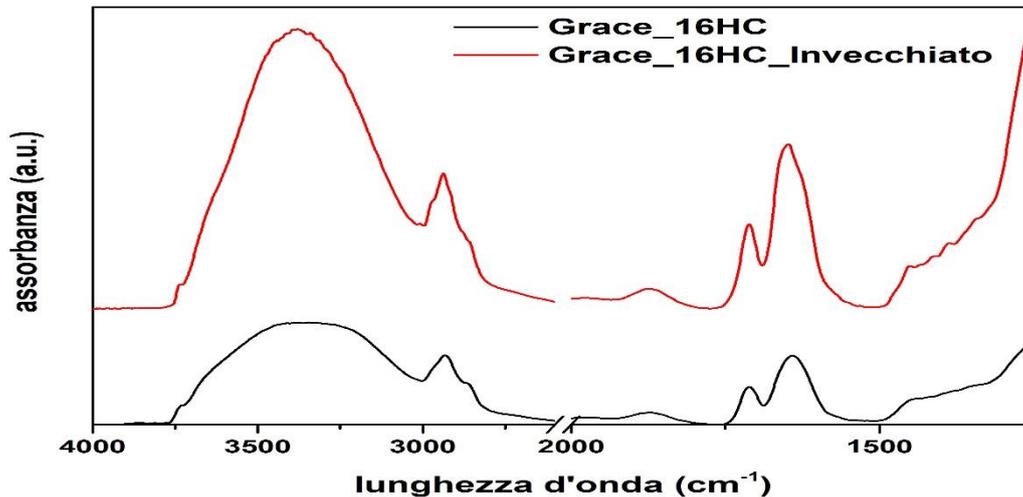


Figura 8.23 Confronto spettri infrarossi Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Il comportamento delle isoterme di adsorbimento di azoto è praticamente uguale. Entrambe hanno lo stesso andamento sia durante adsorbimento che desorbimento e la forma del cappio si mantiene identica. L'area superficiale si mantiene la stessa e ciò indica che il numero di siti attivi prima e dopo effetto del tempo rimane uguale così come il volume dei pori non subisce modifiche a seguito di invecchiamento.

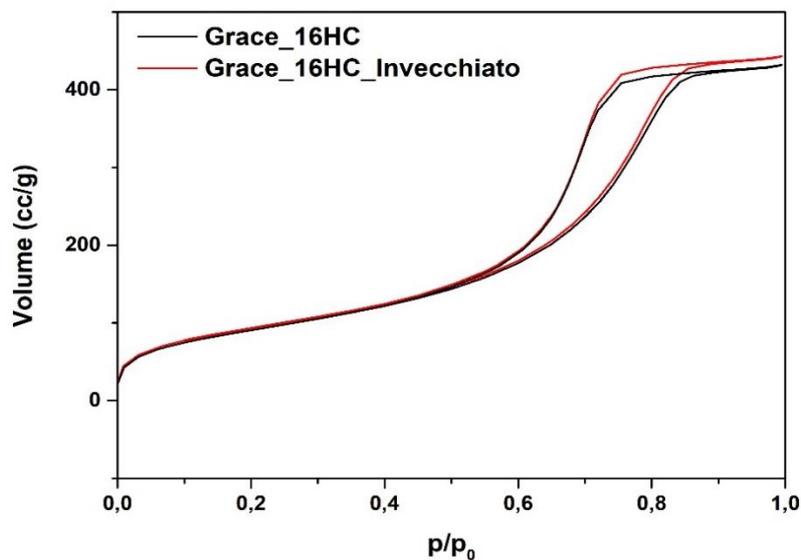


Figura 8.24 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.

Tabella 8.5 Confronto Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.

	Grace_16HC	Grace_16HC_Invecchiato
Area Superficiale specifica	335 m ² /g	345 m ² /g
Volume dei pori	0,68 cm ³ /g	0,68 cm ³ /g
Diametro dei pori	7,9 nm	8 nm

- Analisi Termogravimetrica

Accostando le curve termogravimetriche dei campioni Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato si ha una perfetta sovrapposizione ad eccezione del primo tratto dove il campione trattato nel tempo tende ad avere a temperatura ambiente una perdita di peso, dovuta a specie desorbite dalla superficie, quasi nulla.

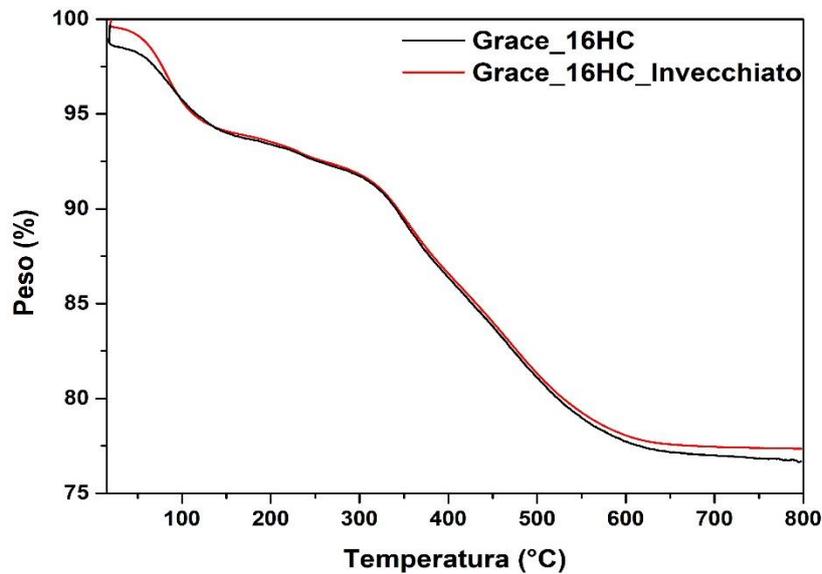


Figura 8.25 Confronto curve termogravimetriche Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.

8.3.7 Effetto dell'umidità e del tempo sul campione Grace_16HC

Contemporaneamente al periodo in cui parte del campione Grace_16HC è stato fatto invecchiare, un'altra porzione è stata posta nell'essiccatore presente in figura 8.26, in presenza di acqua. Il campione è stato distribuito omogeneamente su un vetrino per garantire che la polvere fosse alla tensione di vapore dell'acqua. Dopo 50 giorni sono state effettuate le analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, diffrazione ai raggi X e analisi di adsorbimento di azoto sul campione identificato **Grace_16HC_Umido**.



Figure 8.26 Essiccatore utilizzato per invecchiamento in ambiente umido.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Come mostra la figura 8.27, il campione Grace_16HC_Umido ha un debole picco a 3740 cm^{-1} e una banda larga tra 3500 e 3200 cm^{-1} causati dalla presenza di ossidrili isolati e interagenti, rispettivamente. Quindi, sono anche presenti i modi dello stretching dei legami C-H tra 3000 e 2850 cm^{-1} , mentre a 1710 cm^{-1} si ha lo stretching del legame carbonile del gruppo carbossilico soggetto ad interazioni intermolecolari con due legami idrogeno. La banda di assorbimento ad alto valore di assorbanza visibile per la frequenza di 1643 cm^{-1} è attribuibile all'altro carbonile presente nella molecola dell'idrocortisone ma anche ai doppi legami carbonio-carbonio.

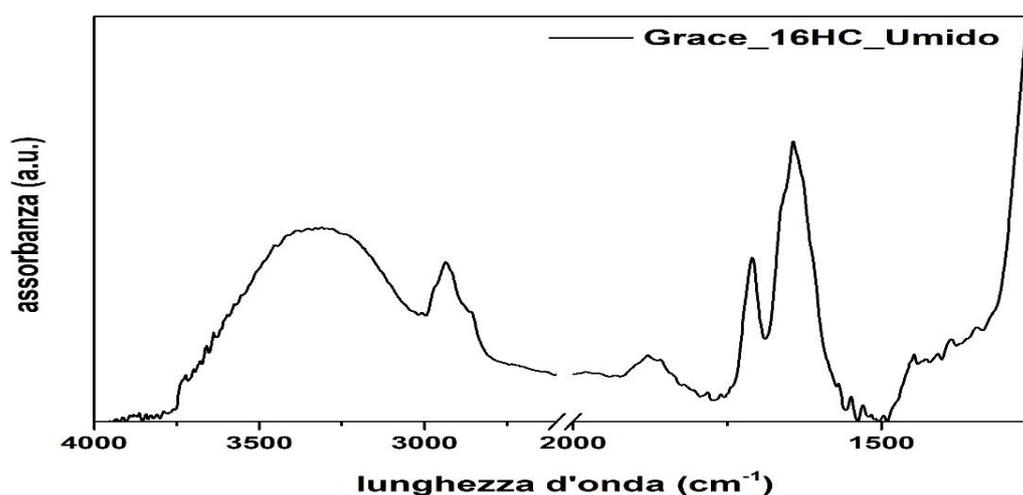


Figura 8.27 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_Umido.

- Diffrazione a raggi X

Dallo spettro di diffrazione ai raggi X (figura 8.28) si nota un elevato picco per il valore di $2\theta = 14,5^\circ$ ed uno di intensità di circa la metà rispetto al primo a $17,5^\circ$ indicanti la presenza di uno stadio cristallino del principio attivo nel carrier.

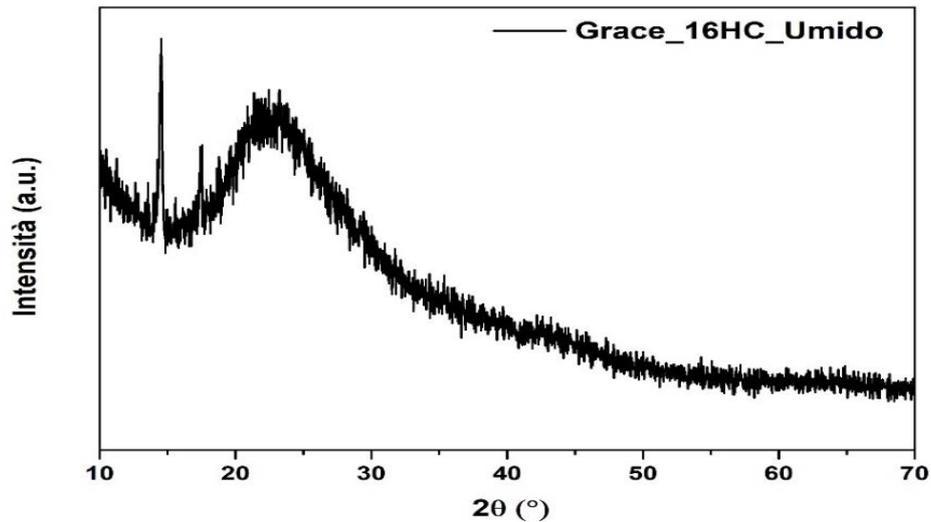


Figura 8.28 Spettro diffrattometrico del campione Grace_16HC_Umido.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Nella figura 8.29 viene riportata l'isoterma di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC_Umido. Si osserva un andamento della curva di tipo IV ed un cappio di isteresi attribuibile a fenomeni di condensazione capillare. La forma del cappio non è riferibile a nessuna delle forme standard proposte dalla IUPAC e questo conferma la presenza di pori con geometria disordinata.

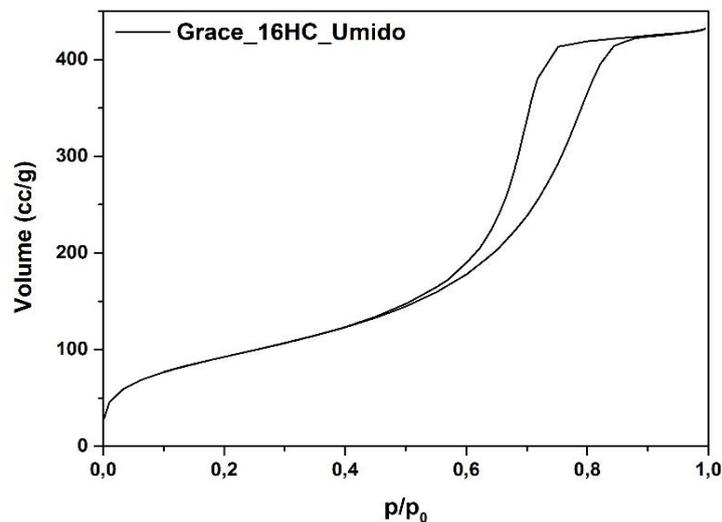


Figura 8.29 Isotherma di adsorbimento del campione Grace_16HC_Umido.

Mediante questa tecnica si hanno anche informazioni su area superficiale, volume dei pori e diametro dei pori i cui valori sono illustrati nella tabella 8.6.

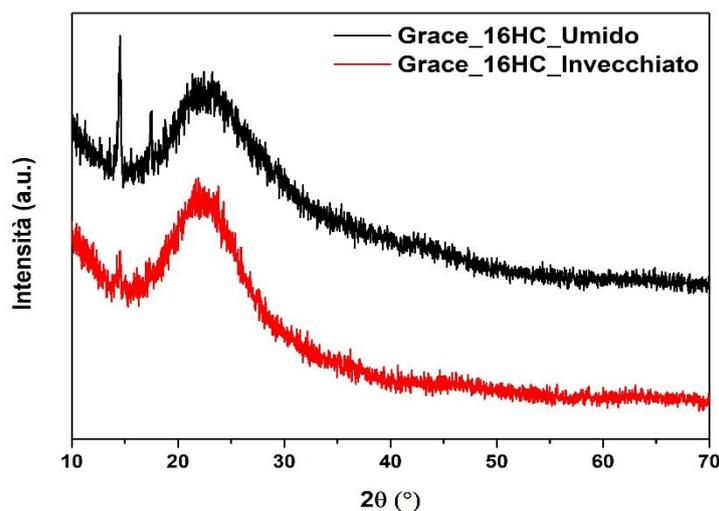
Tabella 8.6 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto della Grace_16HC_Umido.

Area Superficiale specifica	339 m ² /g
Volume dei pori	0,67 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	7,85 nm

8.3.8 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido

- Diffrazione a raggi X

Il confronto degli spettri XRD dei campioni Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido, riportati in figura 8.30 evidenzia come i due differenti effetti applicati su uno stesso campione iniziale portino a risultati diversi. Infatti mentre l'analisi diffrattometrica del campione lasciato invecchiare per 50 giorni mostra una diminuzione del picco di cristallinità dell'idrocortisone tendendo ad una amorfizzazione del farmaco. Lo spettro XRD del campione mantenuto alla tensione di vapore per lo stesso tempo comporta, invece, un aumento del picco di cristallinità.

**Figura 8.30** Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Dalla spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier non abbiamo delle informazioni riguardanti le differenze dei due campioni in quanto essi hanno le stesse bande di assorbimento come riportato in figura 8.31. L'unica differenza sta nel fatto che il campione Grace_16HC_Umido ha un modo vibrazionale a 1640 cm⁻¹ che in rapporto alla banda dei silanoli è maggiore rispetto al campione invecchiato. Essendo che questa è la zona in cui cadono i modi vibrazionale della molecola H₂O [73] questo potrebbe essere dovuto non solo all'interazioni intermolecolari del carbonile della molecola dell'anello e alla presenza di doppi legami C=C ma anche ad una certa quantità di acqua che durante il trattamento è rimasta intrappolata tra il carrier e il principio attivo. L'acqua infatti può interagire con gli ossidrili presenti in superficie ma anche con il carbonile della molecola alla presenza di acqua nel sistema. Tuttavia andando in parte ad occupare i siti attivi superficiali non permette alle molecole di farmaco di formare lo stesso numero di legami con la superficie e ciò potrebbe

portare ad un aumento delle interazioni intermolecolari tra i gruppi del farmaco con conseguente crescita della fase cristallina.

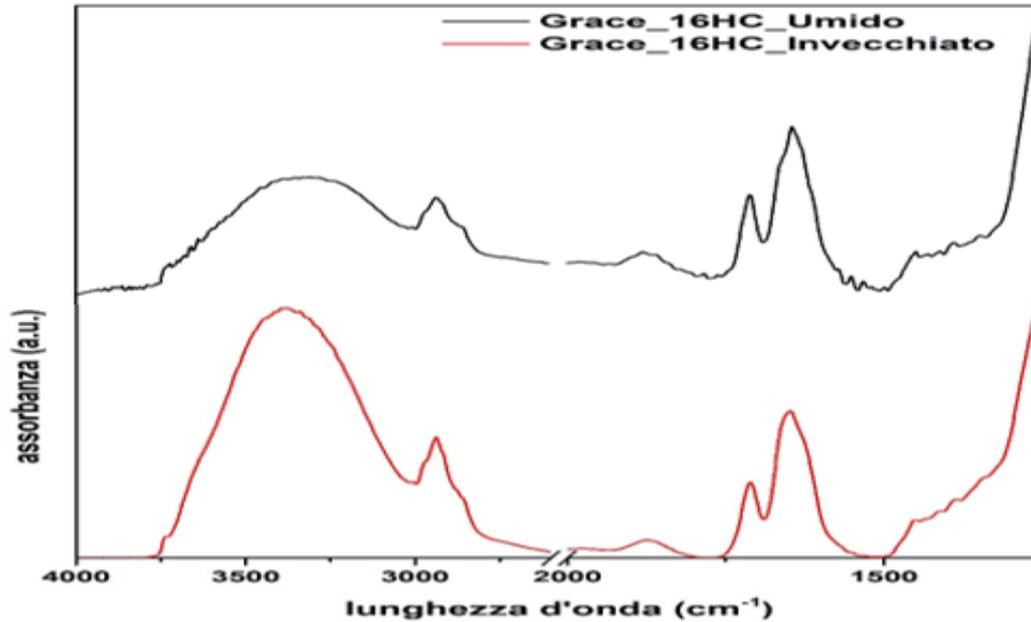


Figura 8.31 Confronto spettri infrarossi Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Come si osserva dal grafico 8.32, le isoterme sono perfettamente sovrapponibili con un tratto di curva tra 0,1 e 0,3 p/p_0 uguale ad indicare il fatto che l'area superficiale specifica si mantiene costante. Anche il coppia di isteresi non evidenzia variazioni tra i due campioni deducendo così che la geometria disordinata dei pori è identica in entrambi i sistemi.

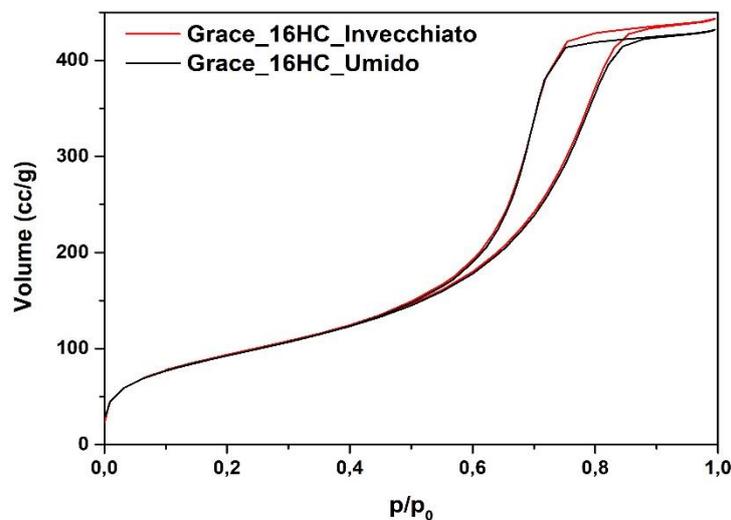


Figura 8.32 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido.

Rimangono inalterati anche tutti gli altri valori visibili in figura 8.7.

Tabella 8.7 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Umido e Grace_16HC_Invecchiato.

	Grace_16HC_Umido	Grace_16HC_Invecchiato
Area Superficiale specifica	339 m ² /g	345 m ² /g
Volume dei pori	0,67 cm ³ /g	0,68 cm ³ /g
Diametro dei pori	7,9 nm	8 nm

8.3.9 Effetto della Temperatura sul campione Grace_16HC

Un altro parametro valutato per capire il comportamento del principio attivo all'interno di matrici a base silice è stata la temperatura. Parte del campione Grace_16HC è stato sistemato omogeneamente in un contenitore di vetro e posto in una stufa per 8 ore alla temperatura di 70°C. Questa Temperatura è stata scelta per evitare la fusione dell'idrocortisone che, come indicato nel paragrafo 4.1.1, si ha a 220-225°C. Successivamente anche su questo nuovo campione, identificato come **Grace_16HC_70°_8h**, sono state effettuate analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, Diffrattometria ai raggi X e adsorbimento di azoto.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Come si osserva in figura 8.33, lo spettro infrarosso del campione Grace_16HC_70°_8h mostra un andamento simile a quello degli altri campioni esaminati in precedenza con la presenza del picco dei silanoli isolati a 3740 cm⁻¹ e la banda dei silanoli interagenti avente un massimo intorno a 3400 cm⁻¹ tipici dei carrier a base silice. Quindi sono presenti i modi vibrazionali dei legami C-H del farmaco per valori tra 3000 e 2850 cm⁻¹ con lo stretching di intensità maggiore a 2937 cm⁻¹. A 1710 cm⁻¹ si ha lo stretching del legame carbonile del gruppo carbossilico mentre il picco più alto a circa 1640 cm⁻¹ è l'involuppo del carbonile legato all'anello e dei doppi legami C=C. I modi vibrazionali, piuttosto deboli, alle lunghezze d'onda di 1400-1300 cm⁻¹ sono riconducibili all'impronta digitale dell'idrocortisone.

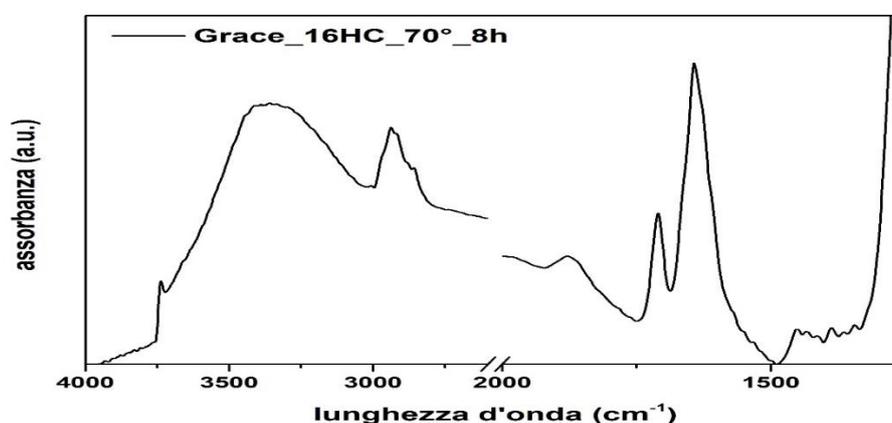


Figura 8.33 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_70°_8h.

- Diffrazione a raggi X

L'analisi diffrattometrica del campione Grace_16HC_70°_8h evidenzia la presenza di una fase cristallina del principio attivo dati i picchi per valori di 2θ di $14,5^\circ$ e $17,5^\circ$.

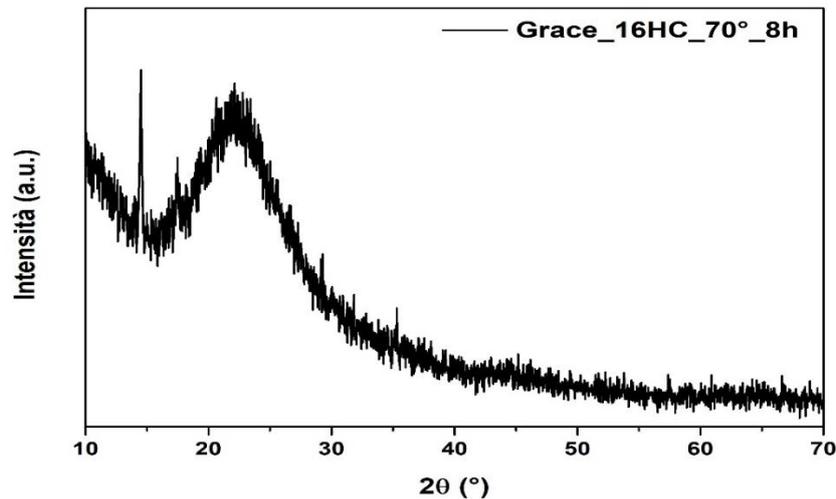


Figura 8.34 Spettro diffrattometrico del campione Grace_16HC_70°_8h.

- Analisi di adsorbimento di azoto

L'isoterma di adsorbimento di azoto a 77 K, figura 8.35, del campione Grace_HC_10IWI_70_8h ha un andamento di tipo IV secondo la classificazione IUPAC. La curva tipica del materiale mesoporoso è caratterizzata da una forma dei pori disordinata.

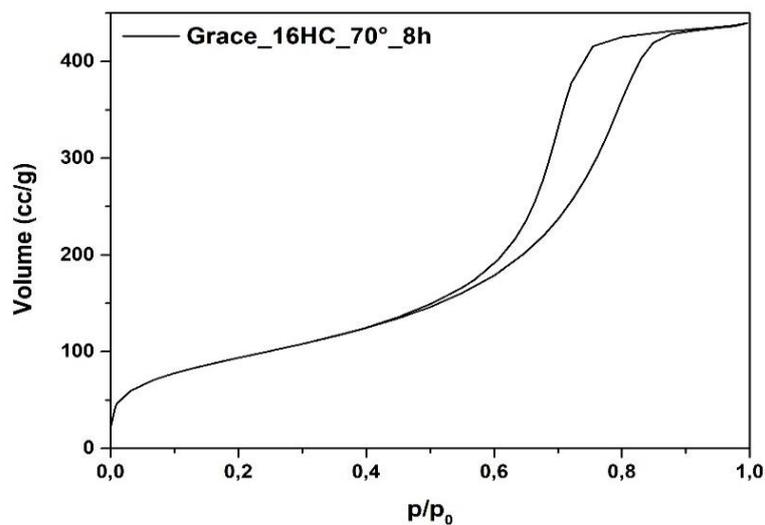


Figura 8.35 Isotherma di adsorbimento del campione Grace_16HC_70°_8h.

L'analisi di adsorbimento di azoto sul campione ha permesso di avere informazioni su alcune caratteristiche strutturali grazie all'utilizzo del modello DFT riportate nella tabella 8.8 presente in basso.

Tabella 8.8 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto della Grace_16HC_70°_8h.

Area Superficiale specifica	343 m ² /g
Volume dei pori	0,68 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	7,9 nm

8.3.10 Confronto tra Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h

- Diffrazione a raggi X

Dal confronto degli spettri diffrattometrici si evidenzia in entrambe lo stato cristallino ma a seguito di trattamento termico per 8 ore questa fase aumenta seppur di poco. Questo fenomeno è spiegabile considerando che con un aumento di temperatura si va verso una condizione di stabilità e, come anche dimostrato nel caso dell'ibuprofene, si ha una ricristallizzazione delle molecole del principio attivo sulla superficie di silice mesoporosa [42].

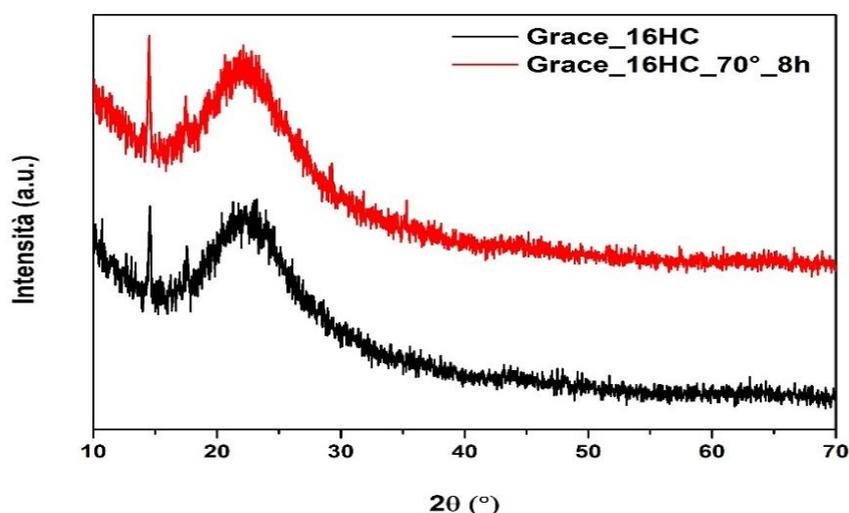


Figura 8.36 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Comparando i 2 spettri infrarossi relativi ai campioni Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h, confrontati in figura 8.37, si osserva un aumento del picco relativo agli ossidrili isolati nel caso del campione trattato termicamente. Infatti l'aumento di temperatura ha diminuito le interazioni tra il farmaco e la superficie di silice mesoporosa. Inoltre si osservano dei picchi più stretti a 1710 e 1640 cm⁻¹ indice di una maggiore cristallinità.

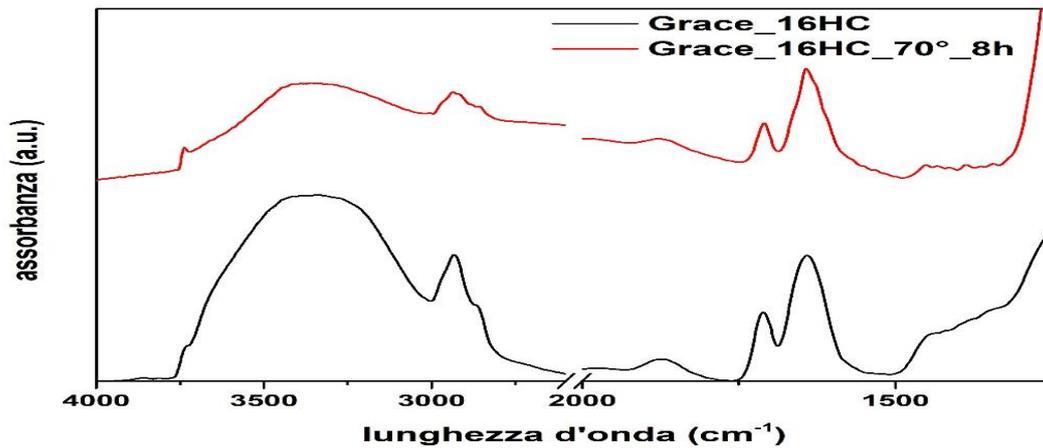


Figura 8.37 Confronto spettri infrarossi Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Il comportamento delle isoterme di adsorbimento di azoto è praticamente uguale. Entrambe hanno lo stesso andamento sia durante adsorbimento che desorbimento e la forma del cappio si mantiene identica. L'area superficiale specifica si mantiene uguale così come il volume dei pori non subisce modifiche a seguito di invecchiamento.

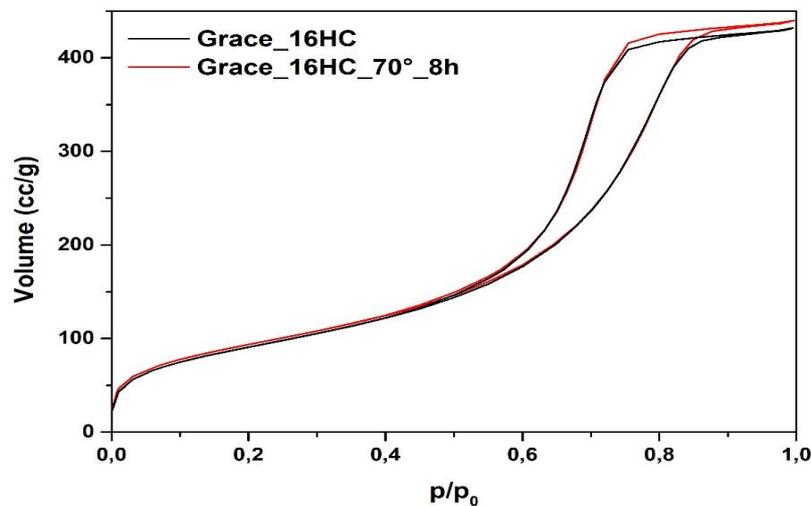


Figura 8.38 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h.

Tabella 8.9 Confronto Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h.

	Grace_16HC	Grace_16HC_70°_8h
Area Superficiale specifica	335 m ² /g	343 m ² /g
Volume dei pori	0,68 cm ³ /g	0,68 cm ³ /g
Diametro dei pori	7,9 nm	7,9 nm

9. CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI CON SUPPORTO SILICE MCM-41

L'altra silice trattata durante l'attività di tesi è anch'essa commerciale ma appartenente alla classe MCM-S. Il campione MCM-41 è quello dell'ACS MATERIAL.

9.1 Caratterizzazione dell'MCM-41

Il campione proveniente dall'azienda ACS-MATERIAL è stato sottoposto ad analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, Diffrazione ai raggi X e adsorbimento di azoto al fine di osservarne le caratteristiche.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

La figura 9.1 mostra come lo spettro infrarosso dell'MCM-41 abbia un aspetto tipico dei materiali a base di silice data la presenza di $-OH$ isolati per valore di lunghezza d'onda di 3745 cm^{-1} e una banda tra 3600 e 3300 cm^{-1} attribuibile ai silanoli interagenti.

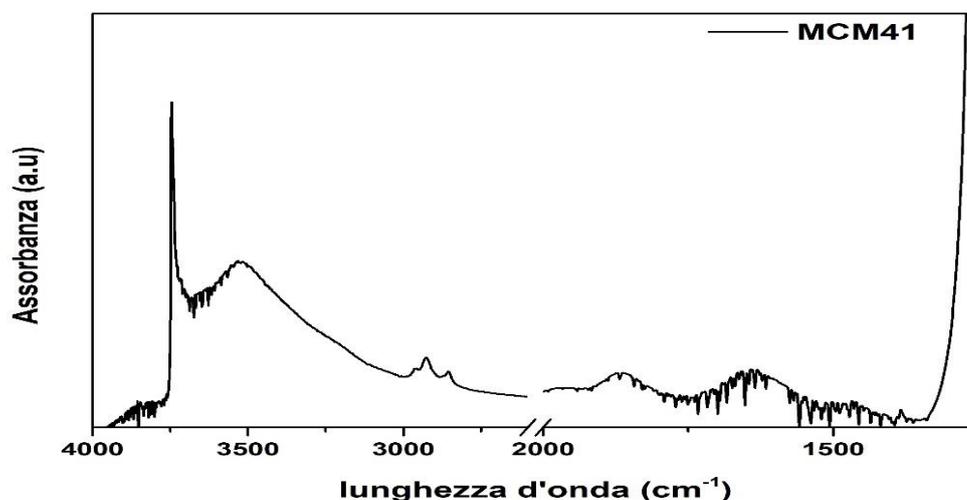


Figura 9.1 Spettro infrarosso della silice MCM-41.

- Diffrazione a raggi X

L'analisi diffrattometrica sull'MCM-41 dell'ACS MATERIAL è stata condotta sia per bassi che per alti angoli. Infatti, mentre per alti angoli l'aspetto sembrerebbe quello tipico di una silice amorfa con un picco allargato per valori di 2θ tra 20° e 25° per bassi angoli si osserva un picco a $2,5^\circ$ imputabile alla struttura ordinata a simmetria esagonale della silice.

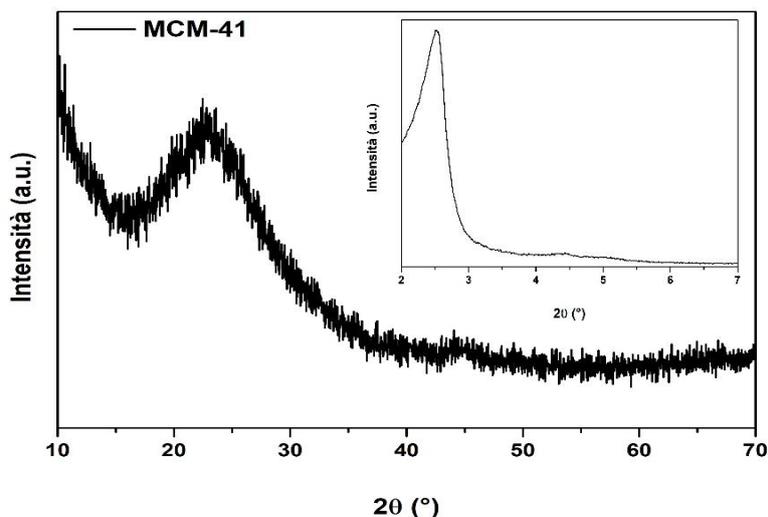


Figura 9.2 Spettro diffrattometrico MCM-41 ad alti e bassi angoli.

- Analisi di Adsorbimento di azoto

L'analisi di adsorbimento di azoto condotta sul campione di silice MCM-41 dell'ACS Material allo stato puro ha permesso di osservare una isoterma di tipo IV. Essendo una silice commerciale e non sinterizzata in laboratorio non ha una forma dei pori perfettamente regolare, infatti il coppia di isteresi non ci dà indicazioni sulla geometria dei pori. Ad alti p/p_0 , si osserva un nuovo coppia associabile a pori interparticellari di grandi dimensioni all'interno del quale si verifica il fenomeno della condensazione capillare.

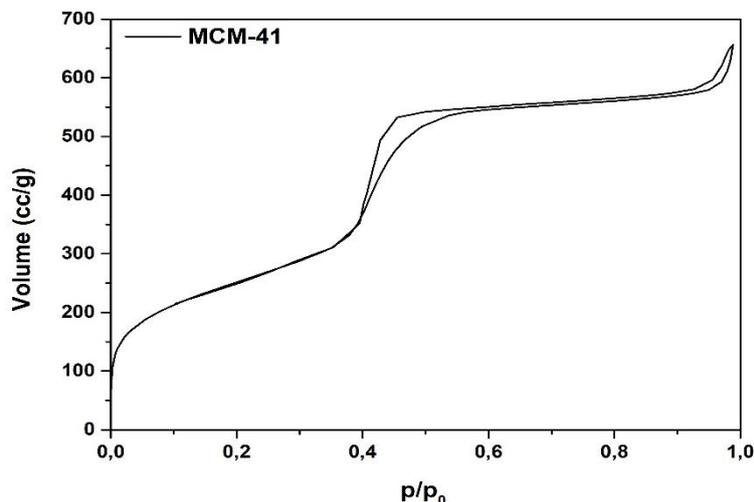


Figura 9.3 Isotherma di adsorbimento dell'MCM-41.

Il diametro medio dei pori è di 4,47 nm. Altri valori ottenuti utilizzando il metodo DFT sono riportati in tabella 9.1.

Tabella 9.1 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dell'MCM-41.

Area Superficiale specifica	907 m ² /g
Volume dei pori	1 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	4,47 nm

9.2 Impregnazione mediante CO₂ Supercritica dell'MCM-41

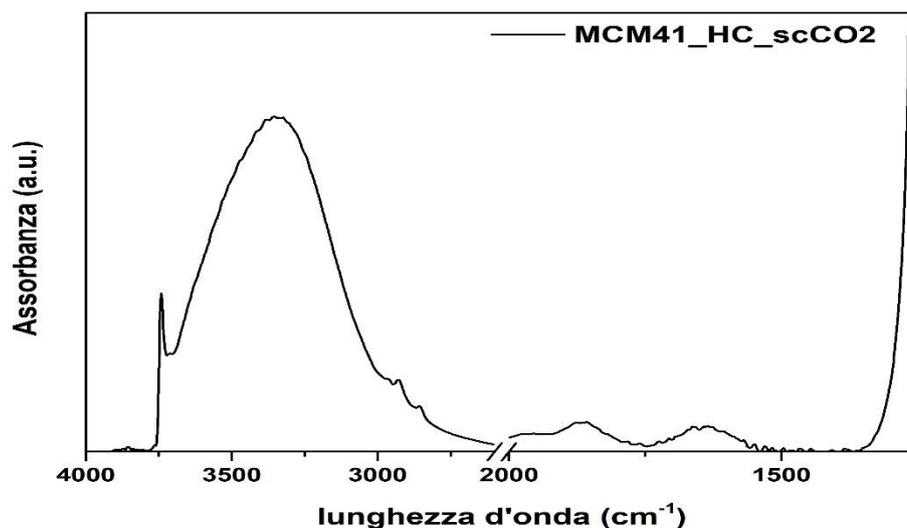
9.2.1 Caratterizzazione del campione MCM41_HC_scCO₂

La prova di impregnazione della silice MCM-41 con idrocortisone è stata condotta in maniera analoga a quella di impregnazione della Grace vista nel paragrafo 8.2. Le condizioni di processo utilizzate sono state:

- 130 bar;
 - 45°C;
 - 8h.
-
- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Dallo spettro ottenuto si osserva l'assenza di interazioni con il principio attivo ad indicare un non contatto tra il carrier e l'idrocortisone. Lo spettro, infatti, mostra solo i picchi della silice mesoporosa. Ciò probabilmente è dovuto alla bassa solubilità tra il soluto (farmaco) e il solvente (CO₂) che non garantisce la dissoluzione del principio attivo e il trasporto verso la matrice [59].

Successivamente, quindi è stato applicato un metodo di impregnazione tradizionale, come vedremo nel paragrafo successivo, al fine di permettere un adsorbimento del principio attivo sul carrier.

**Figura 9.4** Spettro infrarosso del campione MCM41_HC_scCO₂.

9.3 Impregnazione mediante Incipient Wetness Impregnation (IWI) dell'MCM41

Anche per l'MCM-41 commerciale dati gli scarsi risultati ottenuti dalla tecnica di incorporazione mediante CO₂ supercritica sono stati effettuati dei sistemi carrier/API mediante il metodo di Incipient Wetness Impregnation (IWI). L'iter per l'attività di laboratorio prevedeva dapprima la conoscenza del pore volume dell'MCM-41, che misurata da analisi di adsorbimento di azoto era 1 cm³/g, quindi la padronanza della solubilità dell'idrocortisone in etanolo, 15 mg/ml a 25°C dai dati indicati da Drug Bank [79].

Successivamente è avvenuta l'impregnazione di 1 grammo di silice. Per ogni impregnazione, tramite pipetta, 15 mg di HC venivano introdotti. Avvenuta l'evaporazione del solvente, si aggiungeva dell'altra soluzione fino a raggiungere il valore di farmaco desiderato.

Nel caso dell'MCM41 sono stati caricati 2 diversi quantitativi teorici di farmaco: uno attorno al 20% e uno al 10% in massa.

9.3.1 Caratterizzazione del campione MCM41_20HC

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Lo spettro del campione MCM41_20HC evidenzia la presenza del picco dei silanoli isolati a 3740 cm⁻¹ e la banda abbastanza stretta dei silanoli interagenti con valore di intensità massima raggiunta a 3407 cm⁻¹. Dai 3000 ai 2850 cm⁻¹ vi sono i modi vibrazionali dei legami C-H alifatici dell'idrocortisone, mentre il picco relativo al carbonile del gruppo carbossilico è presente a 1709 cm⁻¹. Alla lunghezza d'onda di 1640 cm⁻¹ si trova l'involuppo dato dal carbonile legato all'anello A del principio attivo e al doppio legame C=C presente nello stesso anello. Sotto i 1500 cm⁻¹ vi sono le fingerprints caratteristiche dell'idrocortisone.

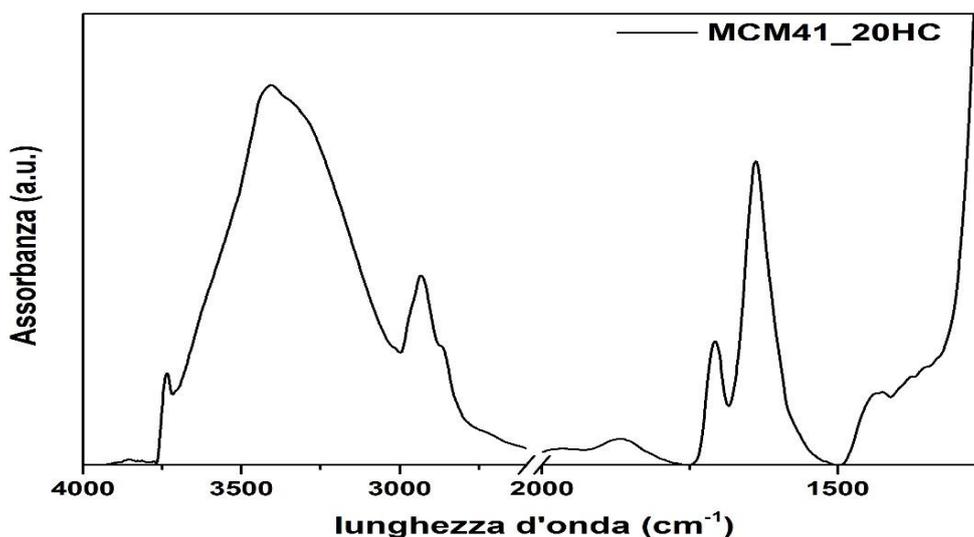


Figura 9.5 Spettro infrarosso del campione MCM41_20HC.

- Diffrazione a raggi X

L'analisi diffrattometrica condotta sul campione MCM41_20HC mostra un alto picco per il valore di 2θ a $14,5^\circ$ e uno un po' più basso a $17,5^\circ$ caratteristici dell'idrocortisone. Ciò indica la presenza di una fase cristallina nella matrice di silice mesoporosa.

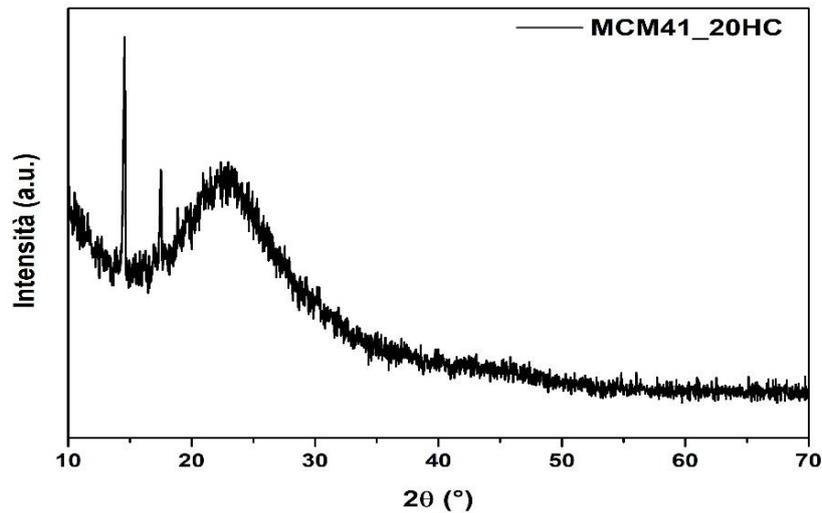


Figura 9.6 Spettro diffrattometrico del campione MCM41_20HC.

9.3.2 Confronto tra MCM-41 e MCM_20HC

- Diffrazione a raggi X

Dal confronto tra gli spettri diffrattometrici della figura 9.7 si evince chiaramente la differenza tra i 2 campioni. Dopo impregnazione sono presenti i picchi tipici del farmaco assenti nella sola matrice mentre per valori di 2θ oltre i 20° si ha un aspetto degli spettri pressochè uguale. Ciò indica chiaramente che parte del principio attivo è in condizioni cristalline.

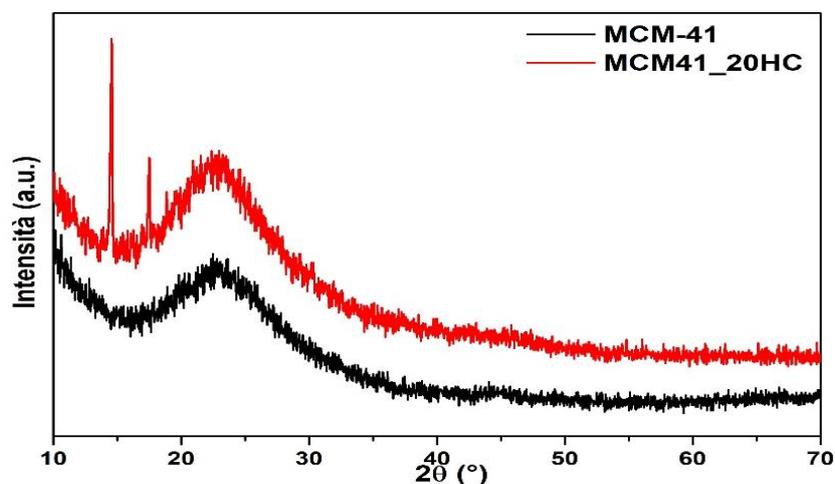


Figura 9.7 Confronto spettri diffrattometrici MCM-41 e MCM41_20HC.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Confrontando le curve dei due campioni ottenute mediante FT-IR si deduce l'interazione tra la silice mesoporosa MCM-41 e l'idrocortisone. Difatti vi sono le bande di assorbimento tipiche del farmaco e un modo vibrazionale degli ossidrili isolati che si riduce di intensità nel campione impregnato dimostrando un legame tra questi e il principio attivo. La zona sotto i 1500 cm^{-1} nel campione Grace_20HC è indicativa della presenza del farmaco perché si osservano dei picchi riconducibili all'idrocortisone, cerchiati in blu nella figura 9.8, che nello spettro del solo supporto sono assenti.

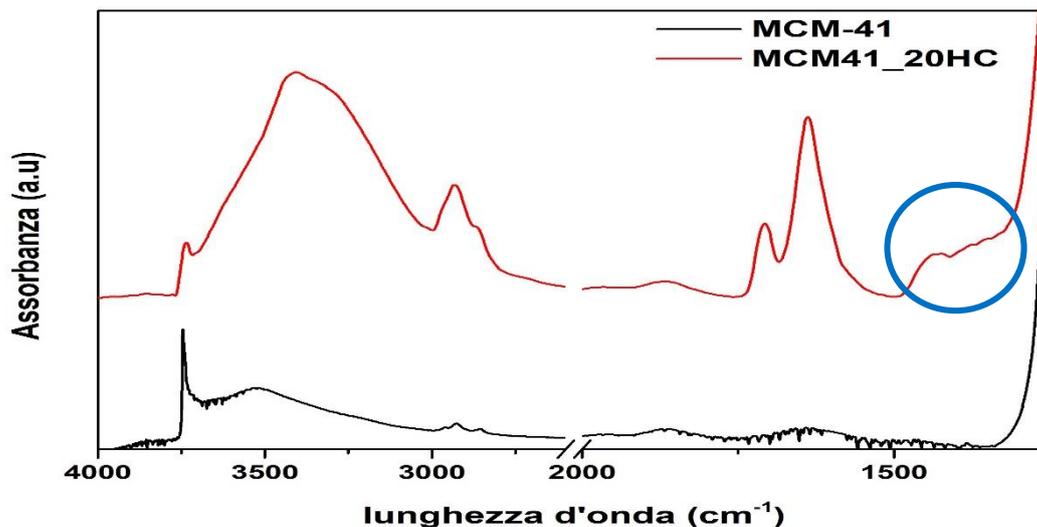


Figura 9.8 Spettri infrarossi MCM-41 e MCM41_20HC.

9.3.3 Caratterizzazione del campione MCM41_10HC

- Diffrazione a raggi X

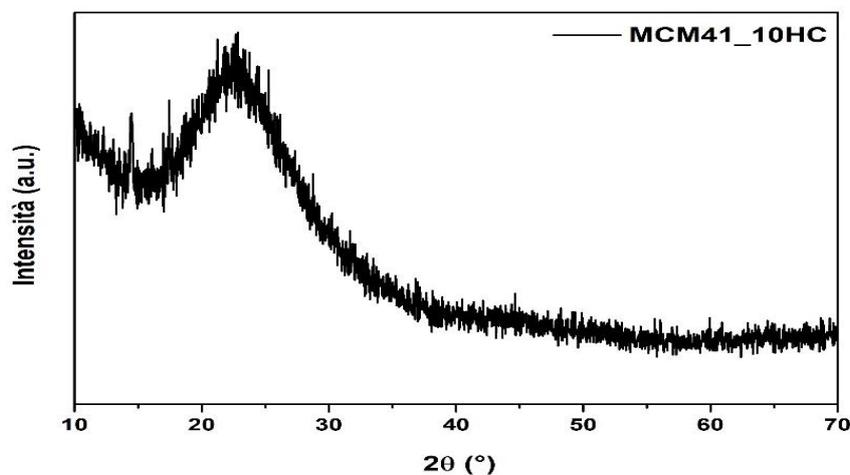


Figura 9.9 Spettro diffrattometrico del campione MCM41_10HC.

Lo spettro diffrattometrico presente in figura 9.9 mostra che nel sistema il farmaco non è, o almeno non lo è del tutto, allo stato amorfo dati i picchi di cristallinità presenti per valori di 2θ di $14,5^\circ$ e $17,5^\circ$.

9.3.4 Confronto tra MCM41_20HC e MCM41_10HC

- Diffrattometria a raggi X

Confrontando gli spettri XRD dei due campioni, figura 9.10, si constata come il campione impregnato al 10% in massa di idrocortisone abbia picchi a $14,5^\circ$ e $17,5^\circ$ nettamente più bassi rispetto agli stessi picchi del campione MCM41_20HC. Questo indica che seppur nel campione MCM41_10HC è presente della fase cristallina questa è in quantità nettamente inferiore. In aggiunta, l'intensità dei due picchi nel sistema con meno principio attivo non è la metà del campione impregnato al 20% tale da far supporre come una sostanziale quantità si amorfizzi all'interno della matrice. Questa quota potrebbe essere vicina al 10% in massa.

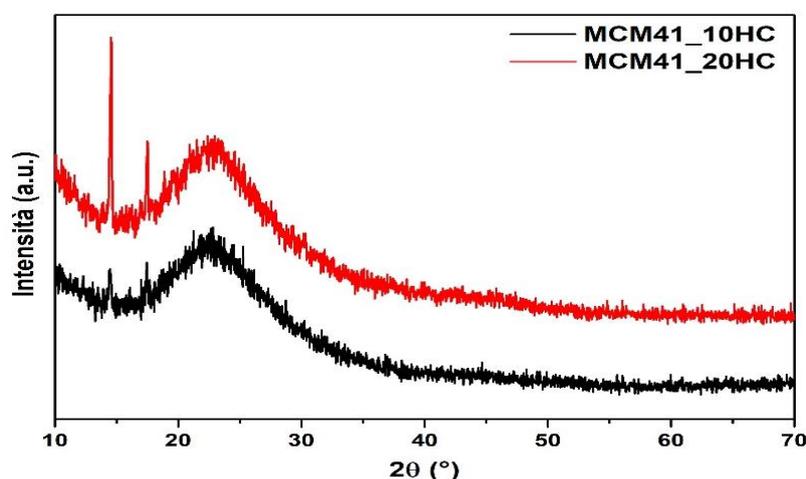


Figura 9.10 Confronto spettri diffrattometrici MCM41_10HC e MCM41_20HC.

9.3.5 Effetto del tempo sul campione MCM41_HC_20IWI

Così come per il campione Grace_10HC, anche il campione MCM41_20HC ha subito un invecchiamento per un tempo di circa 50 giorni al fine di valutare eventuali cambiamenti dello stato solido del principio attivo. Quindi parte del campione è stato messo all'interno di una provetta e lasciato in condizioni asciutte e buie. Trascorso il periodo, il nuovo campione, denominato **MCM41_20HC_Invecchiato** è stato sottoposto a spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, analisi di diffrattometria ai raggi X e analisi di adsorbimento di azoto.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

In figura 9.11 è presente lo spettro del campione invecchiato. Sono sempre presenti i modi vibrazionali corrispondenti allo stretching dei gruppi -CH per lunghezze d'onda di 2972 , 2938 e 2850 cm^{-1} . Inoltre si hanno altri 2 picchi per valori di 1709 e 1640 cm^{-1} corrispondenti rispettivamente al carbonile del gruppo carbossilico e al carbonile legato all'anello A

dell'Idrocortisone. Inoltre, quest'ultima banda ha un valore di assorbanza elevato perché per questa frequenza cadono anche i modi vibrazionali dei doppi legami C=C.

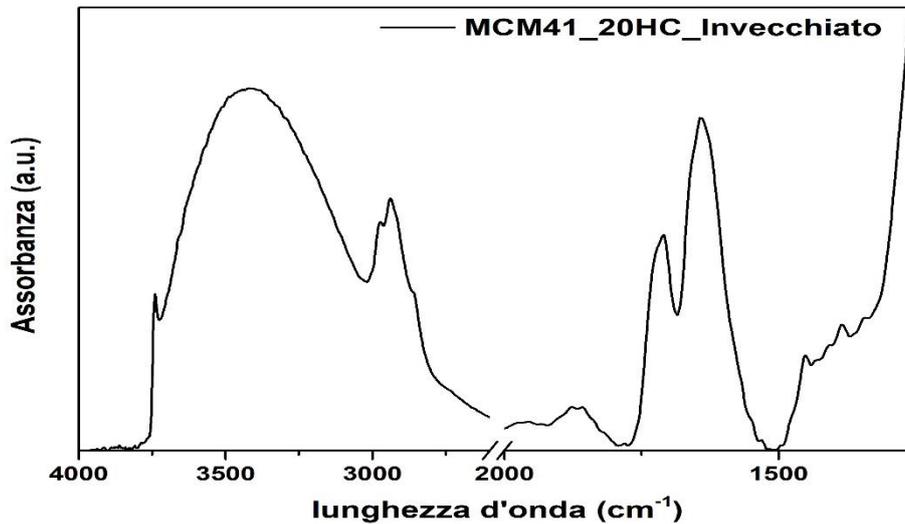


Figura 9.11 Spettro infrarosso del campione MCM41_20HC_Invecchiato.

- Diffrazione ai raggi X

L'XRD, riportato in figura 9.12, mostra l'esistenza di una fase cristallina dell'idrocortisone all'interno della matrice a base silice, dato che i noti picchi del farmaco sono presenti.

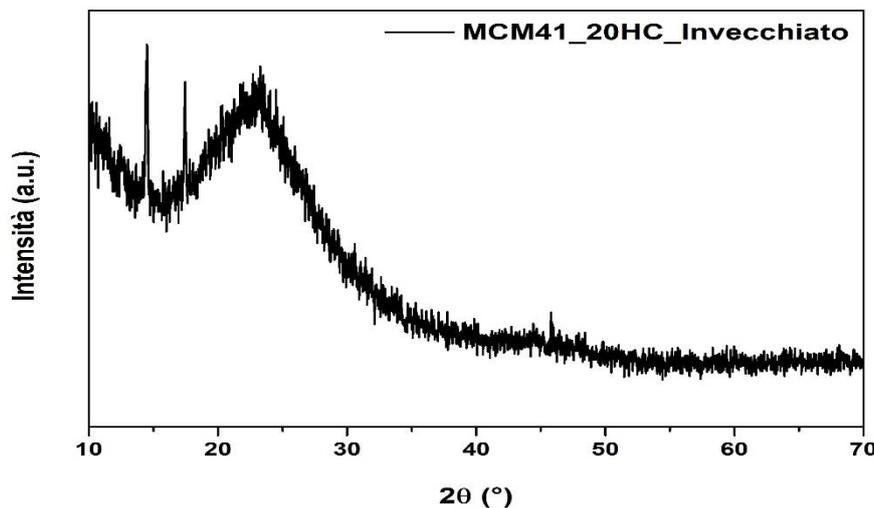


Figura 9.12 Spettro diffrattometrico del campione MCM41_20HC_Invecchiato.

- Analisi di adsorbimento di azoto

L'isoterma presente in figura 9.13 mostra un andamento di tipo IV secondo la classificazione IUPAC tipica dei materiali mesoporosi. Essa ha un coppia di isteresi di forma irregolare che non dà indicazioni sulla forma geometrica dei pori. Per valori di p/p_0 alti sembra esserci un

ulteriore cappio di isteresi dovuto alla condensazione capillare che si ha in corrispondenza dei pori interparticellari della silice, anche se poco accentuato.

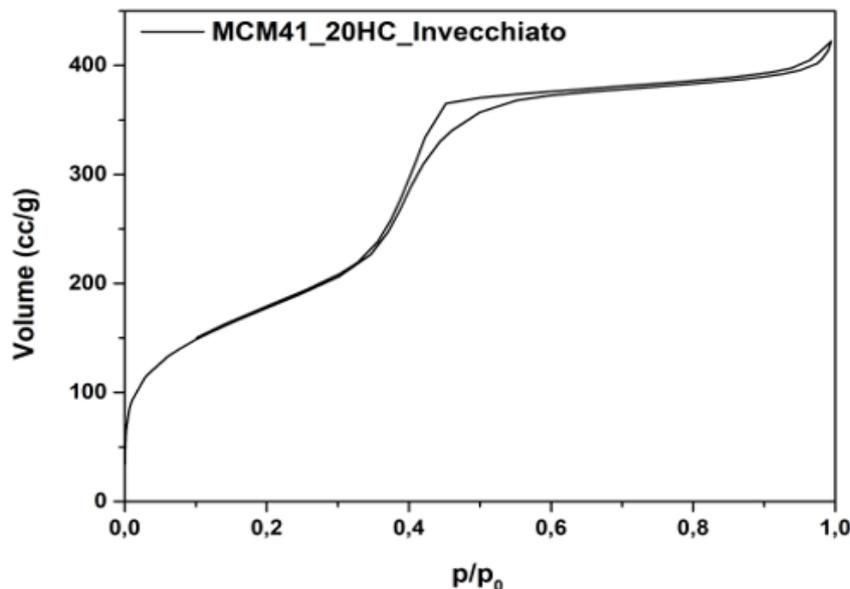


Figura 9.13 Isotherma di adsorbimento del campione MCM41_20HC_Invvecchiato.

In tabella 9.2 vengono inoltre riportati i dati di area superficiale, diametro dei pori e pore volume che mediante la medesima prova lo strumento fornisce seguendo il modello DFT.

Tabella 9.2 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione MCM41_20HC_Invvecchiato.

Area Superficiale specifica	647 m ² /g
Volume dei pori	0,65 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	4 nm

Si nota come l'area superficiale specifica si sia ridotta di circa 250 m²/g rispetto all'MCM41, indice di una interazione superficiale tra il principio attivo e il carrier. Anche il volume dei pori è diminuito a causa di occupazione o occlusione dei pori da parte del farmaco. Infine il diametro dei pori si è ridotto di circa 0,5 nm inducendo a pensare che parte dell'idrocortisone sia localizzato all'interno dei pori.

9.3.6 Confronto tra MCM41_20HC e MCM41_20HC_Invvecchiato

- Diffrazione a raggi X

Confrontando gli spettri XRD dei due campioni, figura 9.14, si osserva una netta diminuzione del picco a 14,5°. Il campione invecchiato ha una intensità circa la metà del campione analizzato

subito dopo impregnazione. Ciò, così come anche visto nel caso della Grace, lascia pensare ad un effetto amorfizzante del tempo. Il periodo di invecchiamento potrebbe aver migliorato la distribuzione delle molecole di farmaco sulla superficie riducendo la fase stabile.

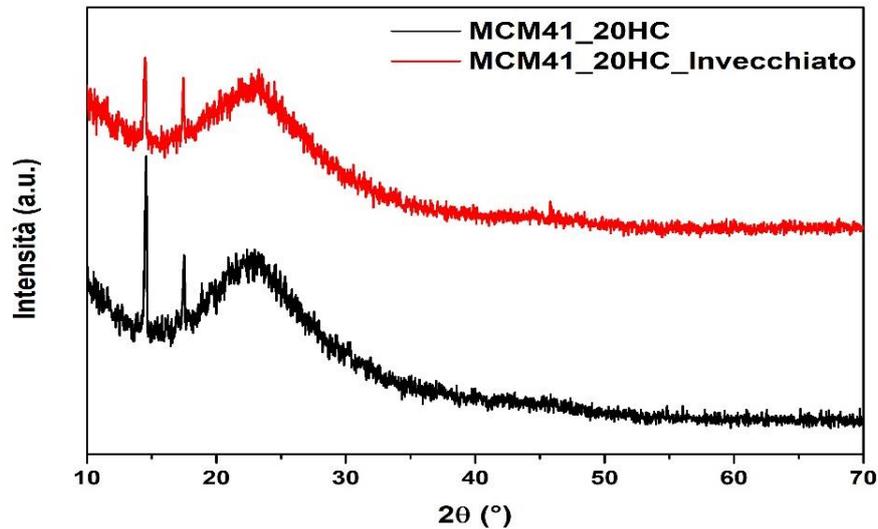


Figura 9.14 Confronto spettri diffrattometrici MCM41_20HC e MCM41_20HC_Invecchiato.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Le 2 curve visibili nel grafico 9.15 e rappresentanti gli spettri infrarossi del campione silice con il 20% in massa di idrocortisone subito dopo impregnazione e a seguito di invecchiamento, mostrano le stesse bande di assorbimento per determinate lunghezze d'onda. Tuttavia, lo spettro del campione MCM41_20HC_Invecchiato ha delle bande più larghe, indice di una minore cristallinità e maggiore amorfizzazione. Il tempo può infatti aver distribuito in maniera più uniforme l'idrocortisone sulla superficie e creato dei legami idrogeno tra l'API e il carrier diversi rispetto a quelli presenti nel campione subito dopo l'effetto di impregnazione come anche ipotizzato confrontando gli spettri diffrattometrici della figura 9.14.

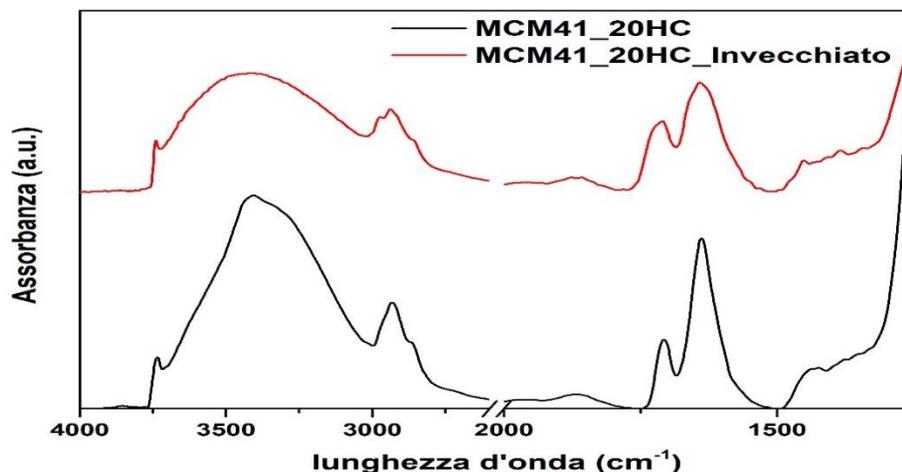


Figura 9.15 Confronto spettri infrarossi MCM41_20HC e MCM41_20HC_Invecchiato.

9.3.7 Effetto del tempo sul campione MCM41_HC_10IWI

Al fine di avere una visione più ampia del comportamento nel tempo del principio attivo all'interno della matrice è stato fatto invecchiare anche il campione avente una quantità di idrocortisone del 10% in massa per capire se la presenza di un minore carico unita ad un fenomeno di invecchiamento possa portare ad una totale amorfizzazione. Il campione **MCM41_10HC_Invecchiato** è stato quindi caratterizzato mediante analisi ai raggi X, FT-IR e analisi di adsorbimento di azoto.

- Diffrazione a raggi X

Lo spettro ottenuto mediante analisi ai raggi X mostra un picco di cristallinità in corrispondenza del valore di $14,5^\circ$ anche se con bassa intensità.

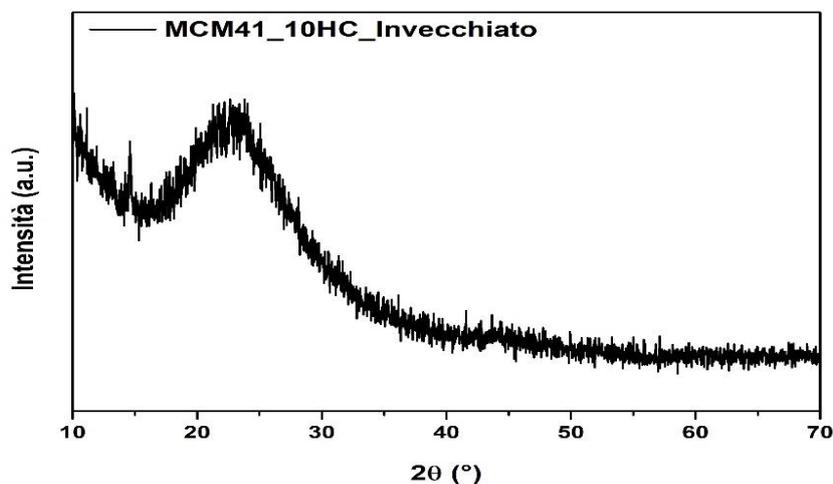


Figura 9.16 Spettro diffrattometrico del campione MCM41_10HC_Invecchiato.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Lo spettro infrarosso del campione MCM41_10HC_Invecchiato mette in luce la presenza di picchi attribuibili ai legami C-H alifatici della molecola dell'idrocortisone per frequenze tra 3000 e 2850 cm^{-1} . Quindi si ha una banda di assorbimento con intensità molto intensa tra 3600 e 3000 cm^{-1} assegnabile ad un elevato numero di OH interagenti data l'interazione per legame idrogeno tra il farmaco e la silice ma anche per gli OH interagenti del carrier. Mentre il picco relativo agli ossidrili isolati, al valore di 3740 cm^{-1} , è poco intenso perché questi tendono ad interagire con il principio attivo. Spostandoci verso lunghezze d'onda minori si hanno i picchi a 1710 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} imputabili, come già più volte detto, rispettivamente al carbonile del gruppo carbossilico e all'involuppo dato dal carbonile legato all'anello A e dai doppi legami C=C.

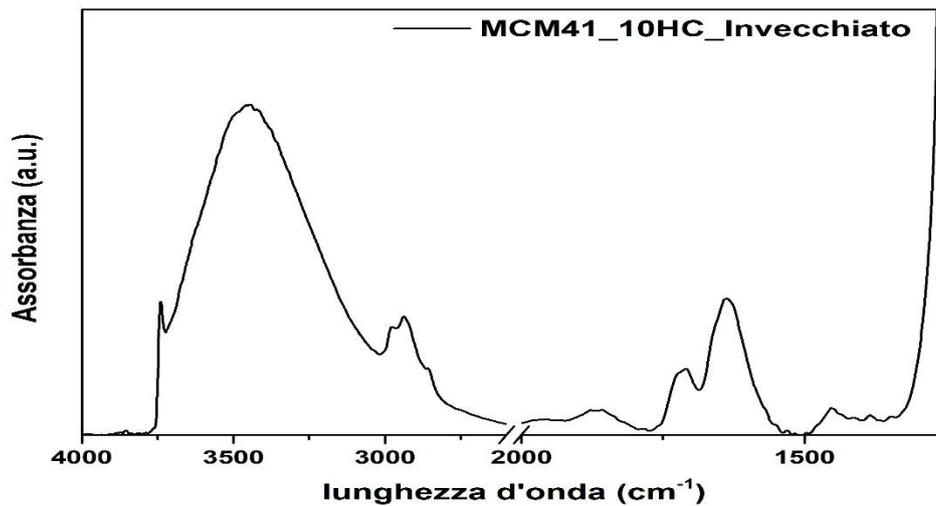


Figura 9.17 Spettro infrarosso del campione MCM41_10HC_Invvecchiato.

- Analisi di adsorbimento di azoto

L'isoterma condotta a 77 K del campione avente il 10% in massa di HC ed invecchiato per 50 di mostra un andamento tipico dei materiali mesoporosi, come evidenziato in figura 9.18. Data la condensazione capillare nei mesopori, si forma un cappio di isteresi che tende a chiudersi per valori di p/p_0 intorno a 0,37. Per alti valori è presente un altro diverso andamento durante le fasi di adsorbimento e desorbimento poiché si verifica un ulteriore fenomeno di condensazione capillare tra le particelle della silice.

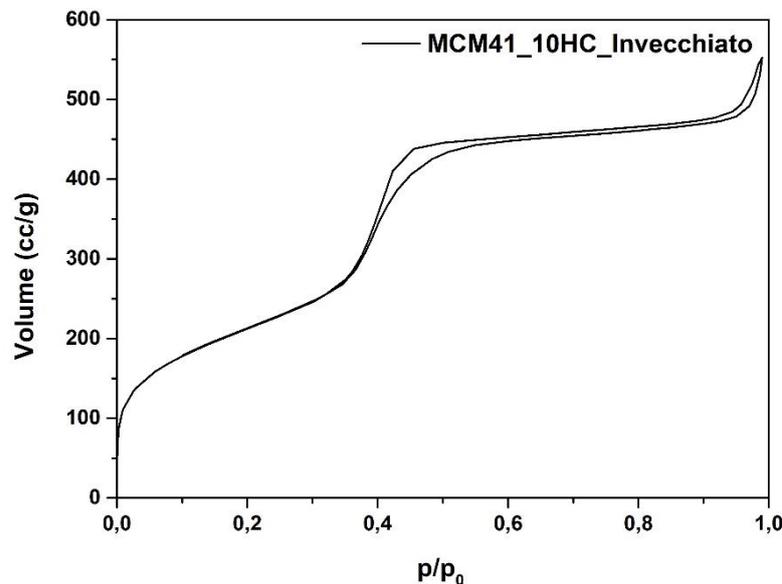


Figura 9.18 Isotherma di adsorbimento del campione MCM41_10HC_Invvecchiato.

Seguendo il modello DFT sono stati ottenuti anche i valori di area superficiale, diametro dei pori e pore volume.

Tabella 9.3 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione MCM41_10HC_Invecchiato.

Area Superficiale specifica	776 m ² /g
Volume dei pori	0,83 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	4,3 nm

9.3.8 Confronto tra MCM41_10HC e MCM41_10HC_Invecchiato

- Diffrazione a raggi X

La comparazione dei due spettri diffrattometrici, visibili nella figura sottostante, tra il campione MCM41_10HC e il suo invecchiato mette in luce come sotto una certa quantità di idrocortisone il tempo non influisce sullo stato solido del principio attivo dentro la matrice. Infatti il picco di cristallinità mantiene lo stesso valore di intensità. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che in questo campione il quantitativo amorfo è raggiunto subito dopo impregnazione, per cui non si nota alcuna differenza di intensità relativa dei picchi di cristallinità tra i 2 campioni. Oppure è un fattore di sensibilità dello strumento per cui non si riesce a distinguere la differenza di intensità tra i picchi.

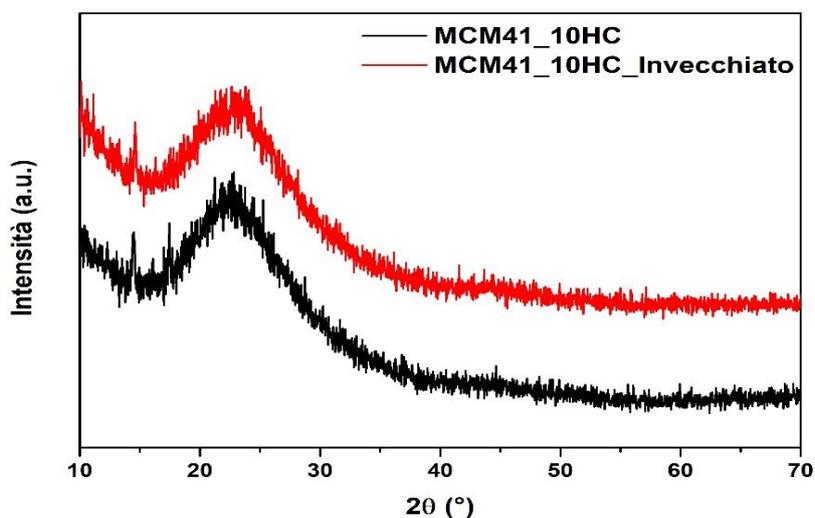


Figura 9.19 Confronto spettri diffrattometrici MCM41_10HC e MCM41_10HC_Invecchiato.

9.3.9 Confronto tra MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato

- Diffrazione a raggi X

Mettendo a confronto i due campioni con differente carico e sottoposti ad un fenomeno di invecchiamento, si nota come il picco di cristallinità nel campione avente il 20% di principio attivo sia più alto come anche evidenziato nel caso del confronto tra i campioni subito dopo impregnazione. E' possibile che aumentando il contenuto di farmaco la cristallizzazione viene favorita.

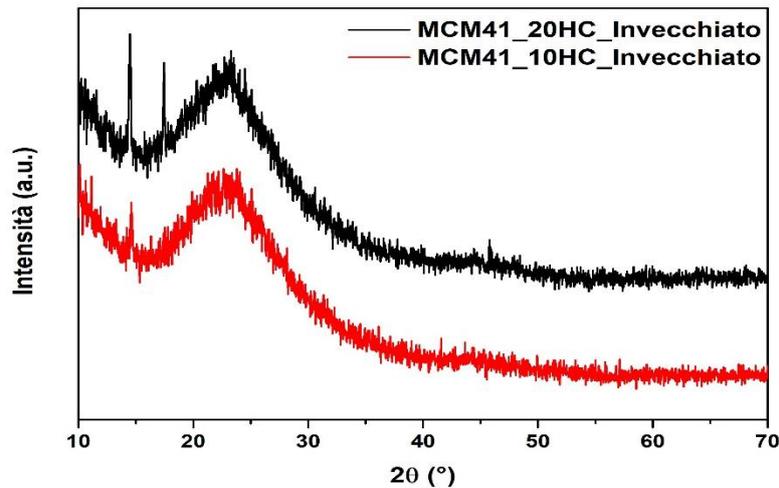


Figura 9.20 Confronto spettri diffrattometrici MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

In figura 9.21 sono rappresentati gli spettri infrarossi dei campioni MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato. Si hanno gli stessi modi vibrazionali e l'unica differenza sta nella diversa forma delle bande assegnabili ai silanoli interagenti imputabile ad una diversa tipologia di interazioni: ad esempio tra la silice e il principio attivo o tra le molecole del farmaco.

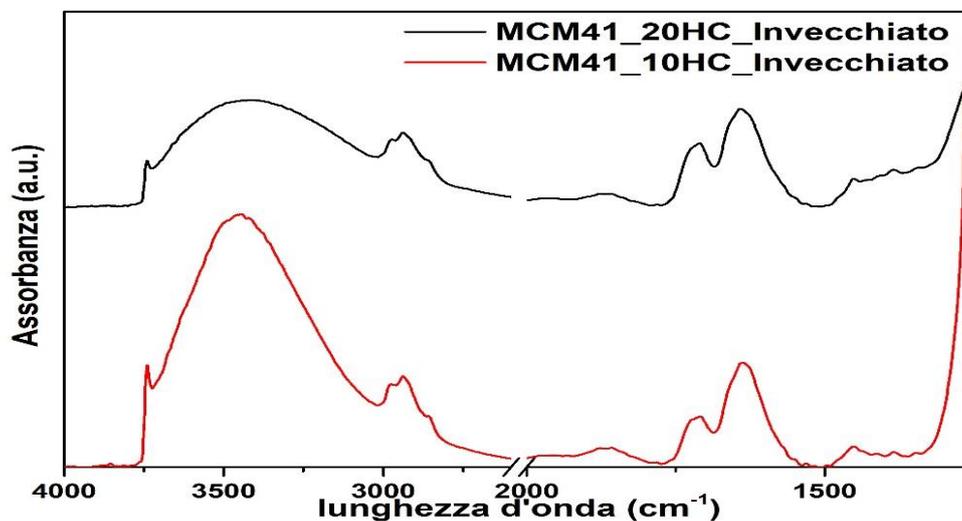


Figura 9.21 Confronto spettri infrarossi MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Confrontando le isoterme di adsorbimento dei campioni impregnati al 20 e 10 % in massa di API è possibile osservare come l'andamento delle curve sia di tipo IV secondo la classificazione IUPAC e per bassi p/p_0 si abbia un ricoprimento dei micropori che è uguale per i 2 sistemi. Tuttavia il campione MCM41_20HC_Invecchiato ha una minore pendenza nel tratto

corrispondente alla formazione del monostrato indicante una minore area superficiale specifica rispetto al sistema avente la metà del farmaco impregnato, come indicato dai valori presenti nella tabella 9.4. Il coppia rimane uguale nella forma ma il punto di chiusura sia ha per valori di p/p_0 più alti nel caso del campione MCM41_10HC_Invecchiato. Un ulteriore differenza è la riduzione del coppia per alti valori di p/p_0 nel campione col 20% di idrocortisone ad indicare una occupazione delle zone interparticellari.

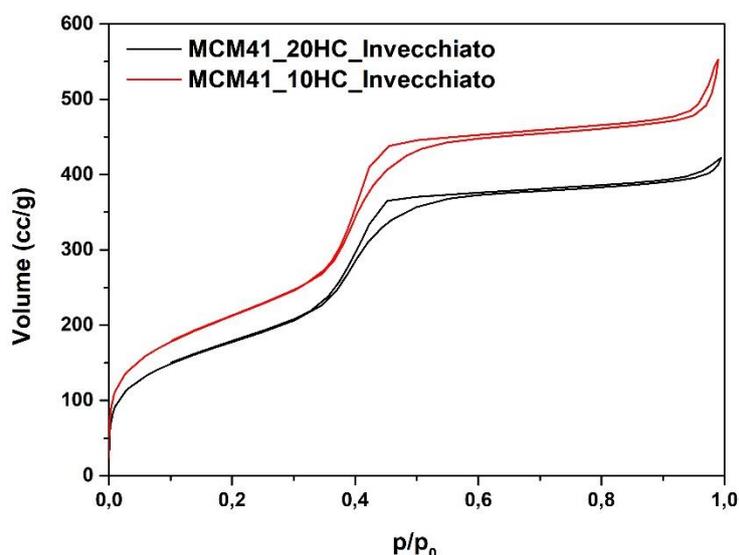


Figura 9.22 Confronto isoterme di adsorbimento MCM41_10HC_Invecchiato e MCM_41_20HC_Invecchiato.

La riduzione del pore volume e del diametro dei pori tra i due campioni indica come il farmaco presente in quantità maggiore vada ad occupare maggiormente i pori provocandone una riduzione del diametro. Non è escluso però che parte del principio attivo vada ad occludere le cavità porose e quindi riduca i due valori.

Tabella 9.4 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.

	MCM41_10HC_Invecchiato	MCM41_20HC_Invecchiato
Area Superficiale specifica	776 m ² /g	647 m ² /g
Volume dei pori	0,83 cm ³ /g	0,65 cm ³ /g
Diametro dei pori	4,3 nm	4 nm

9.3.10 Effetto dell'umidità e del tempo sul campione MCM41_20HC

Parte del campione MCM41_20HC, contemporaneamente al tempo in cui parte del campione è stato fatto invecchiare, è stato omogeneamente distribuito su un vetrino di vetro e posto in un essiccatore in presenza di acqua contenuta in un becher al fine di realizzare un ambiente in cui il materiale si trovi nella condizione di tensione di vapore dell'acqua. Dopo 50 giorni sono state

effettuate le analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, diffrazione ai raggi X e analisi di adsorbimento di azoto sul campione identificato **MCM41_20HC_Umido**, i cui risultati sono riportati di seguito.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

L'analisi IR del campione MCM41_20HC_Umido, di cui in figura 9.23 è rappresentato lo spettro, evidenzia un picco stretto e con valore di assorbanza intorno ai 3410 cm^{-1} , zona in cui cadono sia i modi vibrazionali dei silanoli interagenti che quelli degli idrossili dell'idrocortisone. Quindi per valori di 2972 , 2938 e 2850 cm^{-1} vi sono modi attribuibili allo stretching dei legami alifatici C-H. Andando verso lunghezze d'onda più basse si ha il picco a 1710 cm^{-1} che corrisponde allo stretching del legame C=O del gruppo carbossilico e a seguire il picco assegnabile all'inviluppo del carbonile legato all'anello della molecola dell'idrocortisone e ai doppi legami C=C.

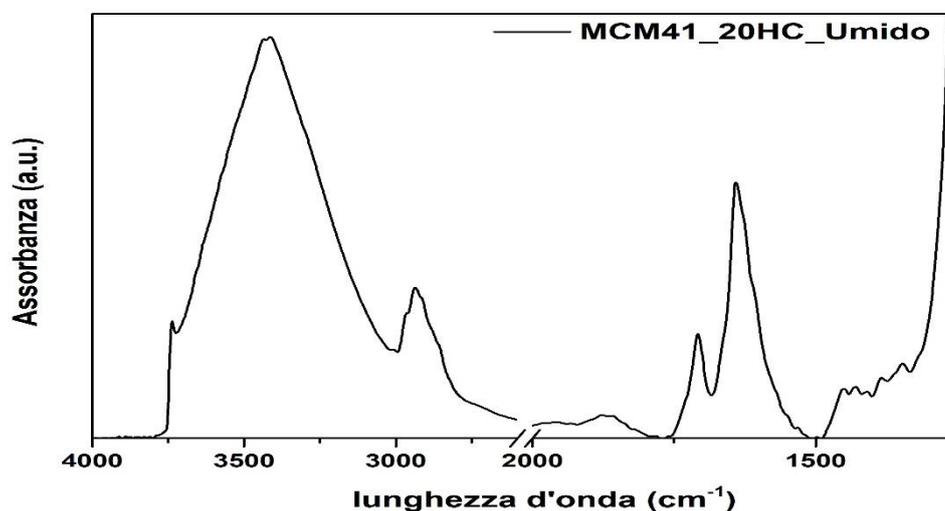


Figura 9.23 Spettro infrarosso del campione MCM41_20HC_Umido.

- Diffrazione ai raggi X

La diffrazione ai raggi X del campione MCM41_HC_20IWI_Umido, evidenzia la presenza di una importante porzione di fase cristallina del principio attivo all'interno della matrice dato l'alto valore di intensità dei picchi dell'idrocortisone e considerando il rapporto tra questi picchi e quello della silice. Il picco più intenso dell'API risulta essere 2 volte quello dell'MCM41.

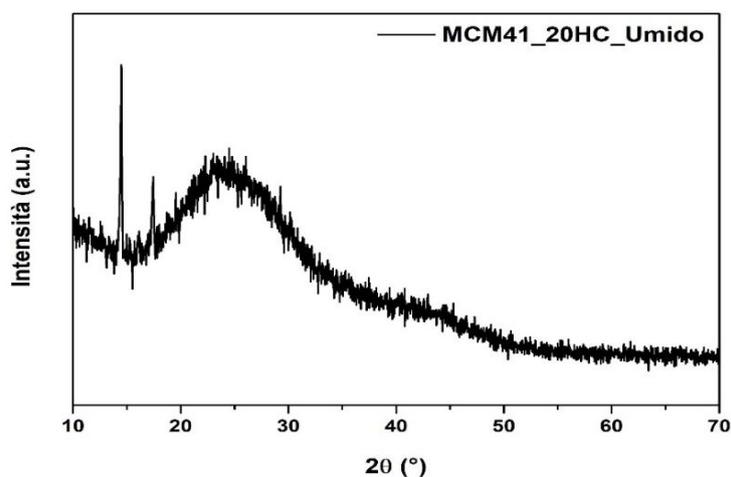


Figura 9.24 Spettro diffrattometrico del campione MCM41_20HC_Umido.

- Analisi di adsorbimento di azoto

La figura 9.25 mostra una isoterma di tipo IV per il campione MCM41_20HC_Umido. Vi sono due cappi di isteresi: uno per valori di p/p_0 tra 0,4 e 0,6 attribuibile al fenomeno di condensazione capillare all'interno dei mesopori, risultati essere di 4,26 nm tramite modello DFT, mentre l'altro per valori maggiori di 0,9 assegnabile allo stesso fenomeno ma tra le particelle del campione.

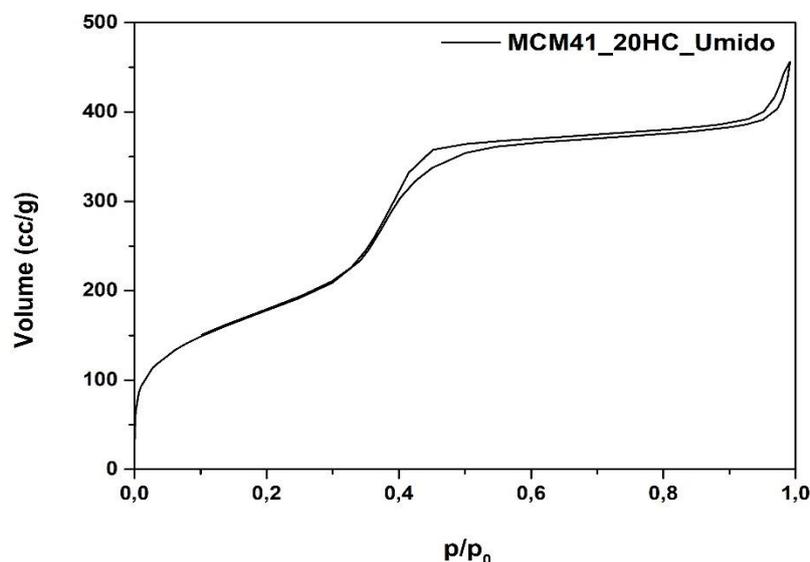


Figura 9.25 Isotherma di adsorbimento del campione MCM41_20HC_Umido.

Altri valori riguardanti il campione sono indicati nella tabella 9.5.

Tabella 9.5 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione MCM41_20HC_Umido.

Area Superficiale specifica	652 m ² /g
Volume dei pori	0,69 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	4,26 nm

9.3.11 Confronto tra MCM41_HC_20IWI_Invecchiato e MCM41_HC_20IWI_Umido

- Diffrazione a raggi X

Dalla figura 9.26 si nota come la presenza di umidità favorisca il fenomeno di cristallizzazione del farmaco. Infatti la presenza di H₂O potrebbe interporre tra l'idrocortisone e il carrier formando un film ed evitando che i gruppi deputati all'interazione mediante legami idrogeno con i siti attivi della superficie possano formare dei legami. Questo può essere dovuto ad un'alta velocità di scambio chimico tra i protoni dell'acqua e quelli della silice provocandone una debole interazione tra il carrier e il farmaco [42].

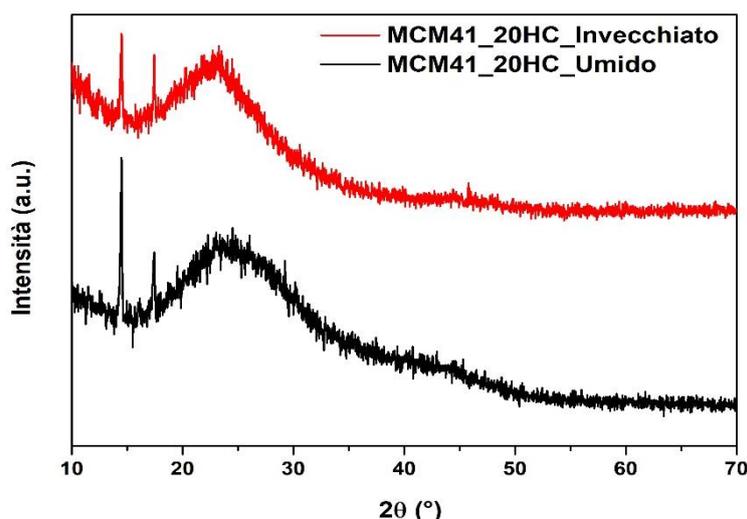


Figura 9.26 Confronto spettri diffrattometrici MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

I due spettri hanno dei picchi per gli stessi valori di lunghezze d'onda. Tuttavia mentre nel caso dell'MCM41_20HC_Umido le bande di assorbimento sono molto strette, indice di una maggiore cristallinità, nel caso del campione invecchiato si hanno delle bande molto più larghe. Questo conferma quello osservato mediante analisi ai raggi X, ovvero una condizione più amorfa del principio attivo nel campione che nel tempo non è stato esposto alla tensione di vapore dell'acqua.

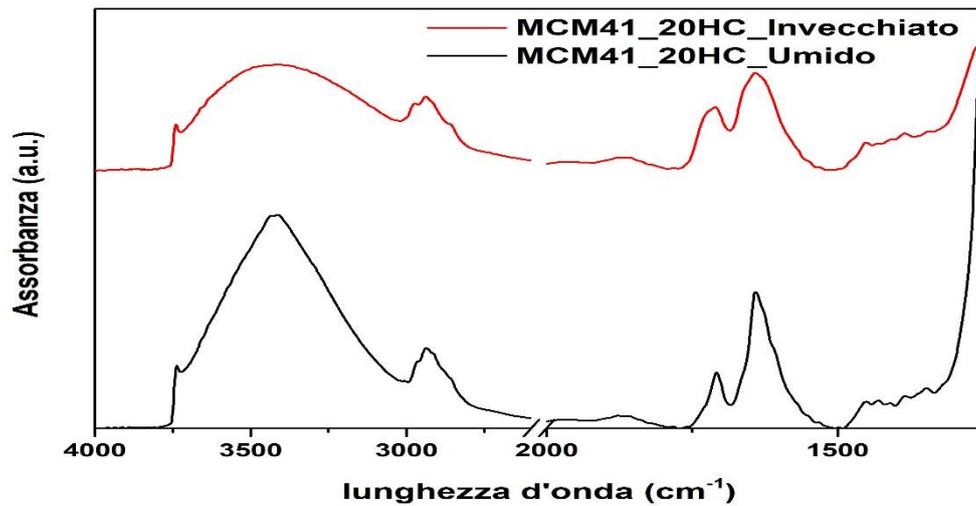


Figura 9.27 Confronto spettri infrarossi MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido.

- Analisi di adsorbimento di azoto

La figura 9.28 mette in luce il confronto tra le due isoterme di adsorbimento di azoto condotte sui campioni aventi il 20% in massa di idrocortisone ma fatti invecchiare uno in luogo asciutto e buio mentre l'altro in condizioni alla tensione di vapore dell'acqua. Si ha un andamento piuttosto simile con una zona corrispondente alla formazione del riempimento dei pori e formazione del monostrato sovrapponibile. L'unica differenza sta per alti valori di p/p_0 in quanto il coppia di isteresi attribuibile a fenomeni di condensazione capillare interparticellare è più evidente nel caso del campione umido. Questo spiega anche i maggiori valori del diametro dei pori e volume dei pori nel campione MCM41_20HC_Umido.

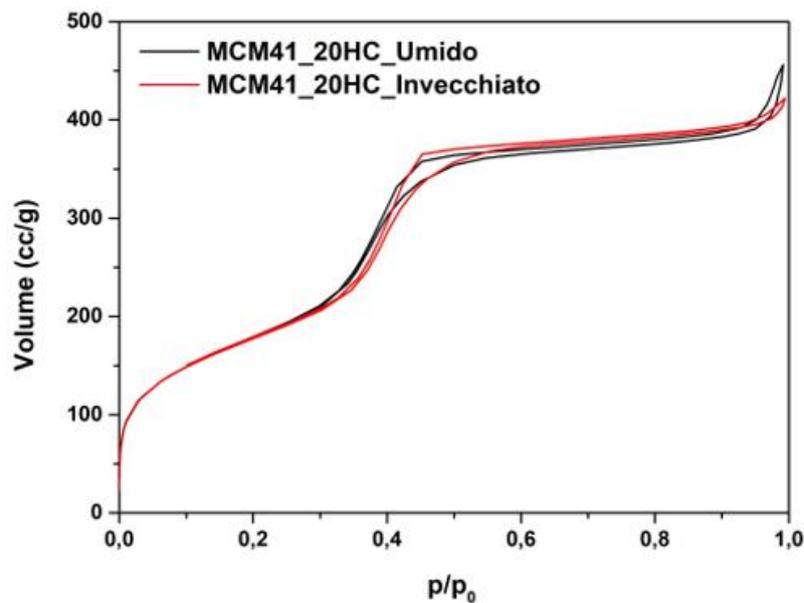


Figure 9.28 Confronto isoterme di adsorbimento MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido.



Tabella 9.6 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido.

	MCM41_20HC_Invecchiato	MCM41_20HC_Umido
Area Superficiale specifica	647 m ² /g	652 m ² /g
Volume dei pori	0,65 cm ³ /g	0,69 cm ³ /g
Diametro dei pori	4 nm	4,26 nm



10. CONFRONTO TRA I SISTEMI CON LE DUE TIPOLOGIE DI SILICI MESOPOROSE

In questo capitolo viene fatto un confronto tra i sistemi a base silice studiati e caratterizzati nei due capitoli precedenti al fine di selezionare il campione che verrà utilizzato per effettuare una ulteriore impregnazione del carrier con il clotrimazolo mediante $scCO_2$.

Le caratteristiche che il campione che deve essere selezionato deve avere sono:

- Alta quantità di farmaco caricato;
- Totale o elevata quantità di API allo stato amorfo.

Questi 2 parametri sono essenziali perché in future applicazioni come DDSs lo scopo del sistema è quello di garantire un rilascio veloce e controllato, possibile solo con un principio attivo presente allo stato amorfo, ovvero con una energia di Gibbs più alta dello stato cristallino del farmaco, e una concentrazione minima necessaria per assicurare l'effetto terapeutico.

Nel corso della discussione della tesi si è osservato come i campioni che hanno subito un fenomeno di invecchiamento nel tempo e in ambiente asciutto e buio godano delle migliori proprietà rispetto ai sistemi caratterizzati subito dopo impregnazione con idrocortisone o ancora ai sistemi sottoposti ad invecchiamento in ambiente umido. Per cui nel capitolo viene fatto un raffronto tra i campioni invecchiati al fine di selezionare quello adatto per impregnare clotrimazolo.

10.1 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e l'MCM41_20HC_Invecchiato

In questo paragrafo sono comparati i campioni Grace_16HC_Invecchiato e l'MCM41_20HC_Invecchiato, ovvero i sistemi aventi un quantitativo maggiore di idrocortisone caricato mediante Incipient Wetness Impregnation.

L'obiettivo è capire quale dei due sistemi ad alto carico è in grado di fornire una maggiore concentrazione del principio attivo allo stato amorfo.

- Diffrazione ai raggi X

La tecnica di analisi che ci permette di capire lo stato solido del farmaco e l'intensità di esso è l'XRD. Nel grafico presente in figura 10.1 si confrontano gli spettri diffrazionistici dei due sistemi.

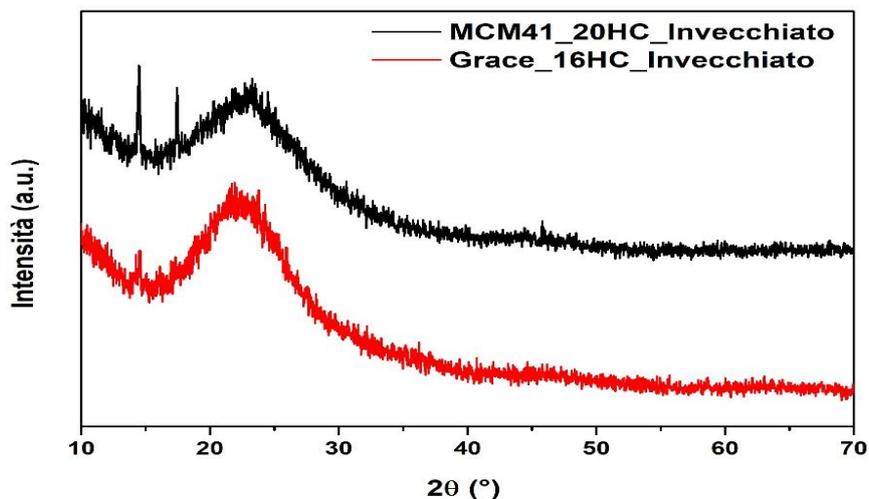


Figura 10.1 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.

Si osserva come il picco a $14,5^\circ$ dell'idrocortisone nel campione Grace_16HC_Invecchiato, curva rossa, sia molto meno intenso rispetto allo stesso picco nell'MCM41. Questo sottolinea come il primo campione abbia amorfizzato più farmaco e quindi goda di proprietà migliori. E' pur vero che il campione MCM41 è stato impregnato con il 20% di idrocortisone mentre la Grace con il 16%. Tuttavia questa netta differenza di intensità dei picchi fa supporre che anche in condizioni di carico uguali il carrier Grace abbia delle proprietà migliori di amorfizzazione.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

I due spettri infrarossi non evidenziano sostanziali cambiamenti. L'unica differenza che si può osservare è un maggiore picco degli -OH isolati e una minore banda di assorbimento dei silanoli interagenti nel campione avente come carrier l'MCM41. Ci si aspetta quindi che quest'ultima silice sia più idrofobica. Questo comporta un differente comportamento dei due supporti nei confronti del farmaco.

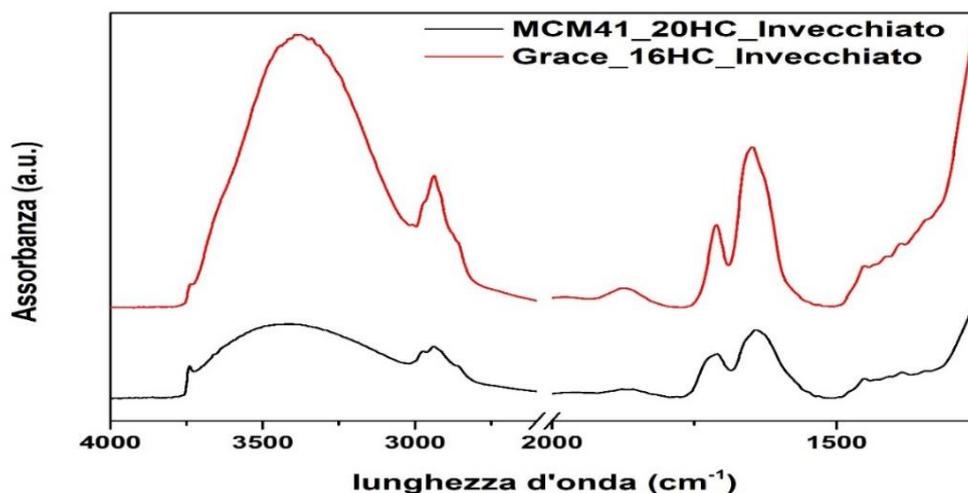


Figura 10.2 Confronto spettri infrarossi MCM41_20HC_Invecchiato e Grace_16HC_Invecchiato.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Le isoterme presenti nella figura 10.3 sembrano molto diverse fra loro. Tuttavia appartengono alla categoria di tipo IV della classificazione IUPAC. Entrambe hanno un andamento crescente per bassi valori di p/p_0 ad indicare la formazione di uno strato di materiale adsorbito sulla superficie. Il campione MCM41_20HC_Invecchiato tende a raggiungere alti valori di occupazione già a bassissimi p/p_0 data la maggiore quantità di micropori rispetto alla Grace. Entrambe hanno un ginocchio indicante la formazione del monostrato. La silice mesoporosa disordinata ha un valore di area superficiale specifica poco meno della metà rispetto a quella dell'MCM41. Questo indica che l'interazione con l'idrocortisone è migliore nella Grace confermando le affermazioni fatte durante il confronto degli spettri diffrattometrici e quelli infrarossi riguardanti rispettivamente una maggiore amorfizzazione e idrofilicità del farmaco con la silice disordinata. Incrementando la pressione dell'adsorbato in entrambi i casi si formano dei cappi di isteresi, non aventi delle forme tipiche. Mentre nel caso dell'MCM-41 il punto di giunzione del tratto di adsorbimento e desorbimento si ha a p/p_0 compreso tra 0,37 e 0,40, nel caso del secondo sistema si ha tra 0,4 e 0,45. Questo dato indica che il diametro dei pori è minore nel primo caso come indicato in tabella 10.1.

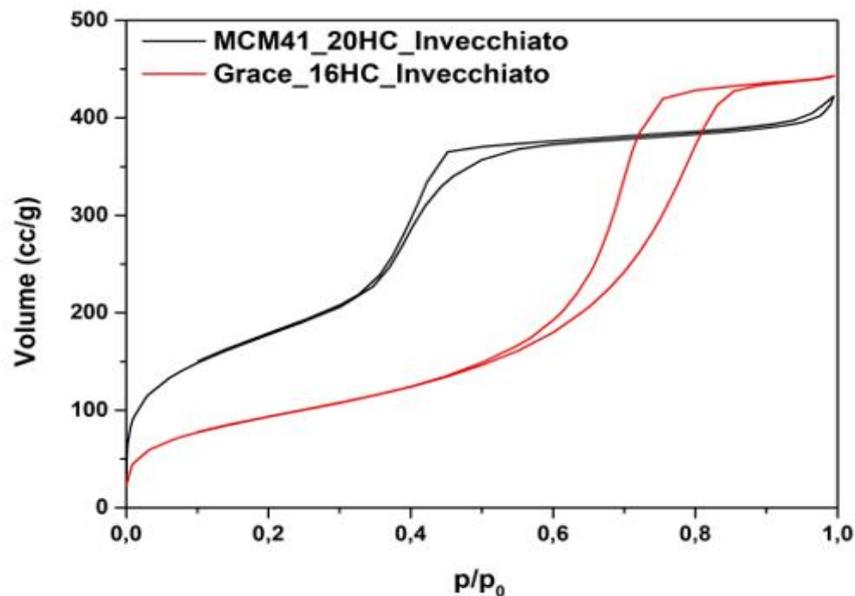


Figura 10.3 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.

Il volume dei pori si mantiene praticamente uguale ma su questo valore non si possono effettuare speculazioni considerando che il volume dei pori delle matrici prima della impregnazione era diverso.

Tabella 10.1 Confronto Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.

	Grace_16HC_Invecchiato	MCM41_20HC_Invecchiato
Area Superficiale specifica	345 m ² /g	647 m ² /g

Volume dei pori	0,68 cm ³ /g	0,65 cm ³ /g
Diametro dei pori	8 nm	4 nm

Dal confronto delle tecniche di caratterizzazione dei campioni emerge che il campione Grace_16HC_Invecchiato è quello che gode delle migliori caratteristiche.

Tuttavia si è cercato di capire se diminuendo la concentrazione di principio attivo nella matrice di silice mesoporosa ordinata vi fossero dei miglioramenti riguardanti l'amorfizzazione. Nel paragrafo 10.2 sono quindi confrontati il sistema che precedentemente ha apportato i migliori risultati, ovvero la Grace_16HC_Invecchiato, e l'MCM-41 avente il 10% in massa di idrocortisone.

10.2 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e l'MCM41_10HC_Invecchiato

- Diffrazione a raggi X

Entrambi i sistemi mantengono i picchi di cristallinità. Tuttavia l'intensità di essi è molto bassa ad indicare una presenza di fase solida allo stato cristallina che non è molto elevata. Basandoci sul confronto delle intensità relative, si ha che i valori risultano piuttosto simili seppur sembra che il campione Grace_16HC_Invecchiato abbia un rapporto minore seppur con un carico teorico del 6% maggiore. Quindi anche in questo caso il campione impregnato col 16% in massa di idrocortisone sembra avere le caratteristiche migliori per essere sfruttato per drug delivery system.

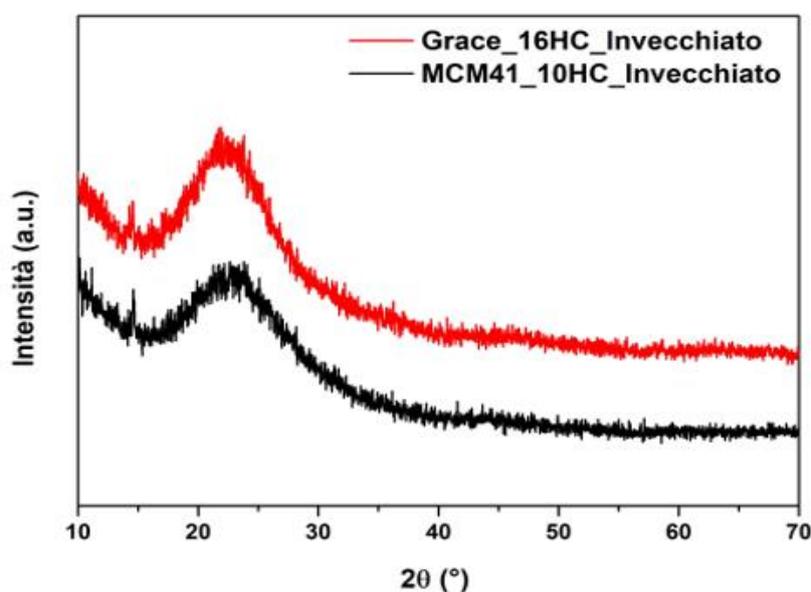


Figura 10.4 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_10HC_Invecchiato.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Anche qui, come nella sezione 10.1, durante il confronto tra gli spettri infrarossi non si sottolineano particolari variazioni delle bande di assorbimento e delle loro intensità di assorbanza se non un picco più alto dei silanoli isolati nel campione avente come supporto la silice mesoporosa ordinata e più idrofobica.

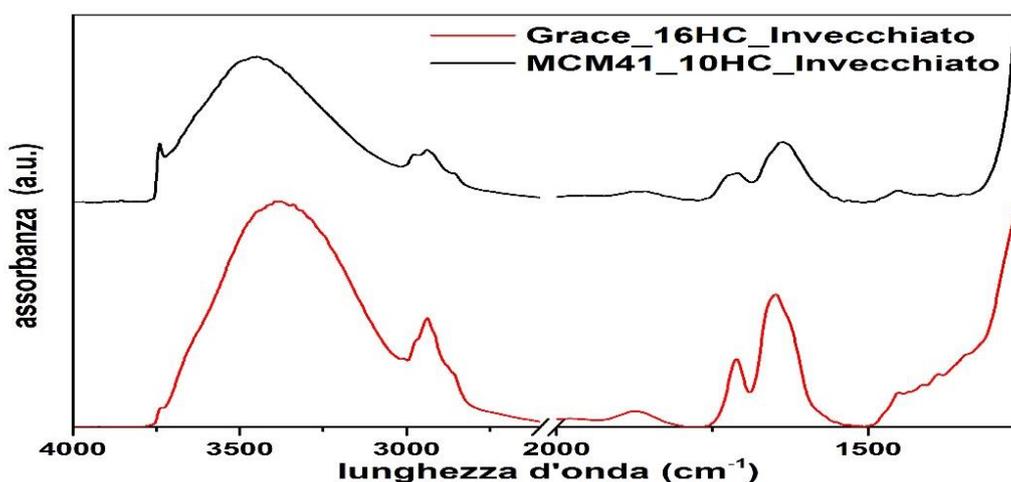


Figura 10.5 Confronto spettri infrarossi MCM41_10HC_Invecchiato e Grace_16HC_Invecchiato.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Il confronto in figura 10.6 mostra come le due isoterme appartengano alla tipologia IV della classificazione IUPAC seppur avendo differente andamento. Si osserva, infatti, come la pendenza della isoterma in corrispondenza del tratto in cui si calcola l'area superficiale specifica è molto minore nel caso della Grace_16HC_Invecchiato rispetto al campione avente come supporto l'MCM-41. Considerando che la Grace ha un'area iniziale di 732 m²/g mentre l'MCM-41 di 907 m²/g, per il campione Grace_16HC_Invecchiato vi è una diminuzione di circa 380 m²/g, valore molto maggiore rispetto al decremento di 131 m²/g del campione MCM41_10HC_Invecchiato. La motivazione può essere oltre ad un carico minore di API caricato una differente idrofilicità tra i due supporti che ne influenza l'interazione tra la superficie della silice mesoporosa e il farmaco. Inoltre, i 2 cappi di isteresi sono completamente diversi indice di una differente forma dei pori tra i due sistemi ed in più si trovano in range di p/p₀ non uguali. Difatti il cappio del campione MCM41_10HC_Invecchiato è shiftato verso sinistra e questo indica che il diametro dei pori è molto più basso.

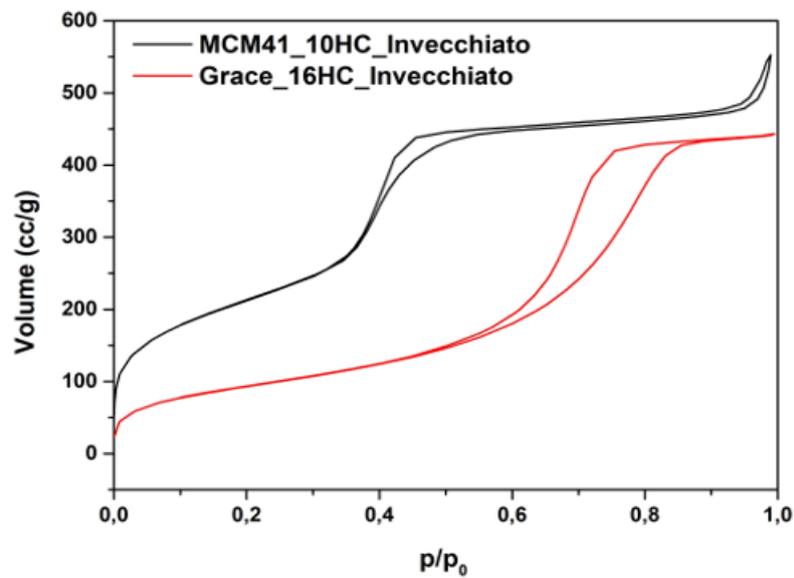


Figura 10.6 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_10HC_Invecchiato.

Un confronto tra parametri dei due sistemi, calcolati mediante il modello DFT, è riportato nella tabella posta in basso.

Tabella 10.2 Confronto Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_10HC_Invecchiato.

	Grace_16HC_Invecchiato	MCM41_10HC_Invecchiato
Area Superficiale specifica	345 m ² /g	776 m ² /g
Volume dei pori	0,68 cm ³ /g	0,83 cm ³ /g
Diametro dei pori	8 nm	4,3 nm

11. SISTEMA A 2 PRINCIPI ATTIVI

In questo capitolo verranno mostrate le caratterizzazioni dei seguenti sistemi: Grace con Clotrimazolo e Grace con Idrocortisone e Clotrimazolo.

Il primo servirà per osservare come la matrice si comporta in presenza del solo clotrimazolo facendo alcuni confronti con delle strutture di silice mesoporosa diversa dalla Grace studiate in passato.

Invece, il secondo sistema di drug delivery è un po' più complesso e innovativo in quanto è stato creato per inglobare due differenti farmaci al fine di poter avere una duplice funzione medica, ampliando gli orizzonti futuri per sistemi sempre più sofisticati ed efficaci.

Le analisi effettuate sui campioni per la caratterizzazione sono: diffrazione a raggi X, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, analisi termogravimetrica e analisi di adsorbimento di azoto.

11.1 Caratterizzazione del campione Grace_CTZ

Il campione è stato ottenuto mediante impregnazione con scCO_2 supercritica alle condizioni di 250 bar e 100°C per 8 ore. Quindi sono state eseguite le seguenti analisi.

- Diffrazione ai raggi X

Come mostra la figura 11.1, dopo impregnazione mediante CO_2 supercritica il Clotrimazolo si è amorfizzato all'interno della matrice. Questa conclusione si può facilmente osservare dall'assenza di picchi assegnabili al principio attivo. Di conseguenza, a differenza di quanto accade con l'idrocortisone, durante impregnazione con anidride carbonica supercritica si ha una solubilizzazione e dissoluzione dell'API.

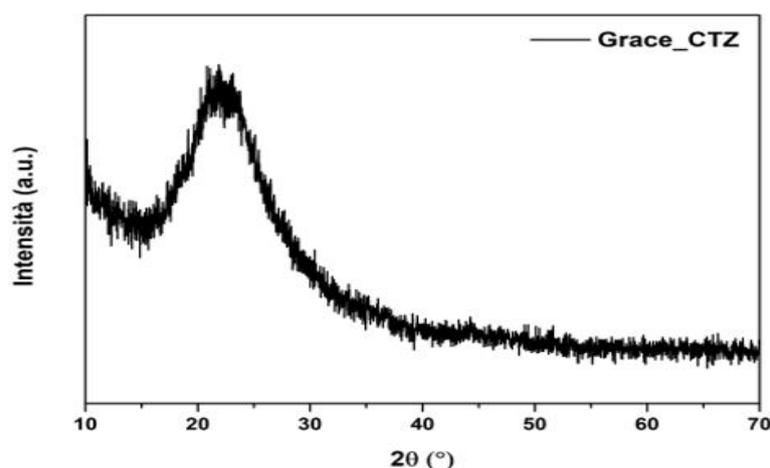


Figura 11.1 Spettro diffrattometrico del campione Grace_CTZ.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Lo spettro del campione Grace_CTZ, riportato in figura 11.2, mostra la presenza di bande di assorbimento tipiche della Grace, quale il picco degli ossidrili isolati a 3750 cm^{-1} ma anche quella dei silanoli interagenti con un massimo a 3440 cm^{-1} . Intorno a 3630 cm^{-1} vi è un modo vibrazionale assegnabile all'interazione, mediante legame idrogeno, degli ossidrili della superficie con l'anello aromatico della molecola del clotrimazolo. La larghezza della banda e la presenza di picchi per valori intorno a 1500 cm^{-1} relativi ai doppi legami C=C e C=N indicano la presenza di farmaco allo stato amorfo all'interno della silice mesoporosa. Inoltre sono presenti le bande relative ai legami C-H aromatici del clotrimazolo per valori di lunghezza d'onda compresi tra 3200 e 2900 cm^{-1} .

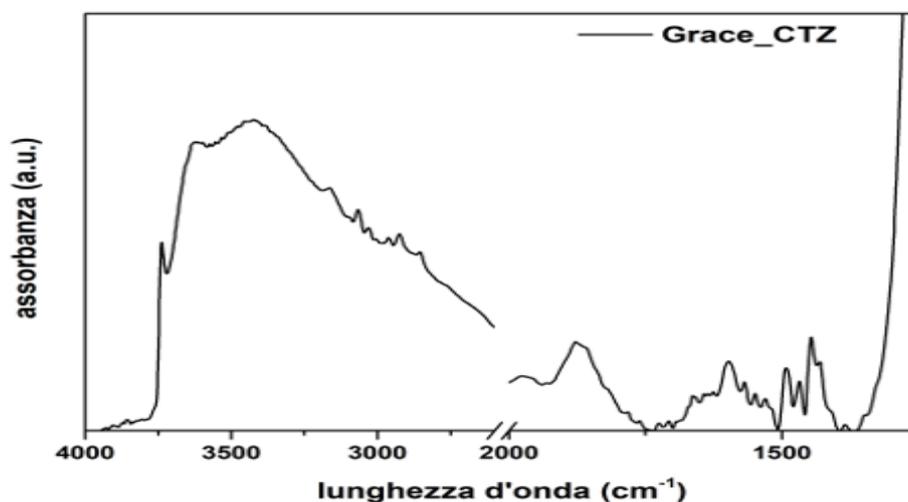


Figura 11.2 Spettro infrarosso del campione Grace_CTZ.

- Analisi Termogravimetrica

In figura 11.3 si osserva l'andamento della perdita di peso del campione a seguito di un aumento di temperatura dalle condizioni ambientali fino a 800°C . Si ha inizialmente un decremento dovuto alle specie fisisorbite sulla superficie della silice che tendono a desorbirsi. Quindi alla temperatura di $140/150^{\circ}\text{C}$ si ha un netto cambiamento della pendenza a seguito della degradazione del principio attivo precedentemente caricato mediante CO_2 supercritica fino ad avere un plateau con una perdita di peso che arriva all' $87,5\%$ rispetto al peso iniziale a 600°C . Tra i 140°C e i 660°C la curva termogravimetrica è soggetta a diversi cambi di pendenza assegnabili a degradazione dei componenti della molecola di clotrimazolo per temperature differenti. La perdita totale di peso è del $12,5\%$.

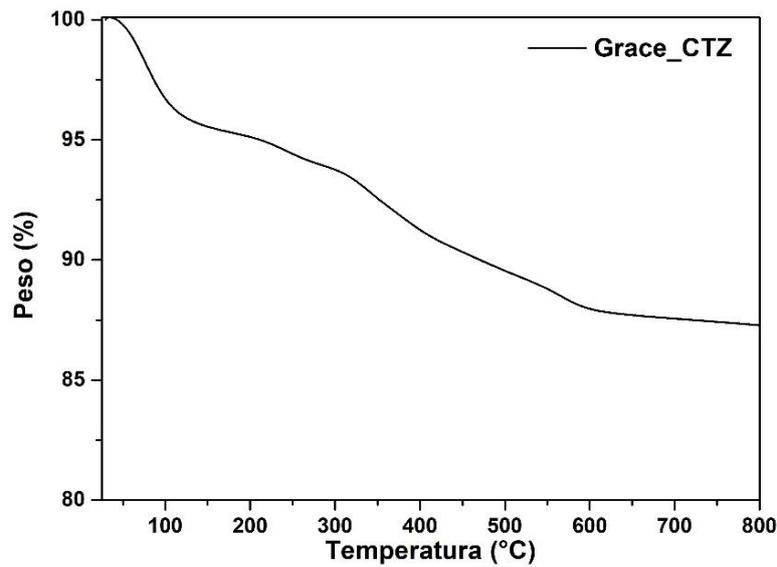


Figura 11.3 Curva termogravimetrica del campione Grace_CTZ.

- Analisi di adsorbimento di azoto

L'analisi di adsorbimento di azoto condotta a 77K (figura 11.4) mostra l'andamento di tipo IV dell'isoterma, caratteristica di un materiale mesoporoso. La forma del cappio non è tipica delle strutture proposte dalla IUPAC e questo dimostra come la geometria dei pori sia irregolare.

In tabella 11.1 sono riportati i valori di area superficiale specifica e pore volume ottenuti mediante il modello DFT.

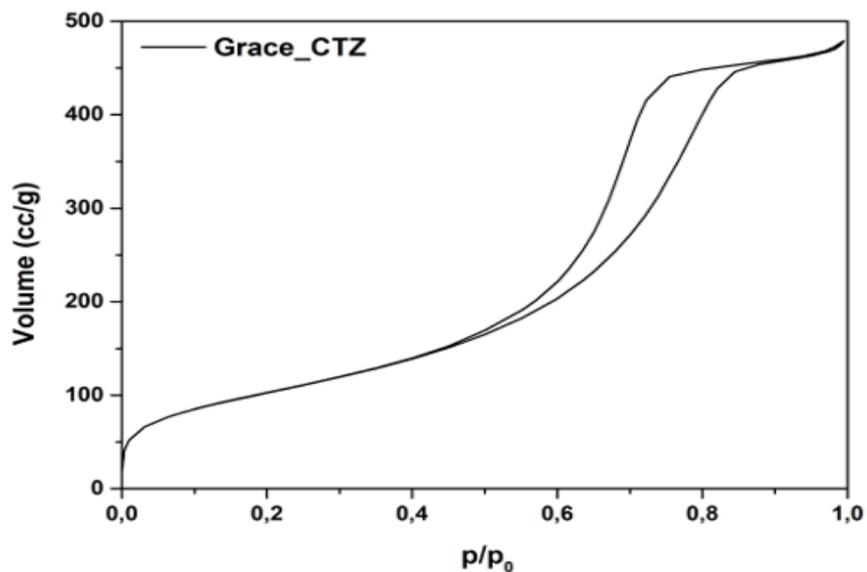


Figura 11.4 Isoterma di adsorbimento del campione Grace_CTZ.

Tabella 11.1 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_CTZ.

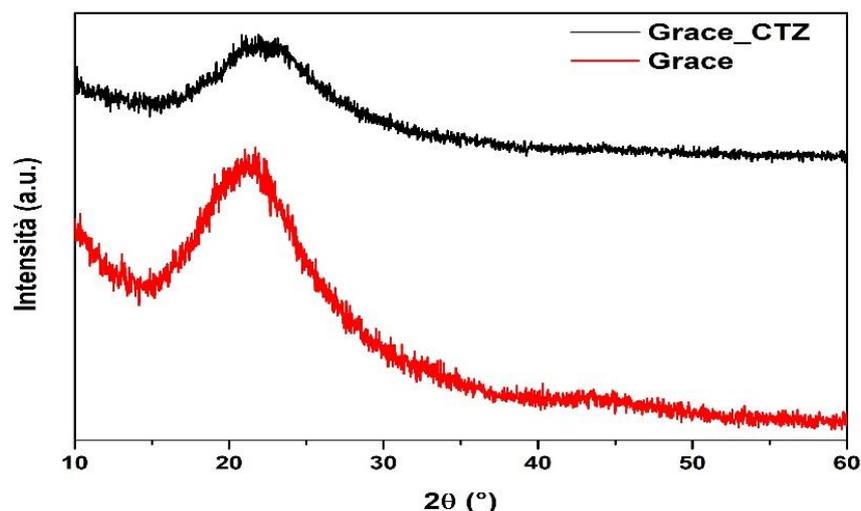
Area Superficiale specifica	378 m ² /g
Volume dei pori	0,73 cm ³ /g

11.2 Confronto tra Grace e Grace_CTZ

In questa sezione verranno confrontate le caratteristiche della silice prima e dopo l'impregnazione al fine di fare dei ragionamenti più precisi sul sistema di drug delivery system che è stato realizzato.

- Diffrazione ai raggi X

Il confronto tra gli spettri XRD della matrice e del campione dopo impregnazione evidenzia come lo spettro del campione Grace_CTZ abbia le stesse caratteristiche del carrier senza la presenza di picchi di cristallinità attribuibili al farmaco. Questo indica lo stato amorfo dell'API, condizione ideale per il rilascio del clotrimazolo in ambito dermatologico.

**Figura 11.5** Confronto spettri diffrattometrici Grace e Grace_CTZ.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

In figura 11.6 sono comparati gli spettri ottenuti mediante analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier della silice Grace e del supporto impregnato con clotrimazolo mediante CO₂ supercritica. Si osserva, innanzitutto, una netta diminuzione del picco attribuibile agli ossidrilici “free” poichè questi durante l'impregnazione tendono a formare dei legami con i gruppi della molecola di principio attivo. Quindi si ha un aumento della banda relativa ai silanoli interagenti, che superano in intensità quelli dei silanoli isolati, e si notano delle bande di assorbimento assegnabili ai legami C-H aromatici del farmaco per valori di 3000 cm⁻¹ seppur poco accentuate. Infine, la presenza del clotrimazolo è confermata dalle armoniche per frequenze di 1500 cm⁻¹ che identificano la presenza dei doppi legami C=C e C=N. Tuttavia l'intensità non sembra essere cospicua è questo fa pensare ad un non elevato contenuto di

principio attivo all'interno del carrier. Una migliore e più precisa indicazione sulla quantità di farmaco caricato ci è fornita dall'analisi termogravimetrica.

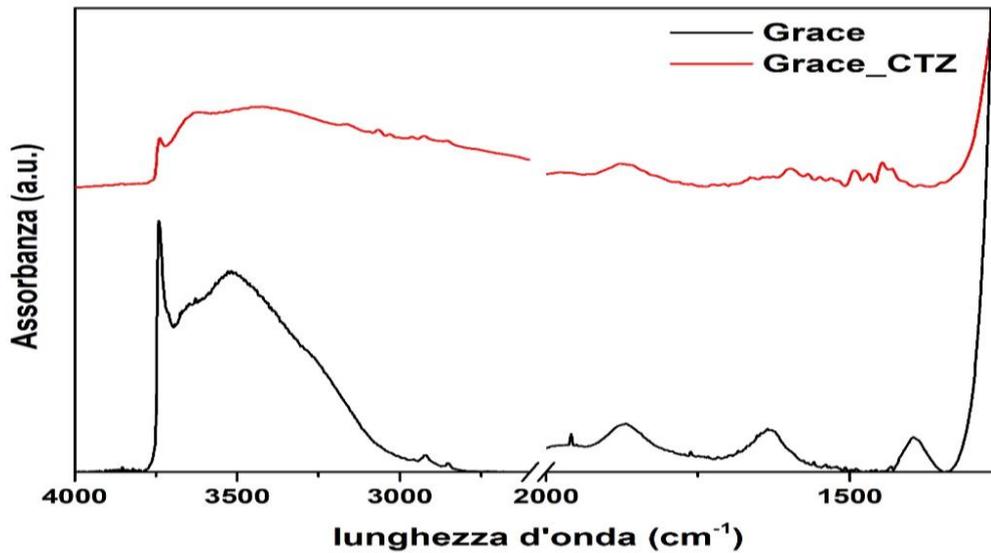


Figura 11.6 Confronto spettri infrarossi Grace e Grace_CTZ.

- Analisi Termogravimetrica

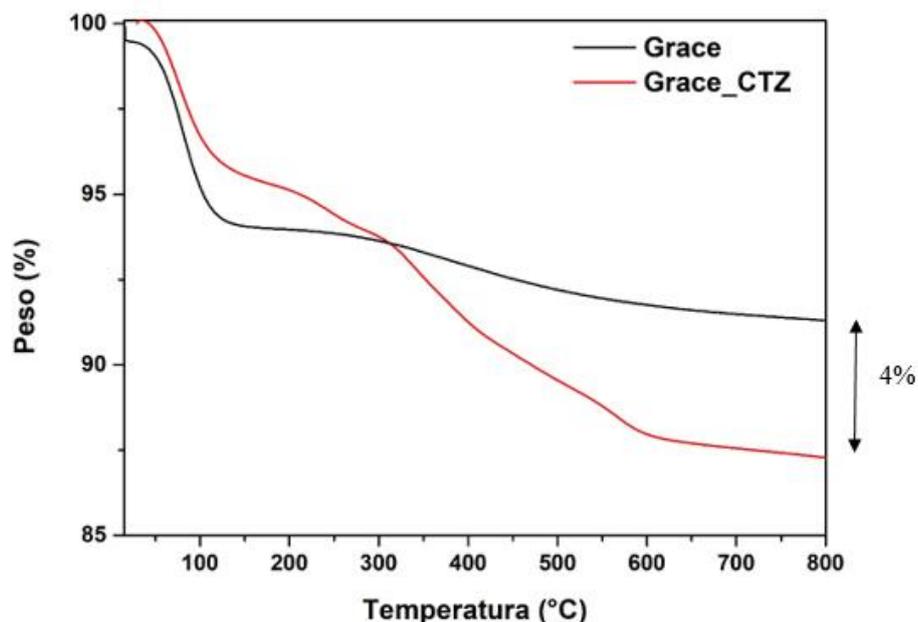


Figura 11.7 Curve termogravimetriche Grace e Grace_CTZ.

Il confronto tra le curve termogravimetriche della silice e della Grace_CTZ evidenzia nel secondo caso, alla temperatura finale di 800°C, una perdita di peso maggiore del 4% rispetto al carrier. Tuttavia, anche per basse temperature si nota un diverso andamento delle curve.

Trascurando il primo tratto in cui le curve perdono peso a seguito dell'acqua fisisorbita sulla superficie, si ha che alla temperatura di 150°C (temperatura di fusione del clotrimazolo) il campione Grace_CTZ ha un valore che risulta essere il 95,6% del peso iniziale mentre il supporto Grace del 94%. Dopo 800°C i due campioni hanno un peso di 87,3% e 91,3%, rispettivamente. Da ciò si ricava che la quantità di clotrimazolo è di circa il 5,6% del peso iniziale del sistema.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Nel grafico sottostante vengono mostrate le isoterme della Grace (curva nera) e del sistema Grace con clotrimazolo (curva rossa). Si osserva che nel tratto in cui si misura l'area superficiale, data dalla formazione del monostrato, nel campione Grace_CTZ vi sia una minore pendenza data un'area superficiale più bassa. Andando verso più alti valori di p/p_0 si nota la presenza di cappi di isteresi, presenti in entrambi i campioni, non aventi una forma che potrebbe ricondurre ad una particolare geometria dei pori. Confrontandoli si nota come nel caso del campione impregnato si abbia una forma meno allungata.

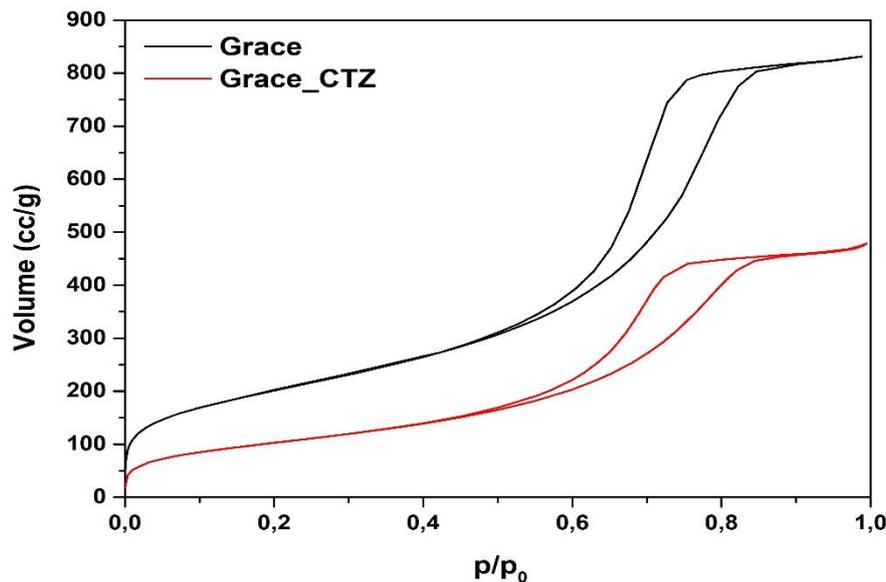


Figura 11.8 Confronto isoterme di adsorbimento Grace e Grace_CTZ.

Il pore volume si riduce di 0,56 cc/g a causa di occupazione e occlusione dei pori per mezzo del principio attivo mentre l'area superficiale di circa la metà.

Tabella 11.2 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace e Grace_CTZ.

	Grace	Grace_CTZ
Area Superficiale specifica	732 m ² /g	378 m ² /g
Volume dei pori	1,29 cm ³ /g	0,73 cm ³ /g



Avendo effettuato l'analisi termogravimetrica e l'analisi di adsorbimento di azoto è pensabile effettuare delle speculazioni riguardo la capacità di avere occupato o meno i pori. Infatti con l'analisi termogravimetrica si è avuta come informazione la quantità di API all'interno della Grace e conoscendo la densità del clotrimazolo, 1,13 g/cc dalla letteratura, è possibile calcolare il volume ideale occupato dal farmaco per ogni grammo di supporto (V_{DRUG}).

Dall'analisi di adsorbimento di azoto sono ottenuti i valori di volume libero del carrier (V_{OMS}) e delle matrici impregnate per ogni grammo di sistema supporto più farmaco ($V_{OMS/DRUGBET}$).

Per ottenere il volume teorico che secondo questa analisi è attribuibile al farmaco ($V_{DRUGBET}$) bisogna normalizzare il volume residuo, ottenuto dall'analisi di adsorbimento di azoto, che è riferito ad un grammo di materiale costituito non dal solo supporto ma anche dal principio attivo. Per cui si applica la seguente equazione:

$$V_{DRUGBET} [\text{cc/gSIL}] = V_{OMS} [\text{cc/gSIL}] - (V_{OMS/DRUGBET} [\text{cc/gSIL+DRUG}] \times \frac{\text{gSIL} + \text{gDRUG}}{\text{gSIL}})$$

Ottenuto questo valore è possibile confrontarlo con quello ottenuto dall'analisi termogravimetrica (ΔV). Effettuando il rapporto tra la differenza dei due volumi di API e il volume che teoricamente è occupato dal farmaco secondo analisi di adsorbimento di azoto è possibile avere delle informazioni sul grado del volume occluso. Un valore più vicino a quello di $V_{DRUGBET}$ indica una maggiore occlusione dei pori.

Tabella 11.3 Volume occluso dal farmaco nel campione Grace_CTZ.

% farmaco	V_{DRUG} (cc/gSIL)	V_{OMS} (cc/gSIL)	$V_{OMS/DRUG}$ (cc/gSIL+D)	$V_{DRUGBET}$ (cc/gSIL)	ΔV (cc/gSIL)	% Volume occluso
6	0,053	1,29	0,73	0,513	0,46	89,7

Dal confronto risulta che dopo impregnazione il clotrimazolo tende a occludere i pori piuttosto che riempirli.

11.3 Confronto della Grace_CTZ con MSU-H-CTZ

Nel corso degli anni il gruppo di ricerca SMAC presso il Politecnico di Torino ha realizzato e caratterizzato diversi sistemi di silici mesoporose in grado di incorporare principi attivi utilizzabili per applicazioni dermatologiche.

Confrontando il campione descritto in precedenza con il drug delivery system MSU-H-CTZ, studiato da Gignone [29] e realizzato in scCO_2 con le seguenti operative: 100°C, 250 bar e 12h, è possibile osservare come la differenza di API impregnato è 5 volte maggiore in quest'ultimo caso.

Questo risultato è imputabile principalmente ad una diversa morfologia delle silici ed una ridotta dimensione dei grani. Infatti mentre la Grace XDP è disordinata l'MSU-H è molto ordinata. Questo garantisce una migliore diffusione del clotrimazolo nei pori più uniformi non solo dal punto di vista cinetico ma soprattutto dal fatto che in certi pori il farmaco non entra completamente e questo effetto è tanto più accentuato tanto più il sistema è eterogeneo.



A prova di quanto detto vi è il confronto tra i due sistemi, presente in tabella 11.4, fatto seguendo il ragionamento fatto nel paragrafo precedente.

Tabella 11.4 Volume occluso dal farmaco nei campioni Grace_CTZ e MSU-H-CTZ.

Silici	% farmaco	V _{DRUG} (cc/g _{SIL})	V _{OMS} (cc/g _{SIL})	V _{OMS/DRUG} (cc/g _{SIL+D})	V _{DRUGBET} (cc/g _{SIL})	ΔV (cc/g _{SIL})	% Volume occluso
Grace	6	0,053	1,29	0,73	0,513	0,46	89,7
MSU-H	30	0,265	0,9	0,32	0,457	0,192	42

E' pur vero che il tempo di impregnazione utilizzato nel caso della Grace_CTZ è di 8h ore per cui un maggiore tempo di trattamento in scCO₂ potrebbe garantire un aumento del loading. Tuttavia come dimostrato da Lopez [80], questo aumento della quantità di carico dopo 8h è limitato e sicuramente anche ripetendo la prova a 12 h non avremo un aumento di 5 volte rispetto al farmaco impregnato con 8h. Così come è stato dimostrato che nel caso dell' MSU-H-CTZ la quantità di clotrimazolo impregnata dopo 18 ore era la stessa di quella a 12 ore. Ciò indica come oltre un certo periodo si raggiunga l'equilibrio tra farmaco e anidride carbonica supercritica e il tempo di trattamento diventi ininfluente.

Altri fattori che vi possono influire sono l'area superficiale e la pressione di impregnazione che in quantità più elevate possono avere un effetto benefico sulla quantità di principio attivo caricato.

Infine un ultimo effetto che può incidere sulla quantità caricata è l'interazione superficie-molecola. Infatti non si possono escludere diverse tipologie di interazioni tra la superficie della silice e la molecola del farmaco che possono condizionare l'attività della molecola sulla superficie e quindi l'impregnazione.

11.4 Caratterizzazione del campione Grace_16HC_CTZ

Una evoluzione che si è cercata di attuare durante la tesi è stata quella di realizzare un sistema di drug delivery ancora più complesso rispetto a quelli normalmente presenti in letteratura. Infatti si è cercato di realizzare un campione aventi per una matrice 2 principi attivi allo scopo di garantire doppie funzioni durante l'applicazione in ambito dermatologico. Così si è scelto l'idrocortisone, avente funzione antinfiammatoria, e il clotrimazolo, con compito antimicotico. Esistono già delle pomate realizzate con composizioni di questi 2 farmaci come la Canesten crema.

E' stato realizzato questo DDS partendo dalla matrice Grace_16HC_Invecchiato in quanto, come espresso precedentemente, è quello che gode delle migliori caratteristiche in termini di quantità di idrocortisone caricato e percentuale di farmaco allo stato amorfo rispetto a tutti i sistemi studiati.

A differenza del metodo di impregnazione adottato per caricare l'idrocortisone all'interno della matrice data la scarsa solubilità del farmaco in CO₂ supercritica, in questo caso si è adottato questo metodo, più innovativo e meno tossico, data una buona solubilità del clotrimazolo. La scelta riguardante la temperatura di processo è stata fatta considerando sia la temperatura di

fusione del farmaco (150°C circa) che la temperatura minima per avere la CO₂ allo stato supercritico. Mentre la pressione utilizzata è stata scelta considerando alcuni lavori precedenti tra i quali quelli di Gignone [29].

Le condizioni di processo utilizzate sono state: pressione a 250 bar, temperatura di 100°C e tempo di impregnazione di 8 ore.

Al termine si è caratterizzato il sistema denominato **Grace_16HC_CTZ**, con tecniche di diffrazione ai raggi X, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, analisi termogravimetrica e analisi di adsorbimento di azoto.

- Diffrazione ai raggi X

Ultimata l'impregnazione il campione è stato analizzato con il diffrattometro a raggi X rivelando un aspetto quasi totalmente amorfo. Infatti non sono presenti picchi indicanti la cristallinità dei due principi attivi che sono presenti nella matrice, ad eccezione di un debolissimo picco per il valore 2θ di 14,5°, ovvero in corrispondenza di uno dei picchi dell'idrocortisone. Questo vorrebbe dire che, non solo il clotrimazolo è presente allo stato amorfo come valutato nel sistema condotto alle stesse condizioni di Grace_CTZ, ma soprattutto che l'anidride carbonica supercritica abbia un effetto amorfizzante sull'idrocortisone precedentemente impregnato con IWI.

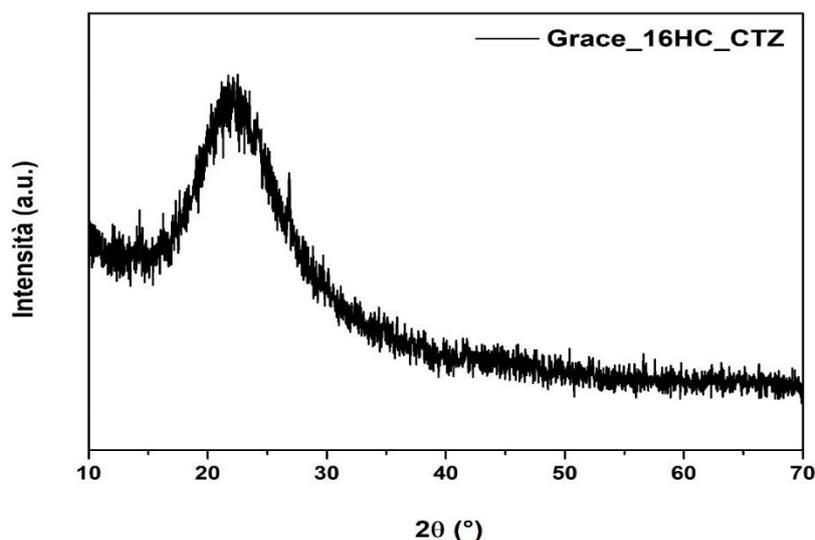


Figura 11.9 Spettro diffrattometrico del campione Grace_16HC_CTZ.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Analizzando il campione Grace_16HC_CTZ mediante spettrofotometro ad infrarossi è possibile ottenere il grafico mostrato in figura 11.10. La banda di assorbimento dei silanoli isolati, data l'interazione con i farmaci, è molto più bassa rispetto a quella dei silanoli interagenti. Si notano delle bande con valori di assorbanza anche molto intense per frequenze tra 3000 e 2850 cm⁻¹, attribuibili ai legami C-H alifatici assegnabili all'idrocortisone mentre sono poco intense e quasi non osservabili quelli dei C-H aromatici. Per basse lunghezze d'onda si evidenzia il picco a 1710 cm⁻¹ riconducibile al carbonile del gruppo carbossilico che a seguito di 2 legami idrogeno tende a shiftare rispetto al valore di lunghezza d'onda a cui si troverebbe

in condizioni gassose (1870 cm^{-1}) [72]. Quindi c'è il modo di assorbimento molto intenso per frequenza di 1640 cm^{-1} dato sia dai doppi legami C=C della molecola di idrocortisone che al carbonile legato all'anello. Tuttavia, la presenza di clotrimazolo si osserva da alcuni modi di vibrazione visibili intorno ai 1500 cm^{-1} indicanti lo stretching dei doppi legami C=C e C=N del principio attivo impregnato con scCO_2 . Questi modi sono poco intensi per cui la quantità presente potrebbe essere irrisoria. Questo valore si ha in maniera più precisa con la tecnica termogravimetrica.

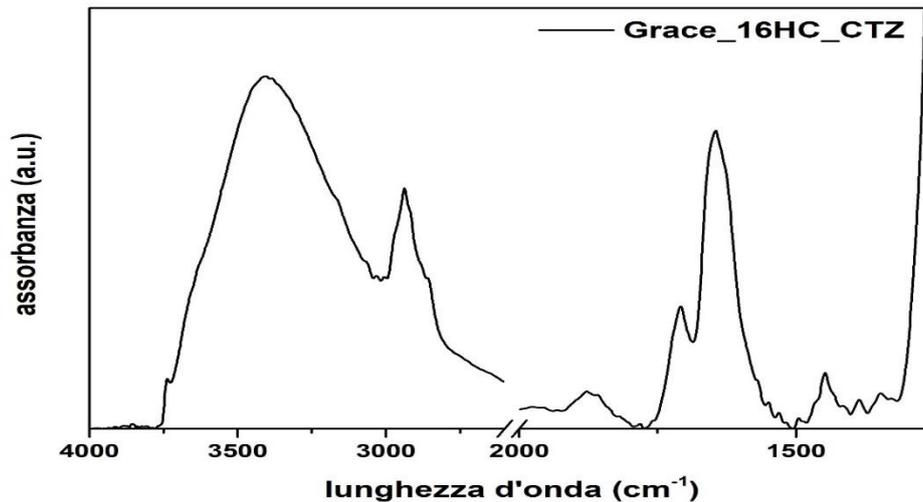


Figura 11.10 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_CTZ.

- Analisi Termogravimetrica

Dall'analisi termogravimetrica condotta sul campione si nota una perdita di peso nel range tra la temperatura ambiente e 800°C del 25 % rispetto al peso iniziale del farmaco. Considerando che nel primo tratto si ha una diminuzione del peso del campione a seguito di umidità e specie desorbite sulla superficie, il cui valore è di circa il 3%, si ha che il restante 22 % è attribuibile alla degradazione dei farmaci e perdita di silanoli isolati. Si osserva tra 100 e 250°C una diminuzione di peso con pendenza non molto ripida, probabilmente data la scarsa quantità di clotrimazolo, dopo di ciò quindi la pendenza della curva diventa molto più accentuata fino a raggiungere un peso finale del 75% rispetto alla quantità iniziale.

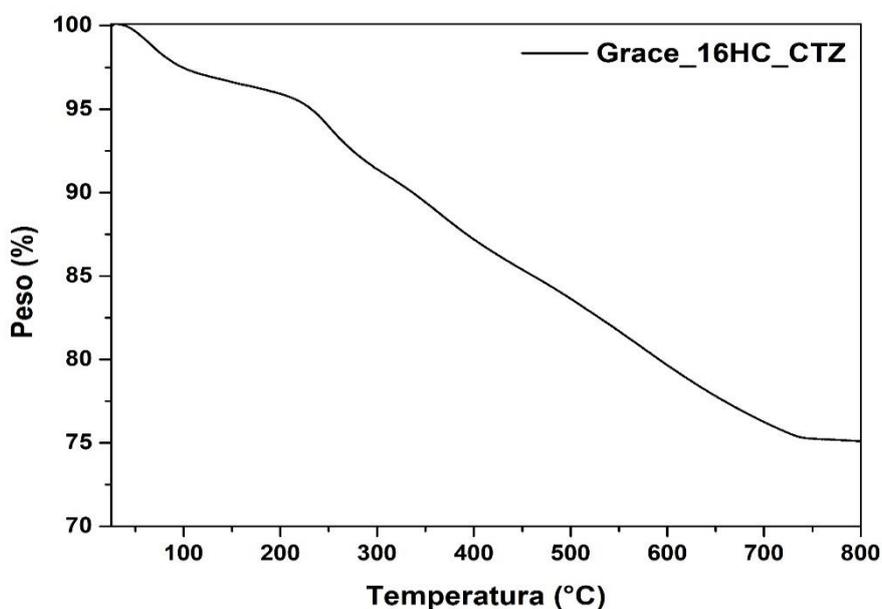


Figura 11.11 Curva termogravimetrica del campione Grace_16HC_CTZ.

- Analisi di adsorbimento di azoto

I risultati ottenuti mediante analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC_CTZ sono mostrati in questa sezione. Si ha una isoterma di tipo IV con un coppia di isteresi formatosi a seguito di condensazione capillare. Nel tratto in cui si ha il plateau ($0,1 < p/p_0 < 0,3$) si misura un'area superficiale specifica che risulta essere di $254 \text{ m}^2/\text{g}$ mentre non si possono fare speculazioni sulla geometria dei pori perché la forma del coppia di isteresi non può essere paragonata a nessuna delle forme proposte dalla IUPAC.

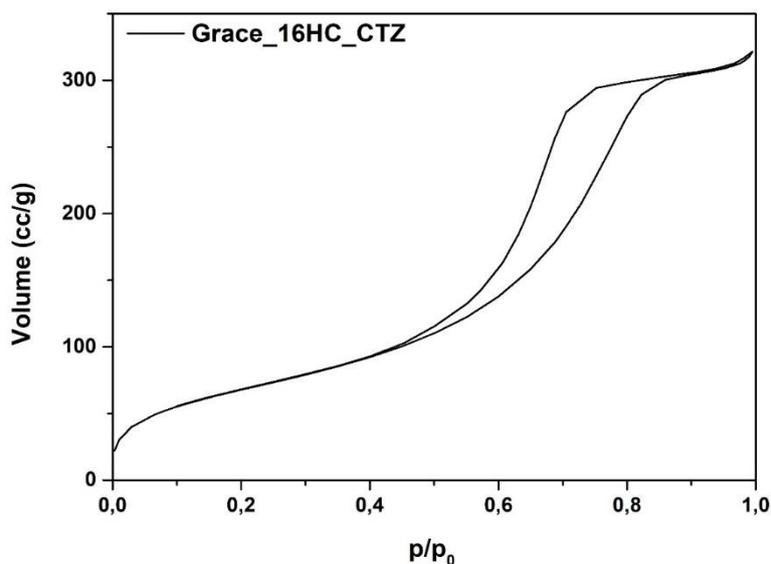


Figura 11.12 Isoterma di adsorbimento del campione Grace_16HC_CTZ.

Tabella 11.5 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC_CTZ.

Area Superficiale specifica	254 m ² /g
Volume dei pori	0,49 cm ³ /g
Diametro medio dei pori	7,7 nm

11.5 Confronto tra Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ

In questa sezione verranno confrontate le caratteristiche della silice prima e dopo l'impregnazione al fine di fare dei ragionamenti più precisi sul sistema di drug delivery system che è stato realizzato.

- Diffrazione ai raggi X

Gli spettri diffrattometrici confrontati in figura 11.13 mostrano come il picco dell'idrocortisone per il valore di 14,5° è molto meno intenso quasi da confondersi con i rumori di fondo.

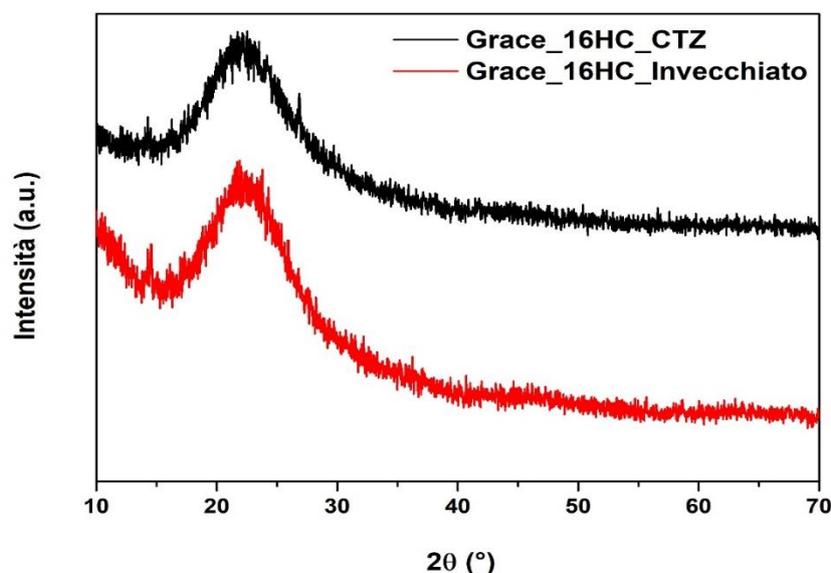


Figura 11.13 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Il campione Grace_16HC_CTZ esaminato allo spettrofotometro ad infrarossi mostra una banda dei silanoli interagenti più larga indice di una maggiore amorfizzazione del farmaco ed una maggiore interazione intermolecolare dei farmaci con i siti attivi della superficie a base silice. I picchi caratteristici del sistema Grace_16HC_Invecchiato si hanno nel campione avente i 2 principi attivi, tuttavia come evidenziato nella figura 11.14, mediante cerchio blu, vi sono dei picchi per lunghezze d'onda di 1500 cm⁻¹ attribuibili ai doppi legami C=C e C=N aromatici del clotrimazolo.

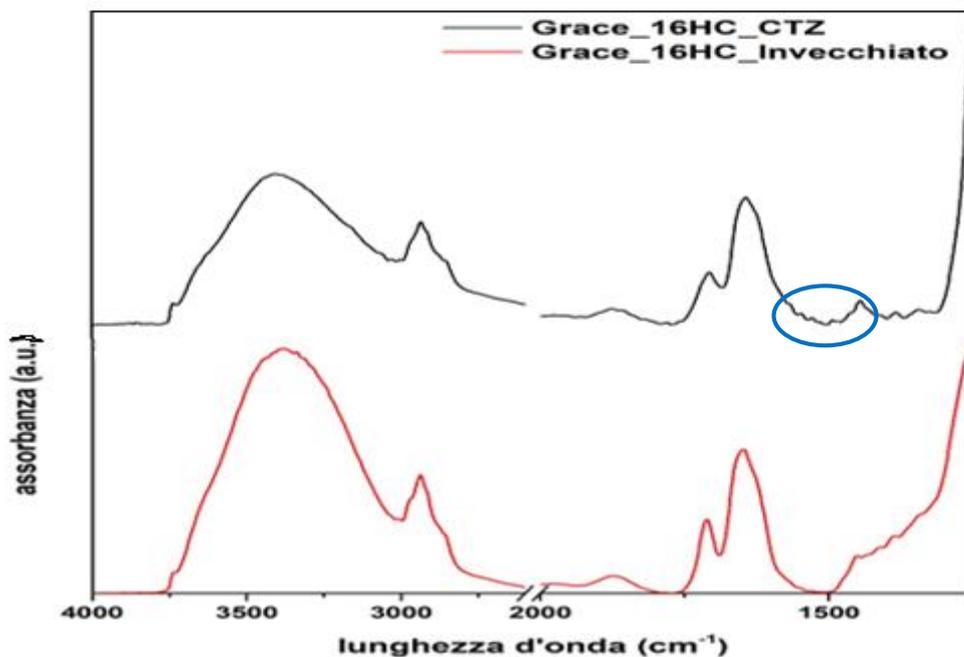


Figura 11.14 Confronto spettri infrarossi Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.

- Analisi Termogravimetrica

Dal confronto delle curve termogravimetriche si nota come, l'effetto idrofobico dei farmaci sulla superficie del sistema a 2 API sia maggiore rispetto al campione con il 16% in massa di idrocortisone. Considerando uguale il quantitativo di acqua chemisorbita e osservando che il primo tratto delle curve ha un diverso andamento a seguito della differente quantità di acqua fisisorbita si calcola il quantitativo di clotrimazolo presente. Alla temperatura di 150°C il campione Grace_16HC_CTZ ha un valore che risulta essere il 96,6% del peso iniziale mentre il supporto Grace_16HC_Invecchiato del 94%. Dopo 800°C i due campioni hanno un peso di 75% e 76,6% rispettivamente.

Da ciò è stato dedotto che il quantitativo di clotrimazolo caricato è stato del 4% circa.

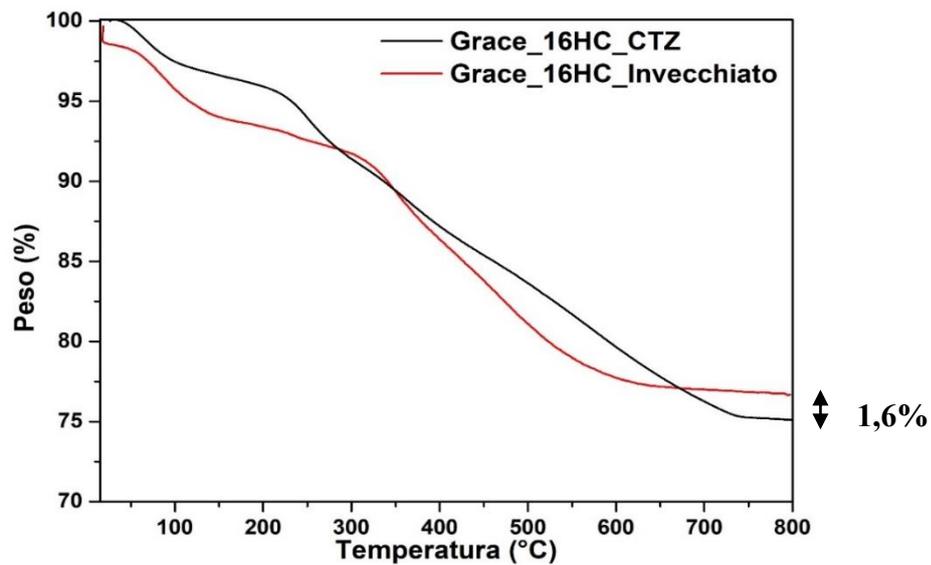


Figura 11.15 Confronto curve termogravimetriche Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Le isoterme di adsorbimento delle 2 curve sono di tipo IV e presentano un coppia di isteresi dato il fenomeno di condensazione capillare che si verifica nei pori mesoporosi. Una differenza che si ha è il punto di chiusura del cappio e una forma meno allungata di esso nel caso del sistema a 2 API.

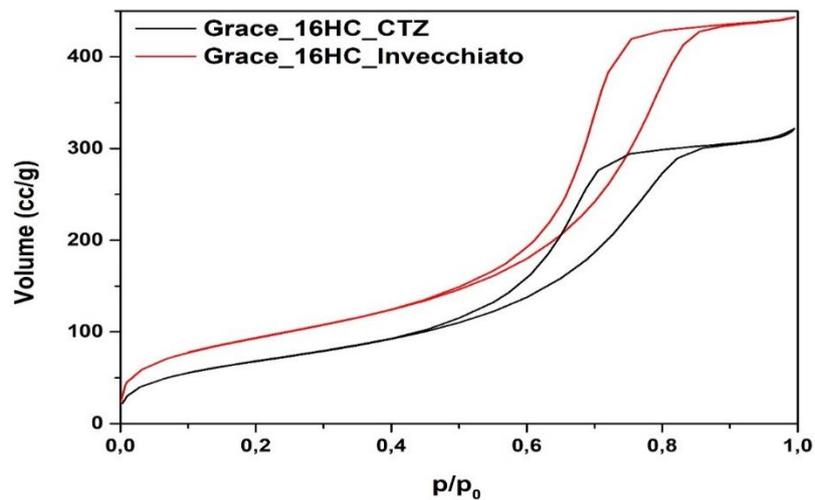


Figura 11.16 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.



Dai dati ottenuti mediante modello DFT si rileva una differenza del volume dei pori che si riduce a seguito di occlusione o occupazione dei pori. Anche l'area superficiale si riduce di circa 100 m²/g e ciò conferma una impregnazione del clotrimazolo con la silice.

Tabella 11.6 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.

	Grace_16HC_Invecchiato	Grace_16HC_CTZ
Area Superficiale specifica	345 m ² /g	254 m ² /g
Volume dei pori	0,68 cm ³ /g	0,49 cm ³ /g
Diametro dei pori	8 nm	7,7 nm

11.6 Rilascio dell' Idrocortisone

Come ultima prova, si è cercato di capire la quantità di idrocortisone che il sistema a 2 API è capace di rilasciare in PBS (Phosphate Buffered Saline), una soluzione che riproduce le condizioni corporee e confrontarlo con il rilascio dell'idrocortisone cristallino nelle stesse condizioni. Prima di fare ciò è stata costruita una retta di taratura a 6 punti avente l'obiettivo di risalire alla percentuale di farmaco rilasciato al termine delle 8 ore delle prove di rilascio.

11.6.1 Retta di taratura dell'Idrocortisone

Per la realizzazione della retta di taratura dell'idrocortisone è stato necessario preparare una soluzione madre delle soluzioni figlie costituite da acqua distillata e tampone fosfato Salino (PBS), prodotti dalla Sigma Aldrich, e idrocortisone.

Inizialmente è stato ricercato il valore di solubilità dell'idrocortisone in PBS, che risulta essere di 300 mg/L (dai dati ricavati da Drug Bank), ovvero 30 ppm. Quindi, si è considerato che la densità del PBS è uguale a quella dell'acqua ($\rho = 1 \text{ g/cc}$).

La soluzione madre è stata prodotta all'interno di un pallone da 1 L. Dai i dati sopra riportati si ha che per raggiungere la concentrazione di 30 ppm in 1 litro di soluzione sono necessari 30 mg. di HC come dimostrato nelle equazioni in basso:

$$m(\text{sol}) = \rho \times V = 1 \left[\frac{\text{g}}{\text{cc}} \right] \times 1000 [\text{cc}] = 1 \text{ Kg}$$

$$mg(\text{HC}) = C_{(\text{ppm})} \times m(\text{sol}) = 30 \left[\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right] \times 1 [\text{Kg}] = 30 \text{ mg}$$

Pronta la madre, sono state preparate le soluzioni figlie in matracci da 25 ml. per le soluzioni 1,2,3 e 4 e in matracci da 20 ml. e 10 ml. per le soluzioni 5 e 6 rispettivamente. Quindi queste sono state esaminate allo spettrofotometro al fine di ottenere le assorbanze necessarie per la realizzazione della retta di taratura. E' importante sottolineare che i valori di assorbanza visibili in tabella 11.7 sono quelle che lo strumento rileva alla lunghezza d'onda del farmaco, che nel caso dell'idrocortisone è di 250 nm.

Tabella 11.7 Concentrazioni e assorbanze della soluzione madre e delle figlie.

	C(ppm)	V _{matraccio} (ml)	g _{HC}	g _{prelievo}	g _{soluzione}	C(ppm) _{finale}	Assorbanza
Madre	30	1000	0,0312		1001,14	31,16	1,07
Soluzione 1	19	25		15,65	24,84	19,63	0,81
Soluzione 2	15	25		12,41	24,45	15,82	0,61
Soluzione 3	12	25		10,26	24,99	12,80	0,51
Soluzione 4	9	25		7,78	24,80	9,78	0,37
Soluzione 5	5	20		3,50	19,94	5,48	0,24
Soluzione 6	2	10		0,66	10,08	2,03	0,09

Ottenuti i valori di assorbanza è possibile realizzare la retta di taratura, riportata in figura 11.17.

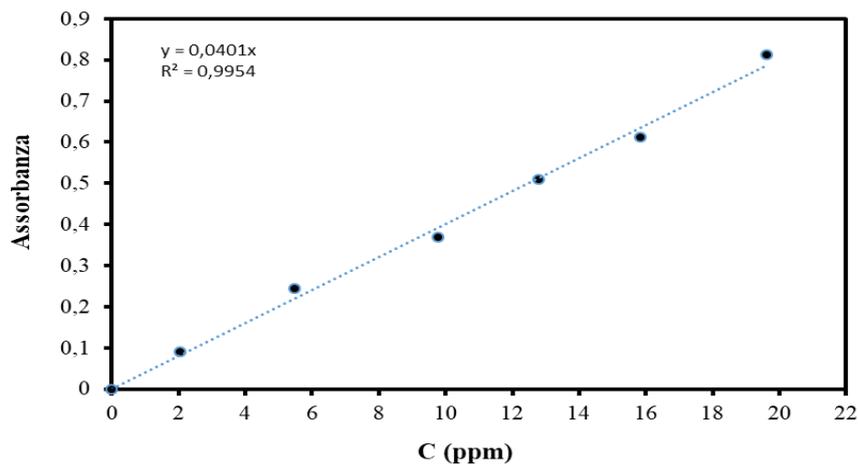


Figura 11.17 Retta di taratura dell'Idrocortisone.

11.6.2 Strumentazione prova di rilascio e condizioni utilizzate

Le prove di rilascio in PBS, condotte presso il laboratorio del dipartimento DISAT del Politecnico di Torino, sono avvenute utilizzando la strumentazione visibile nella figura sottostante.



Figura 11.18 Strumentazione per la prova di rilascio.

A sinistra è presente lo spettrofotometro mentre a destra si ha un dissolutore dotato di un sistema di riscaldamento ed una girante.

Il procedimento per la prova è stato il seguente:

Inizialmente è stato riempito il contenitore con dell'acqua distillata e portato alla temperatura di 40°C. Quindi è stato immerso un becher contenente la soluzione di PBS e abbassato l'agitatore affinché andasse a contatto con la soluzione. Per verificare che durante la durata della prova la temperatura si mantenga costante, è stato utilizzato un termometro. La soluzione era portata allo spettrofotometro UV/VIS mediante 2 tubicini, uno con la funzione di prelevare parte della soluzione da esaminare e l'altro per riportarla all'interno. Questo poteva avvenire però solo attraverso l'utilizzo di una pompa peristaltica. I tubicini sono collegati ad una cuvetta di 5 ml che viene tenuta nello spettrofotometro per tutta la durata della prova.

Le condizioni utilizzate per la realizzazione delle prove sono state:

- Temperatura: **40°C**
- Rotazione girante: **100 giri al minuto**
- Tempo di prova: **8h**
- Intervallo di tempo delle misurazioni: **5s**
- Lunghezza d'onda: **250 nm**

Versato il solvente (PBS) all'interno del becher e portato alla temperatura di 40°C è stato aggiunto il campione e fatta partire la prova. Al termine delle 8 ore si otteneva un grafico assorbanza/tempo.

11.6.3 Risultati ottenuti dalle prove di rilascio dell'idrocortisone cristallino

La prova di rilascio di 13,7 mg (18,27 ppm) di idrocortisone puro in 750 ml in soluzione tampone fosfato salina ha dato come risultati, in termini di assorbanza nel tempo, i seguenti valori:

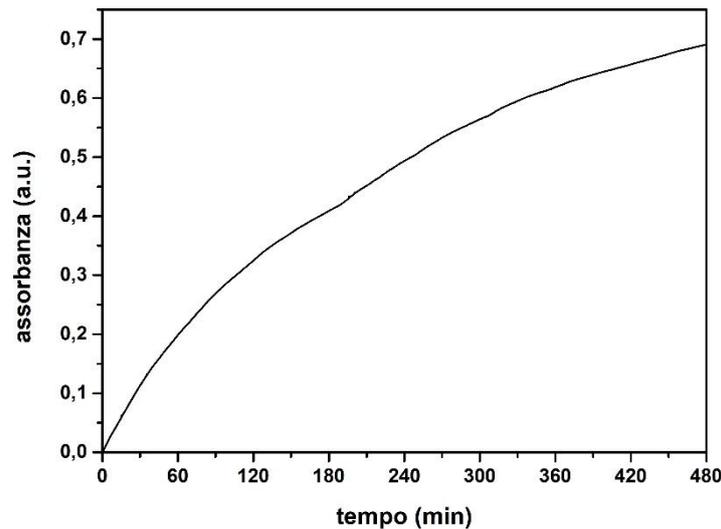


Figura 11.19 Curva assorbanza in funzione del tempo dell'idrocortisone puro.

Dopo 8 ore si ha che il valore di assorbanza è di 0,69052. Tuttavia questa curva non ha raggiunto un plateau indicando che aumentando il tempo di prova questo valore sarebbe ancora aumentato.

Dall'equazione della retta di taratura si riesce a risalire alla concentrazione finale di idrocortisone rilasciato. Essa risulta essere 17,22 ppm.

Da questo valore si risale alla quantità in grammi rilasciata mediante la seguente formula:

$$mg_{(HC)} = C(\text{ppm}) \times Kg_{(\text{sol})} = 17,22 \left[\frac{mg}{Kg} \right] \times 0,75 \text{ Kg} = 12,92 \text{ mg}$$

Data la quantità iniziale e rilasciata di farmaco si calcola la percentuale di principio attivo rilasciato.

$$\% \text{ farmaco rilasciato} = \frac{12,92 \text{ mg}}{13,7 \text{ mg}} \times 100 = 94,30\%$$

Il grafico 11.20 mostra come la quantità di HC rilasciato nel tempo aumenti costantemente nel tempo considerato.

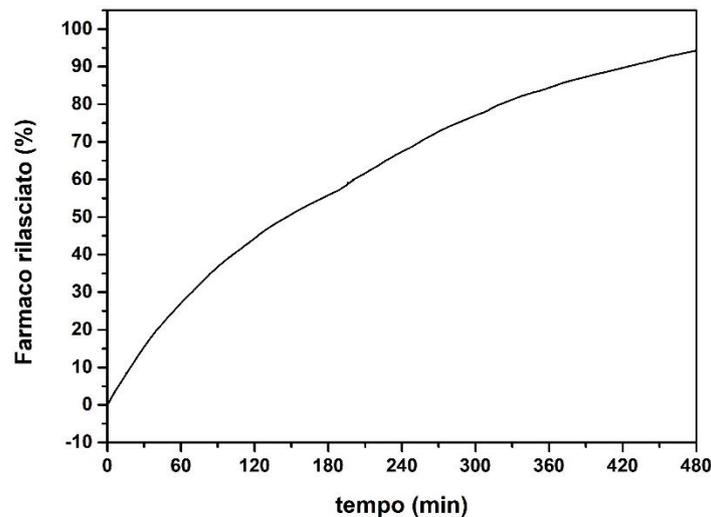


Figura 11.20 Farmaco rilasciato in funzione del tempo.

11.6.4 Risultati ottenuti dalle prove di rilascio dell'idrocortisone

La prova di rilascio è stata effettuata sul campione Grace_16HC_CTZ. In 750 ml di PBS sono stati aggiunti 90 mg. di campione all'interno del quale è presente 13,7 mg di HC (15,23% in massa).

Dalla prova è stato ottenuto il grafico assorbanza /tempo, visibile in figura 11.21.

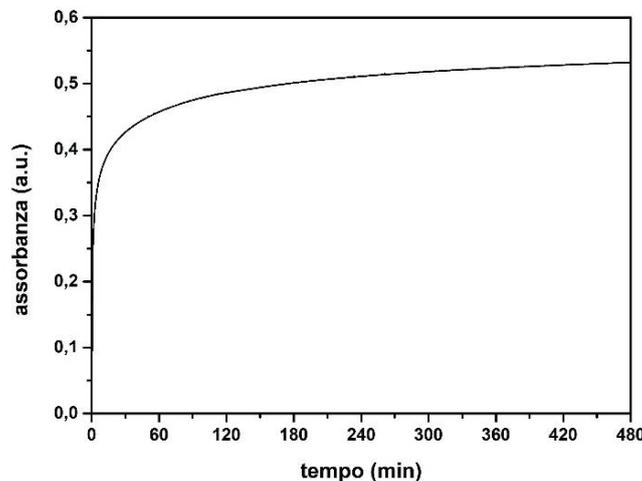


Figura 11.21 Curva assorbanza in funzione del tempo del campione Grace_16HC_CTZ.

Dopo 8 ore si ha che il valore di assorbanza è di 0,53203.

Dall'equazione della retta di taratura si riesce a risalire alla concentrazione finale di idrocortisone rilasciato. Essa risulta essere 13,27 ppm.

Da questo valore si risale alla quantità in grammi rilasciata mediante la seguente formula:

$$\text{mg}_{(\text{HC})} = \text{C}(\text{ppm}) \times \text{Kg}_{(\text{sol})} = 13,27 \left[\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right] \times 0,75 \text{ Kg} = 9,95 \text{ mg}$$

Data la quantità iniziale e rilasciata di farmaco si calcola la percentuale di principio attivo rilasciato.

$$\% \text{ farmaco rilasciato} = \frac{9,95 \text{ mg}}{13,7 \text{ mg}} \times 100 = 73\%.$$

Inoltre, è possibile vedere attraverso il grafico 11.22 la percentuale di farmaco rilasciato nel tempo.

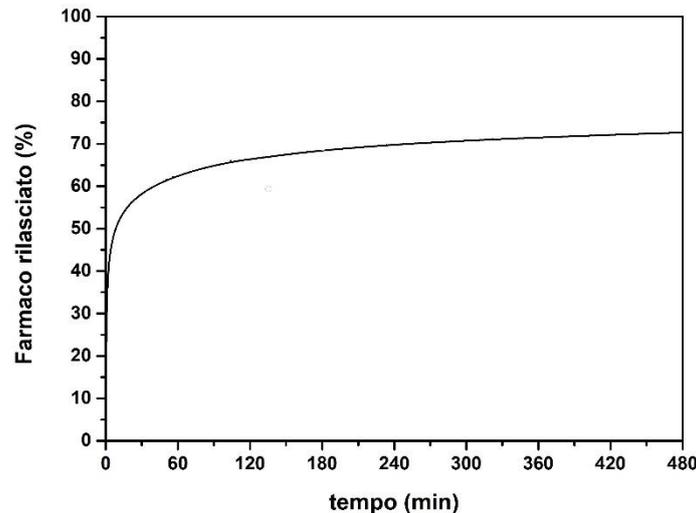


Figura 11.22 Farmaco rilasciato in funzione del tempo.

Dal grafico si osserva che dopo poco tempo la maggior parte del farmaco è stato rilasciato raggiungendo un plateau dopo circa 90 minuti. Questo dimostra come il farmaco fuoriesca nonostante la presenza del clotrimazolo che per scCO_2 è stato impregnato.

Inoltre confrontando le due prove di rilascio si osserva come il campione Grace_16HC_CTZ inizialmente rilascia l'idrocortisone molto più velocemente dell'idrocortisone puro. Infatti, dopo 120 minuti il sistema a 2 API rilascia circa il 20% in più rispetto al farmaco cristallino come visibile in figura 11.23. Nel grafico si nota come dopo 4 ore si ha una quantità di principio attivo rilasciato uguale. Un'ulteriore ipotesi che si può fare è che la presenza del Clotrimazolo possa influire sul rilascio dato che dopo 8 ore possa la quantità rilasciata essere del 73% contro il 94%.

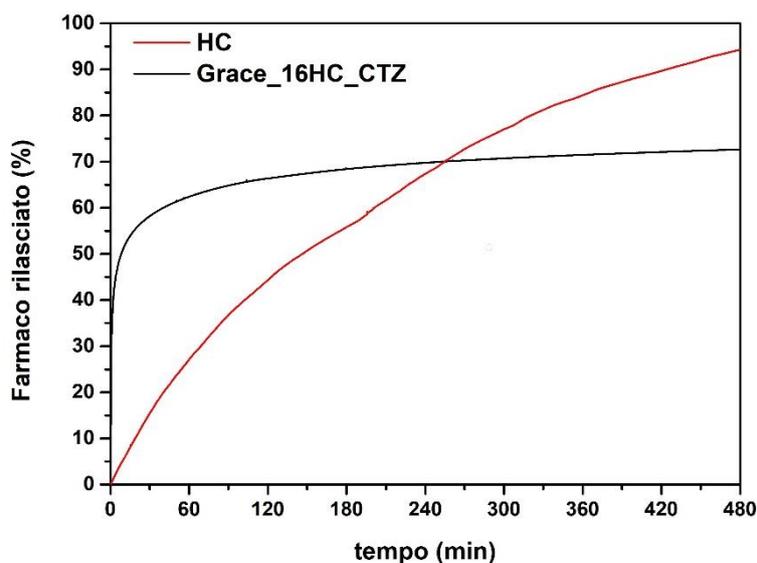


Figura 11.23 Confronto curve di rilascio.

Confrontando il sistema a doppia impregnazione con il sistema Grace/Piroxicam, studiato da Serpella [81] in soluzione gastrica simulata (HCl 0,1 M), si osserva un maggiore rilascio nel breve tempo dell'idrocortisone dal campione Grace_16HC_CTZ. Infatti mentre dopo 8 ore la quantità rilasciata di piroxicam adsorbito sulla matrice Grace XDP è del 10 % nel caso del sistema a 2 principi attivi avente la stessa matrice è del 73%. Quindi seppur in parte allo stato cristallino e ricoperto da clotrimazolo il sistema ha una buona efficienza perché l'idrocortisone non solo viene rilasciato velocemente ma anche con un percentuale molto elevata.



POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali



12. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati studiati dei sistemi carrier/Idrocortisone con l'obiettivo di utilizzarli in futuro data la funzione anti-infiammatoria del principio attivo. Osservata la bassa solubilità del farmaco con la $scCO_2$ supercritica si è potuto appurare l'impossibilità di dissolvere, mediante questa tecnica, l'idrocortisone all'interno delle silici mesoporose Grace XRD e MCM-41. Di conseguenza, l'impregnazione è avvenuta con il metodo tradizionale di Incipient Wetness Impregnation (IWI), osservando dall'analisi diffrattometrica la presenza di una parte del principio attivo allo stato cristallino sia all'interno della silice mesoporosa disordinata (Grace) che ordinata (MCM-41). Inoltre, confrontando uno stesso supporto caricato con percentuale diversa in massa di farmaco, si è notato un aumento della cristallinità all'aumentare del quantitativo di principio attivo. Poiché per garantire un buon funzionamento dei sistemi di rilascio del farmaco il principio attivo deve essere allo stato amorfo, sono stati effettuati degli studi di invecchiamento in ambienti secchi e umidi con lo scopo di analizzare le caratteristiche dei sistemi dopo 50 giorni. I campioni stoccati in ambiente asciutto e buio hanno mostrato una riduzione dei picchi di cristallinità degli spettri diffrattometrici rispetto ai corrispondenti campioni esaminati subito dopo impregnazione tanto più evidente tanto più elevato era il quantitativo di Idrocortisone impregnato. Al contrario, la caratterizzazione dei campioni mantenuti alla tensione di vapore dell'acqua per uno stesso periodo ha evidenziato un aumento della fase stabile e quindi delle condizioni sfavorevoli per l'applicazione in ambito topico. Ciò può essere dovuto ad una interazione tra i silanoli superficiali delle silici mesoporose e l'acqua l'interazione del supporto con il principio attivo favorendone la cristallizzazione. Inoltre, vi può essere la formazione di uno strato di H_2O intermedio tra la superficie della matrice e il farmaco che può giocare un ruolo importante durante la fase di rilascio. Successivamente un ulteriore studio condotto sulla Grace impregnata al 16 % in massa di principio attivo ha mostrato come un trattamento termico condotto per poche ore sia in grado di favorire la cristallizzazione all'interno della matrice.

Finita questa prima parte di caratterizzazioni, sono stati confrontati i sistemi delle due tipologie di silici mesoporose allo stato invecchiato con l'obiettivo di selezionare quella con le migliori proprietà in termini di alta quantità di farmaco caricato e totale o elevata quantità di API allo stato amorfo. La scelta è ricaduta sul sistema Grace_16HC_Invecchiato data una concentrazione non troppo bassa di idrocortisone da non assicurare un effetto terapeutico né troppo alta da garantire un fenomeno di tossicità. Tuttavia è anche il sistema ad avere una fase cristallina non molto accentuata a parità di massa, indice di una avvenuta amorfizzazione nel tempo. Un ulteriore confronto tra gli spettri infrarossi ha evidenziato come la migliore capacità della Grace XDP di interagire con l'idrocortisone dipenda dalla maggiore idrofilicità rispetto alla silice ordinata. Questo è osservabile dalle intensità dei picchi di silanoli isolati rispetto alla banda dei silanoli interagenti.

Nella parte finale dell'elaborato è stato realizzato il sistema a 2 API partendo dal campione selezionato e aggiungendovi, mediante adsorbimento da $scCO_2$, il Clotrimazolo, farmaco con funzione antifungina. La caratterizzazione ha messo in evidenza la natura amorfa del principio attivo e una ulteriore diminuzione del picco di cristallinità dell'Idrocortisone, probabilmente dovuto all'effetto amorfizzante dell'anidride carbonica supercritica. Le analisi FT-IR e di adsorbimento di azoto hanno quindi evidenziato rispettivamente alcuni picchi dovuti ai legami tipici del farmaco e una perdita di area superficiale specifica e volume dei pori confermando la



presenza del secondo principio attivo sulla matrice Grace_16HC_Invecchiato. Un dato quantitativo della quantità di Clotrimazolo, impregnato alle condizioni operative viste nel capitolo precedente, è dato dall'analisi termogravimetrica. Il risultato ha mostrato come solo il 4 % viene caricato sul supporto. Questo è imputabile alla presenza dell'idrocortisone che già presente sulla silice disordinata ne occupa i siti attivi liberi e ne occlude in parte i pori diminuendo la possibilità di interazioni tra le molecole di clotrimazolo e la superficie della Grace XDP. Tuttavia lo studio di un sistema Grace XDP e Clotrimazolo ottenuto mediante scCO₂ ha osservato che, alle stesse condizioni di impregnazione, la quantità caricata è del 5/6%, quindi non molto più elevata rispetto al campione contenente anche l'Idrocortisone. Confrontando quest'ultimo sistema di rilascio di farmaco con altri sistemi studiati in precedenza aventi come matrici silici differenti ma impregnati con clotrimazolo attraverso la medesima tecnica e in condizioni simili a quelle utilizzate, si è osservato come la morfologia della silice mesoporosa influisca notevolmente sul quantitativo di principio attivo impregnato. A seguire altri fattori influenzanti sono il tempo, la pressione e la temperatura di impregnazione. La prova di rilascio ha evidenziato come l'idrocortisone del sistema a 2 API venga rilasciato velocemente e già dopo circa 90 minuti raggiunga un plateau indicante una quantità massima di farmaco rilasciata del 73%. Comparando le curve di rilascio dell'idrocortisone puro con quelle del sistema complesso realizzato, si è osservato un andamento iniziale diverso con un rilascio maggiore nel caso del sistema. Questo è dovuto alla natura amorfa del farmaco che ne provoca un rilascio più veloce. Tuttavia dopo 8 ore la quantità rilasciata è minore rispetto all'idrocortisone allo stato puro (94 contro il 73 %). Questo comportamento è attribuibile alla presenza del Clotrimazolo che può impedire la fuoriuscita dell'Idrocortisone.

In conclusione, si ha che il sistema a 2 API è un metodo innovativo che in futuro potrà essere sicuramente migliorato con l'obiettivo di garantire la somministrazione di due o più farmaci con funzioni diverse durante uno stesso trattamento.

In particolare, in futuro, si potrà lavorare per:

- Una adeguata tipologia di silice mesoporosa avente una morfologia ordinata che ne permetta una diffusione migliore dei farmaci durante le impregnazioni, una alta idrofilicità con il principio attivo, alta area superficiale specifica e volume dei pori da permettere una maggiore impregnazione per la presenza di un maggior numero di siti attivi;
- Scelta adeguata dei farmaci che possano svolgere una funzione sinergica per un determinato trattamento;
- Studio delle condizioni ottimali per i processi di impregnazione, dal tempo alla pressione alla temperatura.



INDICE TABELLE

Tabella 2.1 Evoluzione dei DDS dal 1950	3
Tabella 4.1 Caratteristiche Idrocortisone.....	26
Tabella 4.2 Caratteristiche del clotrimazolo	28
Tabella 8.1 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace	47
Tabella 8.2 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC	52
Tabella 8.3 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace e Grace_16HC	55
Tabella 8.4 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC_Invecchiato	59
Tabella 8.5 Confronto Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato	62
Tabella 8.6 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto della Grace_16HC_Umido	65
Tabella 8.7 Confronto Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Umido e Grace_16HC_Invecchiato	67
Tabella 8.8 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto della Grace_16HC_70°_8h	69
Tabella 8.9 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h	70
Tabella 9.1 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dell'MCM-41	73
Tabella 9.2 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione MCM41_20HC_Invecchiato	79
Tabella 9.3 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione MCM41_10HC_Invecchiato	83
Tabella 9.4 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato	85
Tabella 9.5 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione MCM41_20HC_Umido.....	88
Tabella 9.6 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido	90
Tabella 10.1 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.....	93
Tabella 10.2 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_10HC_Invecchiato.....	96
Tabella 11.1 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_CTZ	100



Tabella 11.2 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace e Grace_CTZ.....	102
Tabella 11.3 Volume occluso dal farmaco nel campione Grace_CTZ.....	103
Tabella 11.4 Volume occluso dal farmaco nei campioni Grace_CTZ e MSU-H-CTZ.....	104
Tabella 11.5 Valori principali ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Grace_16HC_CTZ	108
Tabella 11.6 Confronto valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dei campioni Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.....	111
Tabella 11.7 Concentrazioni e assorbanze della soluzione madre e delle figlie.....	112



INDICE FIGURE

Figura 2.1 Principali fattori che influenzano lo sviluppo dei DDS	4
Figura 2.2 Profili per il rilascio costante e non del farmaco mediante sistemi di drug delivery	5
Figura 2.3 Struttura della cute	5
Figura 2.4 Metodi di somministrazione dei farmaci	7
Figura 2.5 Microemulsione	8
Figura 2.6 Nanoemulsioni	9
Figura 2.7 Liposomi	9
Figura 2.8 Dendrimeri	10
Figura 2.9 Nanoparticelle lipidiche solide	11
Figura 2.10 Nanoparticella polimerica	11
Figura 3.1 Le diverse fasi mesoporose di MCM: a) esagonale, b) cubica e c) lamellare	14
Figura 3.2 Diagramma di fase schematico per il tensioattivo cetiltrimetilammonio bromuro in acqua in funzione della temperatura	15
Figura 3.3 Processo di sintesi dell'MCM-41	15
Figura 3.4 Rappresentazione di una tipica silice Syloid	16
Figura 3.5 Possibili interazioni del clotrimazolo con una silice MSU-H.....	18
Figura 3.6 Funzionalizzazione delle silici mesoporose	19
Figura 3.7 Rappresentazione schematica del comportamento dinamico di ibuprofene a temperatura ambiente all'interno dei mesopori di MCM-41.	20
Figura 3.8 Applicazioni di silice mesoporose in vari campi biomedici	22
Figura 3.9 Sistema MSN-insulina	22
Figura 3.10 MSN con doxorubicina.....	23
Figura 4.1 Struttura 2D e 3D dell'idrocortisone	26
Figura 4.2 Struttura chimica del clotrimazolo	27
Figura 5.1 Diagramma di fase dell'anidride carbonica	30
Figura 5.2 Rappresentazione di un impianto per impregnazione del farmaco in un carrier mediante $scCO_2$	31
Figura 6.1 Modi vibrazionali	33
Figura 6.2 Zone dello spettro IR per regioni di frequenza	34
Figura 6.3 Classificazione delle isoterme di adsorbimento secondo la nomenclatura IUPAC	34
Figura 6.4 Classificazione del ciclo di isteresi	35
Figura 6.5 Esempio di curva termogravimetrica	37
Figura 6.6 Rappresentazione della legge di Bragg.	38
Figura 6.7 Schematizzazione di uno spettrofotometro UV/VIS.....	39



Figura 7.1 Spettro diffrattometrico dell'Idrocortisone.....	41
Figura 7.2 Spettro infrarosso dell'Idrocortisone	42
Figura 7.3 Curva termogravimetrica dell'Idrocortisone.....	43
Figura 7.4 Spettro diffrattometrico del Clotrimazolo.....	43
Figura 7.5 Spettro infrarosso del Clotrimazolo.....	44
Figura 8.1 Grace in polvere	45
Figura 8.2 Spettro XRD del campione Grace.....	46
Figura 8.3 Isoterma di adsorbimento del carrier Grace.....	46
Figura 8.4 Curva termogravimetrica del campione Grace	47
Figura 8.5 Spettro infrarosso del campione Grace	48
Figura 8.6 Composizione cilindretti per impregnazione con CO ₂ supercritica.....	48
Figura 8.7 Spettro del campione Grace_HC_scCO ₂	49
Figura 8.8 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC.....	51
Figura 8.9 Spettro XRD del campione Grace_16HC.....	51
Figura 8.10 Isoterma di adsorbimento del campione Grace_16HC	52
Figura 8.11 Curva termogravimetrica del campione Grace_16HC.....	53
Figura 8.12 Confronto spettri diffrattometrici Grace, Grace_16HC e Idrocortisone	53
Figura 8.13 Confronto spettri infrarossi Grace e Grace_16HC.....	54
Figura 8.14 Confronto isoterme di adsorbimento Grace e Grace_16HC.	55
Figura 8.15 Confronto curve termogravimetriche Grace e Grace_16HC.	55
Figura 8.16 Spettro XRD del campione Grace_10HC.	56
Figura 8.17 Confronto degli spettri XRD Grace_16HC e Grace_10HC.	57
Figura 8.18 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_Invecchiato.	58
Figura 8.19 Spettri XRD del campione Grace_16HC_Invecchiato.	58
Figura 8.20 Isoterma di adsorbimento del campione Grace_16HC_Invecchiato.	59
Figura 8.21 Curva termogravimetrica del campione Grace_16HC_Invecchiato.	60
Figura 8.22 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.	60
Figura 8.23 Confronto spettri infrarossi Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.	61
Figura 8.24 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato.	61
Figura 8.25 Confronto curve termogravimetriche Grace_16HC e Grace_16HC_Invecchiato	62
Figura 8.26 Essiccatore utilizzato per invecchiamento in ambiente umido.	63
Figura 8.27 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_Umido.	63
Figura 8.28 Spettro diffrattometrico del campione Grace_16HC_Umido.	64
Figura 8.29 Isoterma di adsorbimento del campione Grace_16HC_Umido.	64
Figura 8.30 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido.	65
Figura 8.31 Confronto spettri infrarossi Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido.	66



Figura 8.32	Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_Umido.	66
Figura 8.33	Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_70°_8h.	67
Figura 8.34	Spettro diffrattometrico del campione Grace_16HC_70°_8h.	68
Figura 8.35	Isoterma di adsorbimento del campione Grace_16HC_70°_8h.	68
Figura 8.36	Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h.	69
Figura 8.37	Confronto spettri infrarossi Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h.	70
Figura 8.38	Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC e Grace_16HC_70°_8h.	70
Figura 9.1	Spettro infrarosso della silice MCM-41.	71
Figura 9.2	Spettro diffrattometrico MCM-41 ad alti e bassi angoli.	72
Figura 9.3	Isoterma di adsorbimento dell'MCM-41.	72
Figura 9.4	Spettro infrarosso del campione MCM41_HC_scCO ₂ .	73
Figura 9.5	Spettro infrarosso del campione MCM41_20HC.	74
Figura 9.6	Spettro diffrattometrico del campione MCM41_20HC.	75
Figura 9.7	Confronto spettri diffrattometrici MCM-41 e MCM41_20HC.	75
Figura 9.8	Spettri infrarossi MCM-41 e MCM41_20HC.	76
Figura 9.9	Spettro diffrattometrico del campione MCM41_10HC.	76
Figura 9.10	Confronto spettri diffrattometrici MCM41_10HC e MCM41_20HC.	77
Figura 9.11	Spettro infrarosso del campione MCM41_20HC_Invecchiato.	78
Figura 9.12	Spettro diffrattometrico del campione MCM41_20HC_Invecchiato.	78
Figura 9.13	Isoterma di adsorbimento del campione MCM41_20HC_Invecchiato.	79
Figura 9.14	Confronto spettri diffrattometrici MCM41_20HC e MCM41_20HC_Invecchiato.	80
Figura 9.15	Confronto spettri infrarossi MCM41_20HC e MCM41_20HC_Invecchiato.	80
Figura 9.16	Spettro diffrattometrico del campione MCM41_10HC_Invecchiato.	81
Figura 9.17	Spettro infrarosso del campione MCM41_10HC_Invecchiato.	82
Figura 9.18	Isoterma di adsorbimento del campione MCM41_10HC_Invecchiato.	82
Figura 9.19	Confronto spettri diffrattometrici MCM41_10HC e MCM41_10HC_Invecchiato.	83
Figura 9.20	Confronto spettri diffrattometrici MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.	84
Figura 9.21	Confronto spettri infrarossi MCM41_10HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.	84
Figura 9.22	Confronto isoterme di adsorbimento MCM41_10HC_Invecchiato e MCM_41_20HC_Invecchiato.	85
Figura 9.23	Spettro infrarosso del campione MCM41_20HC_Umido.	86
Figura 9.24	Spettro diffrattometrico del campione MCM41_20HC_Umido.	87
Figura 9.25	Isoterma di adsorbimento del campione MCM41_20HC_Umido.	87
Figura 9.26	Confronto spettri diffrattometrici MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido.	88
Figura 9.27	Confronto spettri infrarossi MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido.	89



Figure 9.28 Confronto isoterme di adsorbimento MCM41_20HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Umido.	89
Figura 10.1 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.	92
Figura 10.2 Confronto spettri infrarossi MCM41_20HC_Invecchiato e Grace_16HC_Invecchiato. ..	92
Figura 10.3 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_20HC_Invecchiato.	93
Figura 10.4 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_10HC_Invecchiato.	94
Figura 10.5 Confronto spettri infrarossi MCM41_10HC_Invecchiato e Grace_16HC_Invecchiato. ..	95
Figura 10.6 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e MCM41_10HC_Invecchiato.	96
Figura 11.1 Spettro diffrattometrico del campione Grace_CTZ.	97
Figura 11.2 Spettro infrarosso del campione Grace_CTZ.	98
Figura 11.3 Curva termogravimetrica del campione Grace_CTZ.	99
Figura 11.4 Isoterma di adsorbimento del campione Grace_CTZ.	99
Figura 11.5 Confronto spettri diffrattometrici Grace e Grace_CTZ.	100
Figura 11.6 Confronto spettri infrarossi Grace e Grace_CTZ.	101
Figura 11.7 Curve termogravimetriche Grace e Grace_CTZ.	101
Figura 11.8 Confronto isoterme di adsorbimento Grace e Grace_CTZ.	102
Figura 11.9 Spettro diffrattometrico del campione Grace_16HC_CTZ.	105
Figura 11.10 Spettro infrarosso del campione Grace_16HC_CTZ.	106
Figura 11.11 Curva termogravimetrica del campione Grace_16HC_CTZ.	107
Figura 11.12 Isoterma di adsorbimento del campione Grace_16HC_CTZ.	107
Figura 11.13 Confronto spettri diffrattometrici Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.	108
Figura 11.14 Confronto spettri infrarossi Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.	109
Figura 11.15 Confronto curve termogravimetriche Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.	110
Figura 11.16 Confronto isoterme di adsorbimento Grace_16HC_Invecchiato e Grace_16HC_CTZ.	110
Figura 11.17 Retta di taratura dell'Idrocortisone.	112
Figura 11.18 Strumentazione per la prova di rilascio.	113
Figura 11.19 Curva assorbanza in funzione del tempo dell'idrocortisone puro.	114
Figura 11.20 Farmaco rilasciato in funzione del tempo.	115
Figura 11.21 Curva assorbanza in funzione del tempo del campione Grace_16HC_CTZ.	115
Figura 11.22 Farmaco rilasciato in funzione del tempo.	116
Figura 11.23 Confronto curve di rilascio.	117



BIBLIOGRAFIA

- [1] K. Park, “Controlled drug delivery systems: Past forward and future back” *J. Control. Release*, pp. 3–8, 2014.
- [2] A. W. Lloyd and J. Swarbrick, “Book review Drug delivery and targeting,” vol. 241, pp. 391–393, 2002.
- [3] “La pelle in dermatologia. Medical Derma Group.”,
<https://www.medicaldermagroup.com/derma/la-pelle-in-dermatologia/>
- [4] K. Mizukoshi, T. Nakamura, and A. Oba, “The relationship between dermal papillary structure and skin surface properties, color, and elasticity,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 22, pp. 295–304, 2016.
- [5] FIMP, SIAIP, S.I.Der. "Guida pratica sull'uso dei cortisonici nelle patologie dermatologiche dell'età pediatrica", 2017 .
- [6] MEDICINA ONLINE, “Vie di somministrazione di un farmaco: vantaggi e svantaggi”,
<https://medicinaonline.co/2017/01/02/vie-di-somministrazione-di-un-farmaco-tipi-differenze-vantaggi-e-svantaggi/>
- [7] M. Joshi, B. S. Butola, and K. Saha, “Advances in Topical Drug Delivery System: Micro to Nanofibrous Structures”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, pp. 853–867, 2014.
- [8] C. J. F. Bertens, M. Gijs, F. J. H. M. van den Biggelaar and R. M. M. A. Nuijts, “Topical drug delivery devices: A review”, *Exp. Eye Res.*, vol. 168, pp. 149–160, 2018.
- [9] D. J. Jeanmonod and Rebecca, “Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery” , *Intech open*, vol. 2, p. 64, 2018.
- [10] K. Rani and S. Paliwal, “A Review on Targeted Drug Delivery: its Entire Focus on Advanced Therapeutics and Diagnostics”, *Sch. J. Appl. Med. Sci.*, vol. 2, pp. 328–331, 2014.
- [11] C. M. R. R. Nastiti, T. Ponto, E. Abd, J. E. Grice, H. A. E. Benson and M. S. Roberts, “Topical nano and microemulsions for skin delivery”, *Pharmaceutics*, vol. 9, pp. 1–25, 2017.
- [12] J. Zhang and B. B. Michniak-Kohn, “Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole”, *Int. J. Pharm.*, vol. 536, pp. 345–352, 2018.
- [13] L. Microemulsioni, “MEDICHEM Nuove frontiere tecnologiche nella detersione del



- capillizio e della pelle”,2011.
- [14] Y. Singh, J. Gopal Meher, K. Raval, F. Ali Khan, M. Chaurasia, N. K. Jain, M. K.Chourasia, “Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery”, *J. Control. Release*, vol. 252, pp. 28–49, 2017.
- [15] K. Hörmann and A. Zimmer, “Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review”, *J. Control. Release*, vol. 223, pp. 85–98, 2016.
- [16] N. Monteiro, A. Martins, R. L. Reis and N. M. Neves, “Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine”, *J. R. Soc. Interface*, vol. 11, 2014.
- [17] C. E. Swenson, W. R. Perkins, P. Roberts and A. S. Janoff, “Liposome technology and the development of Myocet TM (liposomal doxorubicin citrate)”, pp. 1–7, 2001.
- [18] Z. Sideratou, C. Kontoyianni, G. I. Drossopoulou, and C. M. Paleos, “Synthesis of a folate functionalized PEGylated poly(propylene imine) dendrimer as prospective targeted drug delivery system”, vol. 20, pp. 6513–6517, 2010.
- [19] Manuela Aversa, Prof. Maurizio Selva, “Sintesi di derivati dendritici della trifenilammina per applicazioni optoelettroniche e catalitiche”, 2014.
- [20] M. Heidari-Kharaji, T. Taheri, D. Doroud, S. Habibzadeh and S. Rafati, “Solid lipid nanoparticle loaded with paromomycin: in vivo efficacy against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice model”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, pp. 7051–7060, 2016.
- [21] C. Tapeinos, M. Battaglini, and G. Ciofani, “Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases”, *J. Control. Release*, vol. 264, pp. 306–332, 2017.
- [22] G. Amoabediny, F. Haghirsadat, S. Naderinezhad, M. N. Helder, E. Akhouni Kharanaghi, J. Mohammadnejad Arough & B. Zandieh-Doulabi, “Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review”, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 67, pp. 383–400, 2018.
- [23] T. Patel, J. Zhou, J. M. Piepmeier and W. M. Saltzman, “Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 701–705, 2012.
- [24] H. I. Labouta and M. Schneider, “Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: Current status and critical review”, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, pp. 39–54, 2013.



- [25] M. Martínez-Carmona, Y. Gunko and M. Vallet-Regí, “ZnO Nanostructures for Drug Delivery and Theranostic Applications”, *Nanomaterials*, vol. 8, p. 268, 2018.
- [26] A. Benedetti and M. Testi, “Studio di sistemi a base di silice per applicazioni biomediche”, 2012.
- [27] F. Tang, L. Li and D. Chen, “Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery”, *Wiley online library*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201104763>
- [28] Yuanzhe Piao, “Designed Fabrication of Silica-Based Nanostructured Particle Systems for Nanomedicine Applications”, *Advanced Functional Materials*, vol. 18, pp. 3745–3758.
- [29] A. Gignone and P. Torino, “Ordered Mesoporous Silica for Drug Delivery in Topical Applications”, 2018.
- [30] M. Migani, “Sintesi di catalizzatori supportati su silice mesoporosa e loro utilizzo per l’idrodeclorurazione di molecole clorofluorate”, 2012.
- [31] C. Bharti, N. Gulati, U. Nagaich and A. Pal, “Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review”, *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 5, p. 124, 2015.
- [32] M. del Mar Oroval Cucarella Supervisors and R. Martínez-Mañez María Dolores Marcos Martínez Maria Carmen Coll Merino Valencia, “Design of novel bio-gated nanomaterials for sensing and therapeutic applications”, 2017.
- [33] Grace, “Syloid FP Silica”, 2013.
- [34] T. Lopez, E. Ortiz, R. Alexander-Katz, E. Basaldella and X. Bokhimi, “Cortisol controlled release by mesoporous silica”, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 5, pp. 170–177, 2009.
- [35] M. Vallet-Regí, F. Balas and D. Arcos, “Mesoporous Materials for Drug Delivery”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46., pp. 7548–7558, 2007.
- [36] M. Vallet-Regí, F. Balas, and D. Arcos, “Mesoporous materials for drug delivery”, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, pp. 7548–7558, 2007.
- [37] T. Azais, C. Tourne’-Peteilh, F. Aussenac, N. Baccile, C. Coelho, J.M. Devoisselle and F. Babonneau, “Solid-State NMR Study of Ibuprofen Confined in MCM-41 Material”, *Chem. Mater.*, vol. 18, pp. 6382–6390, 2006.
- [38] E. Juère and F. Kleitz, “On the nanopore confinement of therapeutic drugs into mesoporous silica materials and its implications”, *Microporous Mesoporous Mater.*,



- vol. 270, pp. 109–119, 2018.
- [39] A. Gignone, M. Delle Piane, M. Corno, P. Ugliengo and B. Onida, “Simulation and Experiment Reveal a Complex Scenario for the Adsorption of an Antifungal Drug in Ordered Mesoporous Silica”, *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, pp. 13068–13079, 2015.
- [40] F. Babonneau, L. Yeung, N. Steunou, C. Gervais, A. Ramila and M. Vallet-Regi, “Solid state NMR characterization of encapsulated molecules in mesoporous silica”, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 31, pp. 219–223, 2004.
- [41] S. W. Song, K. Hidajat, and S. Kawi, “Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: Influence of surface properties on matrix-drug interactions”, *Langmuir*, vol. 21, pp. 9568–9575, 2005.
- [42] T. Azaïs, G. Laurent, K. Panesar, A. Nossov, F. Guenneau, C.S. Cano, C. Tourné-Péteilh, J.M. Devoisselle and F. Babonneau, “Implication of Water Molecules at the Silica-Ibuprofen Interface in Silica-Based Drug Delivery Systems Obtained through Incipient Wetness Impregnation”, *J. Phys. Chem. C*, vol. 121, pp. 26833–26839, 2017.
- [43] K.P. Nartowski, D. Malhotra, L.E. Hawarden, J. Sibik, D. Iuga, J. Axel Zeitler, L. Fàbiàn and Y. Z. Khimyak, “¹⁹F NMR Spectroscopy as a Highly Sensitive Method for the Direct Monitoring of Confined Crystallization within Nanoporous Materials Angewandte”, pp. 8904–8908, 2016.
- [44] E. Juère, J. Florek, M. Bouchoucha, S. Jambhrunkar, K. Y. Wong, A. Popat and F. Kleitz “In Vitro Dissolution, Cellular Membrane Permeability, and Anti-Inflammatory Response of Resveratrol-Encapsulated Mesoporous Silica Nanoparticles”, *Mol.Pharm.*, vol. 14, pp. 4431–4441, 2017.
- [45] Q. Wei, C. M. Keck and R. H. Müller, “Oral hesperidin-Amorphization and improved dissolution properties by controlled loading onto porous silica”, *Int. J. Pharm.*, vol. 518, pp. 253–263, 2017.
- [46] M. Sönmez, D. Fikai, A. Fikai, L. Alexandrescu, M. Georgescu, R. Trusca, D. Gurau, M. Aurel Titu, E. Andronescu, “Applications of mesoporous silica in biosensing and controlled release of insulin”, *Int. J. Pharm.*, vol. 549, pp. 179–200, 2018.
- [47] Z. Luo, Y. Hu, K. Cai, X. Ding, Q. Zhang, M. Li, X. Ma, B. Zhang, Y. Zeng, P. Li, J. Li, J. Liu, Y. Zhao, “Intracellular redox-activated anticancer drug delivery by functionalized hollow mesoporous silica nanoreservoirs with tumor specificity”, *Biomaterials*, vol. 35, pp. 7951–7962, 2014.
- [48] R. Ravichandran, S. Gandhi, D. Sundaramurthi, S. Sethuraman and U. M. Krishnan,



- “Hierarchical mesoporous silica nanofibers as multifunctional scaffolds for bone tissue regeneration”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 24, pp. 1988–2005, 2013.
- [49] N. Zanzanizadeh Ezazi, M.A. Shahbazi, Y. V. Shatalin, E. Nadal, E. Mäkilä, J. Salonen, M. Kemell, A. Correia, J. Hirvonen, H. A. Santos “Conductive vancomycin-loaded mesoporous silica polypyrrole-based scaffolds for bone regeneration”, *Int. J. Pharm.*, vol. 536, pp. 241–250, 2018.
- [50] A. Gignone, L. Manna, S. Ronchetti, M. Banchemo and B. Onida, “Incorporation of clotrimazole in Ordered Mesoporous Silica by supercritical CO₂”, *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 200, pp. 291–296, 2014.
- [51] A. Nishiwaki, A. Watanabe, K. Higashi, Y. Tozuka, K. Moribe and K. Yamamoto, “Molecular states of prednisolone dispersed in folded sheet mesoporous silica (FSM-16)”, *Int. J. Pharm.*, vol. 378, pp. 17–22, 2009.
- [52] “Riassunto delle caratteristiche del prodotto” ,pp. 1–4, 2016.
- [53] “Idrocortisone corticosteroidi antinfiammatorio ad uso topico”,
<https://www.inran.it/idrocortisone/22344/>
- [54] C. D. Andela, S. M. Staufienbiel, S. D. Joustra, A. M. Pereira, E. F. C. van Rossum and N. R. Biermasz, “Quality of life in patients with adrenal insufficiency correlates stronger with hydrocortisone dosage, than with long-term systemic cortisol levels”, *Psychoneuroendocrinology*, vol. 72, pp. 80–86, 2016.
- [55] R. J. Tamargo, K. W. Leong and H. Brem, “Growth inhibition of the 9L glioma using polymers to release heparin and cortisone acetate”, *J. Neurooncol.*, vol. 9, pp. 131–138, 1990.
- [56] F. Zhang, J. Zhou, Y. Shi, P. Tavlaraki and K. Karaisz, “Mechanism driven structural elucidation of forced degradation products from hydrocortisone in solution”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 128, pp. 333–341, 2016.
- [57] P.D. Crowley and H.C. Gallagher, “Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. P.D.” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 117, pp. 611–617, 2014.
- [58] Pubchem, “clotrimazole” , <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/clotrimazole>.
- [59] P. Gurikov and I. Smirnova, “Amorphization of drugs by adsorptive precipitation from supercritical solutions: A review”, *J. Supercrit. Fluids*, vol. 132, pp. 105–125, 2018.
- [60] P. Girotra, S. K. Singh and K. Nagpal, “Supercritical fluid technology: A promising approach in pharmaceutical research”, *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 18, pp. 22–38, 2013.
- [61] “Carbon_dioxide_phase_diagram”, https://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_dioxide.



- [62] J. Peach and J. Eastoe, “Supercritical carbon dioxide: A solvent like no other”, *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 10, pp. 1878–1895, 2014.
- [63] A. Bouledjoudja, Y. Masmoudi, M. Van Speybroeck, L. Schueller and E. Badens, “Impregnation of Fenofibrate on mesoporous silica using supercritical carbon dioxide”, *Int. J. Pharm.*, vol. 499, pp. 1–9, 2016.
- [64] A. Hillerström, J. Van Stam, and M. Andersson, “Ibuprofen loading into mesostructured silica using liquid carbon dioxide as a solvent”, *Green Chem.*, vol. 11, pp. 662–667, 2009.
- [65] I. Smirnova, S. Suttiruengwong and W. Arlt, “Aerogels: Tailor-made carriers for immediate and prolonged drug release”, *KONA Powder Part. J.*, vol. 23, pp. 86–97, 2005.
- [66] M. Di Foggia, “caratterizzazione con tecniche spettroscopiche vibrazionali e di analisi”, 2014.
- [67] “Spettroscopia FT-IR. pdf.”
- [68] M. Muttakin, S. Mitra, K. Thu, K. Ito and B. B. Saha, “Theoretical framework to evaluate minimum desorption temperature for IUPAC classified adsorption isotherms”, *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 122, pp. 795–805, 2018.
- [69] P. T. M. Nguyen, D. D. Do and D. Nicholson, “Simulation study of hysteresis of argon adsorption in a conical pore and a constricted cylindrical pore”, *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 396, pp. 242–250, 2013.
- [70] B. Rojek and M. Wesolowski, “Compatibility studies of hydrocortisone with excipients using thermogravimetric analysis supported by multivariate statistical analysis”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 127, pp. 543–553, 2017.
- [71] H. S. M. Ali, P. York, A. M. A. Ali and N. Blagden, “Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling”, *J. Control. Release*, vol. 149, pp. 175–181, 2011.
- [72] K. I. Takei, R. Takahashi and T. Noguchi, “Correlation between the hydrogen-bond structures and the C=O stretching frequencies of carboxylic acids as studied by density functional theory calculations: Theoretical basis for interpretation of infrared bands of carboxylic groups in proteins”, *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 6725–6731, 2008.
- [73] G. Socrates, “Infrared and Raman characteristic group frequencies”, *John Wiley & Sons Ltd*, 2004.
- [74] Y. Fazli, Z. Shariatnia, I. Kohsari and A. Azadmehr, “A novel chitosan-polyethylene



- oxide nano fibrous mat designed for controlled co-release of hydrocortisone and imipenem / cilastatin drugs”, *Int. J. Pharm.*, vol. 513, pp. 636–647, 2016.
- [75] M. O. Ahmed, I. El-Gibaly and S. M. Ahmed, “Effect of cyclodextrins on the physicochemical properties and antimycotic activity of clotrimazole”, *Int. J. Pharm.*, vol. 171, pp. 111–121, 1998.
- [76] Grace, “Grace - Silica Drug Delivery” 2015.
- [77] R. Ghaderi, P. Artursson and J. Carlfors, “A new method for preparing biodegradable microparticles and entrapment of hydrocortisone in -PLG microparticles using supercritical fluids”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 10, pp. 1–9, 2000.
- [78] S. P. Velaga, R. Ghaderi, and J. Carlfors, “Preparation and characterisation of hydrocortisone particles using a supercritical fluids extraction process” vol. 231, pp. 155–166, 2002.
- [79] Drug Bank, “Hydrocortisone.”, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00741>.
- [80] F. Lopez , “Ossido di Zinco mesoporoso come carrier di Ibuprofene”, 2018.
- [81] L. Serpella, O. Barbara and S. Ronchetti, “Silice mesoporosa come carrier di Piroxicam”, 2017.



POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali



RINGRAZIAMENTI

Per la seconda volta sono arrivato a questo momento, scrivere i ringraziamenti a conclusione di una tesi di laurea, per ringraziare tutte le persone che mi hanno sostenuto lungo il mio percorso di studi universitari, giunto alla fine. Finalmente, si spera, che questa sia l'ultima!

E' difficile in poche righe ricordare tutte le persone che ho avuto modo di conoscere in questo importante periodo della mia vita e che mi hanno aiutato a crescere sia dal punto di vista professionale che umano ma proverò a farlo sperando di non dimenticare qualcuno.

Innanzitutto, vorrei ringraziare le prof.ssa Barbara Onida e Silvia Maria Ronchetti, relatrici di questa tesi di laurea, per il supporto che mi hanno fornito durante il periodo di tesi e per le nozioni che hanno messo a mia disposizione. Grazie a loro ho acquisito molte conoscenze indispensabili per la realizzazione della tesi ma soprattutto per il futuro. Un ulteriore ringraziamento va ai Prof. Marco Armandi, Luigi Manna e Alberto Costanzo per avermi aiutato durante l'utilizzo di alcune strumentazioni.

Ringrazio i miei amici e colleghi di corso, di cui non cito i nomi altrimenti ci vorrebbe un'ulteriore tesi, con cui ho condiviso attimi di gioia e di tristezza, ma che nonostante tutto sono rimasti accanto a me in questi anni di Università.

Ringrazio i miei parenti per avermi sempre incoraggiato, suggerito e sostenuto.

Grazie a Clarissa che dal giorno della partenza per Torino mi ha sostenuto rendendo meno pesante la lontananza da casa. Grazie di sopportarmi e supportarmi durante i momenti più difficili e non solo. Grazie per il contributo al mio lavoro, le emozioni, la comprensione, l'aiuto, la fiducia che sei riuscita a darmi in questi anni.

Ringrazio i miei fratelli, Francesco e Martina, che mi hanno appoggiato moralmente durante gli studi universitari.

Infine ma non per ultimi un immenso e doveroso ringraziamento va ai miei genitori, a cui dedico questa tesi, poiché senza di loro non avrei potuto sostenere questi anni di studio e non avrei provato questa esperienza lontano da casa ma soprattutto per il sostegno morale nei momenti di sconforto e per avermi sostenuto anche quando credevo di non farcela. Grazie per avermi SEMPRE dato la forza e la fiducia per andare avanti.