

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

Tesi di Laurea Magistrale

**Adsorbimento di vitamina D₃ su SBA-15 mediante
CO₂ supercritica**



Relatore

Prof.ssa Barbara Onida

Correlatori

Prof. Luigi Manna

Dott.ssa Marta Gallo

Candidato

Vito Martorella
(matr. 257845)

Marzo 2021

Indice

Acronimi	III
Elenco delle tabelle.....	V
Elenco delle figure	VI
Introduzione.....	VIII
Capitolo 1 – Vitamina D.....	1
1.1 Introduzione	1
1.2 Struttura chimica	1
1.3 Metabolismo e funzioni.....	3
1.4 Tossicità.....	4
1.5 Psoriasi e vitamina D	4
Capitolo 2 – Silici mesoporose come carrier di vitamina D₃.....	6
2.1 Sistemi per il rilascio di farmaco (DDS)	6
2.2 Sistemi per il rilascio di vitamina D₃	7
2.3 Silici mesoporose	9
2.4 Sintesi della SBA-15	12
2.5 Tecniche di impregnazione	13
2.4.1 Adsorbimento da soluzione	13
2.4.2 Incipient Wetness Impregnation.....	14
2.4.3 Metodo di fusione.....	15
2.4.4 CO ₂ supercritica.....	16
Capitolo 3 – Materiali e metodi	19
3.1 Materiali	19
3.2 Silici mesoporose utilizzate.....	19
3.3 Il processo di adsorbimento da scCO₂.....	20
3.4 Tecniche di caratterizzazione	21
3.4.1 Diffrazione a raggi X	21
3.4.2 Analisi termogravimetrica.....	23
3.4.3 Spettroscopia FT-IR	24
3.4.4 Analisi di adsorbimento di azoto.....	24
3.4.5 Spettroscopia UV/Visibile	26
Capitolo 4 – Caratterizzazione dei supporti in silice mesoporosa.....	28
4.1 Analisi di adsorbimento di azoto.....	28
4.2 Analisi Termogravimetrica.....	31
4.3 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.....	32
Capitolo 5 – Caratterizzazione dei supporti contenenti vitamina D₃.....	34

5.1	Diffrazione a raggi X.....	34
5.2	Analisi termogravimetrica	36
5.3	Spettroscopia FT-IR	40
5.4	Analisi adsorbimento di azoto	42
Capitolo 6 – Estrazione della vitamina D₃.....		47
6.1	Retta di taratura.....	47
6.2	Prove di estrazione in etanolo	48
Capitolo 7 – Conclusioni e sviluppi futuri		53
Bibliografia		55
Ringraziamenti.....		60

Acronimi

VitD3	Vitamina D ₃
scCO2	Anidride carbonica supercritica
DDS	Drug Delivery System
MSNs	Mesoporous Silica Nanoparticles
TEOS	Tetraetilortosilicato
SBA-15	Santa Barbara Amorphous n°15
SCF	Supercritical Fluid
IWI	Incipient Wetness Impregnation
EtOH	Etanolo
XRD	X-ray diffraction
TGA	Analisi termogravimetrica
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
UV/Vis	Spettroscopia Ultravioletto/Visibile
SBA_8nm_rif	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 8 nm
SBA_4nm_rif	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 4 nm
SBA_8nm_vitD3	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 8 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 1:1
SBA_4nm_vitD3	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 4 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 1:1
SBA_8nm_0.5vitD3	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 8 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1
SBA_4nm_0.5vitD3	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 4 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1
SBA_8nm_0.5vitD3_48gg	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 8 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1, dopo 48 giorni dall'adsorbimento

SBA_4nm_0.5vitD3_48gg	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 4 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1, dopo 48 giorni dall'adsorbimento
sol_8nm_vitD3_24h+US	Soluzione a base di etanolo contenente silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 8 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 1:1, dopo 24h e post trattamento ad ultrasuoni
sol_4nm_vitD3_24h+US	Soluzione a base di etanolo contenente silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 4 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 1:1, dopo 24h e post trattamento ad ultrasuoni
sol_8nm_0.5vitD3_24h+US	Soluzione a base di etanolo contenente silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 8 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1, dopo 24h e post trattamento ad ultrasuoni
sol_4nm_0.5vitD3_24h+US	Soluzione a base di etanolo contenente silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 4 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1, dopo 24h e post trattamento ad ultrasuoni
SBA_8nm_0.5vitD3_postEtOH	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 8 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1, filtrata post estrazione in etanolo
SBA_4nm_0.5vitD3_postEtOH	Silice SBA-15 con diametro nominale dei pori di 4 nm, caricata con vitamina D ₃ con rapporto in massa supporto/farmaco di 2:1, filtrata post estrazione in etanolo

Elenco delle tabelle

Tabella 3.1: Condizioni operative.....	21
Tabella 3.2: Condizioni operative del test XRD ad alti angoli.	23
Tabella 4.1: Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del supporto di SBA_8nm_rif.	30
Tabella 4.2: Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del supporto di SBA_4nm_rif.	30
Tabella 5.1: Pertite di peso percentuali, contenuto di silanoli e di vitamina D ₃ nei supporti.....	39
Tabella 5.2: Confronto dei parametri caratteristici tra SBA_8nm_rif e campioni caricati SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3.....	43
Tabella 5.3: Confronto dei parametri caratteristici tra SBA_4nm_rif e campioni caricati SBA_4nm_vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3.....	45
Tabella 5.4: Confronto dei parametri superficiali tra SBA_4 e SBA_4_vitD3 (tecnica IWI) [37].....	46
Tabella 6.1: Taratura della vitamina D ₃ in etanolo.	48

Elenco delle figure

Figura 1.1: Struttura della vitamina D ₃ o colecalciferolo [3].....	2
Figura 1.2: Trasformazione della vitamina D ₃ in 1,25-diidrossi-D ₃ [3].....	2
Figura 1.3: Metabolismo della vitamina D [1].....	3
Figura 1.4: Stato vitaminico D nei soggetti con psoriasi e controlli. *p < 0,05 vs controlli (adattato da Ricceri et al., 2013) [7].	5
Figura 2.1: Profili per un rilascio costante e non del farmaco mediante sistemi di drug delivery [12].	7
Figura 2.2: Struttura porosa della silice SBA-15 con silanoli in superficie [29].	12
Figura 2.3: Processo di sintesi della silice SBA-15 [27].....	13
Figura 2.4: Diagramma di fase dell'anidride carbonica [39].....	16
Figura 2.5: Rappresentazione schematica delle tre fasi del processo di impregnazione [42].	17
Figura 2.6: Esempio della rappresentazione schematica del processo di impregnazione mediato da scCO ₂ in impianti polimerici [43].	17
Figura 3.1: Disposizione delle molecole di farmaco all'interno dei pori [46].	20
Figura 3.2: Schematizzazione dei cilindretti inseriti all'interno dell'apparato d'impregnazione di CO ₂ supercritica.	20
Figura 3.3: Apparato sperimentale [47].	21
Figura 3.4: Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg [51].	22
Figura 3.5: Regioni dello spettro IR [53].	24
Figura 3.6: Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [28].	25
Figura 3.7: La relazione tra la forma dei pori e l'isoterma di adsorbimento-desorbimento [28].....	26
Figura 3.8: Schematizzazione di uno spettrofotometro UV/Vis [55].....	27
Figura 4.1: Isoterma di adsorbimento del supporto di silice SBA-15 con pori medi nominali di 8 nm.	28
Figura 4.2: Isoterma di adsorbimento del supporto di silice SBA-15 con pori medi nominali di 4 nm.	29
Figura 4.3: Grafico della distribuzione dei pori (BJH) nel supporto di silice SBA_8nm_rif.	29
Figura 4.4: Grafico della distribuzione dei pori (BHJ) nel supporto di silice SBA_4nm_rif.	30
Figura 4.5: Curva termogravimetrica del supporto di SBA_8nm_rif [47].....	31
Figura 4.6: Curva termogravimetrica del supporto di SBA_4nm_rif [37].....	32
Figura 4.7: Spettro infrarosso del campione di SBA_8nm_rif [57].....	32
Figura 4.8: Spettro infrarosso del campione di SBA_4nm_rif.....	33
Figura 5.1: Spettro XRD della vitamina D ₃ [58].....	35
Figura 5.2: Spettro XRD – Confronto tra campioni caricati con pori di 8 nm.....	35
Figura 5.3: Spettro XRD – Confronto tra campioni caricati con pori di 4 nm.....	36

Figura 5.4: Curva termogravimetrica della vitamina D ₃ [59].....	36
Figura 5.5: Curva TGA – Confronto tra campioni con pori da 8 nm.....	37
Figura 5.6: Curva TGA – Confronto tra campioni con pori da 4 nm.....	37
Figura 5.7: Curva TGA – Confronto su campioni caricati con quantità di supporto/farmaco in proporzione di 1:1.	38
Figura 5.8: Curva TGA – Confronto su campioni caricati con quantità di supporto/farmaco in proporzione di 2:1.	39
Figura 5.9: Spettro FT-IR della vitamina D ₃	40
Figura 5.10: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni con pori da 8 nm.	41
Figura 5.11: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni con pori da 4 nm.	42
Figura 5.12: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_8nm_rif e campioni caricati SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3.....	43
Figura 5.13: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_8nm_rif e campioni caricati SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3.....	43
Figura 5.14: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_4nm_rif e campioni caricati SBA_4nm_vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3.....	44
Figura 5.15: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_4nm_rif e campioni caricati SBA_4nm_vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3.....	45
Figura 5.16: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_4 e SBA_4_vitD3 (tecnica IWI) [37].	46
Figura 6.1: Retta di taratura – Vitamina D ₃ in etanolo.....	48
Figura 6.2: Spettro UV/Vis – Confronto tra le soluzioni estratte e la soluzione figlia da 10 ppm.	50
Figura 6.4: Spettro UV/Vis – Confronto tra le soluzioni estratte e la soluzione figlia da 20 ppm.	50
Figura 6.6: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni caricati con pori da 8 nm.	51
Figura 6.7: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni caricati con pori da 4 nm.	52

Introduzione

La vitamina D₃, forma biologicamente importante della vitamina D, è uno steroide liposolubile che può essere sia assorbita tramite ingestione sia sintetizzata a partire da cellule della cute in seguito all'esposizione solare. È stato dimostrato che la vitamina D₃, detta anche colecalciferolo, è una molecola associata a numerose funzioni nel corpo umano, tra cui rimodellamento osseo, attività antitumorale, malattie autoimmuni e trattamento di diversi disturbi della pelle, come ad esempio la psoriasi. Tra i potenziali campi di applicazione della vitamina D₃, l'interesse scientifico si sta concentrando sullo sviluppo di nuovi farmaci e sistemi di rilascio controllato all'interno dell'organismo. Grazie alla sua struttura chimica, la vitamina D₃ è un eccellente candidato per il trasporto transdermico, fatta eccezione per la sua elevata lipofilia che ne riduce la biodisponibilità. Per ovviare a questo problema è possibile ricorrere a sistemi di *drug delivery*.

Lo sviluppo di sistemi per il rilascio controllato di farmaco basati su micro e nanoparticelle rappresenta uno dei campi di ricerca di maggiore interesse in ambito biomedico e farmaceutico. Tra i materiali più promettenti per questo utilizzo sono note le silici mesoporose (pori da 2 nm a 50 nm) con porosità ordinata, poiché caratterizzate da un'elevata area superficiale specifica, un elevato volume poroso, la possibilità di funzionalizzazione e la biocompatibilità. Le peculiarità di questi sistemi risultano particolarmente rilevanti per le applicazioni topiche, in cui il principio attivo agisce solo a livello locale sul sito di interesse consentendo un adeguato dosaggio del farmaco e limitandone gli effetti collaterali.

La scopo di questa tesi è lo studio di due diverse silici commerciali del tipo SBA-15 a mesoporosità ordinata, con diametro medio nominale dei pori rispettivamente di 4 nm e 8 nm, come sistema per il rilascio di vitamina D₃ in vista di un'applicazione in campo topico. Dopo un'analisi bibliografica sulla vitamina D₃, le sue applicazioni e i sistemi per somministrarla, è stata effettuata una parte sperimentale in cui il principio attivo è stato adsorbito nelle due tipologie di campioni commerciali di silice SBA-15 utilizzando CO₂ supercritica (scCO₂) come solvente. È stata eseguita su tutti i campioni, sia tal quali che contenenti il principio attivo, una caratterizzazione chimico-fisica. Infine, è stata effettuata l'estrazione della vitamina D₃ in etanolo.

Il primo capitolo di questo elaborato è dedicato allo studio del principio attivo utilizzato, la vitamina D₃, delle sue caratteristiche e delle proprietà antipsoriasiche descritte in letteratura.

Nel secondo capitolo sono presentati i possibili sistemi di somministrazione della vitamina D₃ (*drug delivery systems*, DDS), con particolare attenzione alle silici mesostrutturate e alla descrizione della silice SBA-15. Di quest'ultima vengono elencate le proprietà principali e i meccanismi che portano

al suo ottenimento. Inoltre, vengono analizzate le principali tecniche di incorporazione di vitamina D₃ e soprattutto la tecnica d'impregnazione mediante scCO₂.

Il terzo capitolo tratta dei materiali e dei metodi di adsorbimento e caratterizzazione utilizzati durante il lavoro sperimentale di questa tesi.

Nel quarto e quinto capitolo vengono mostrati i risultati ottenuti dalle tecniche di caratterizzazione sui campioni prima e dopo l'adsorbimento di vitamina D₃. I campioni sono stati caratterizzati tramite diffrazione a raggi X, analisi termogravimetrica, spettroscopia infrarossa, analisi di adsorbimento di azoto e spettroscopia UV/Vis.

Il sesto capitolo si concentra sull'estrazione di vitamina D₃ dai campioni caricati in etanolo.

Infine, nel settimo capitolo vengono commentati i risultati ottenuti e i possibili sviluppi futuri.



Capitolo 1 – Vitamina D

1.1 Introduzione

L'ultimo decennio ha visto un rinnovato interesse per la “vitamina del sole”, la vitamina D, perché nuovi dati suggeriscono che i suoi benefici si estendono oltre ad un semplice mantenimento delle ossa sane. Ad accompagnare questo rinnovato interesse è stata una proliferazione di studi pubblicati relativi agli effetti della vitamina D in molte condizioni cliniche variabili [1].

La strada verso la scoperta della vitamina D è iniziata con il riconoscimento della malattia ossea infantile del rachitismo. Il primo trattato medico formale sul rachitismo fu pubblicato da Francis Glisson nel 1650 [1], quando fu identificato come una nuova malattia più frequente nei ricchi che nei poveri. Durante la rivoluzione industriale del 1800, la prevalenza del rachitismo è aumentata notevolmente, passando dal 40% al 60% tra i bambini nelle aree urbane affollate e inquinate [1]. Nel 1822 Sniadecki fu il primo a riconoscere e segnalare l'associazione del rachitismo con la mancanza di esposizione alla luce solare [1]. Verso la metà del 1800, l'olio di fegato di merluzzo era stato stabilito come un trattamento efficace per il rachitismo. Il lavoro di Mellanby e McCollum ha portato alla scoperta della vitamina D come agente nell'olio di fegato di merluzzo che aveva proprietà antirachitiche [1]. Questa scoperta alla fine portò alla fortificazione del latte e di altri alimenti con vitamina D negli anni '30 e, di conseguenza, il rachitismo scomparve quasi del tutto in Nord America e in Europa [1].

1.2 Struttura chimica

La vitamina D si presenta in due diverse forme: vitamina D₂ e vitamina D₃, chiamate anche ergocalciferolo e colecalciferolo, rispettivamente. La vitamina D₃ è prodotta nella pelle in risposta alle radiazioni ultraviolette B della luce solare o può essere ottenuta dalla dieta (cioè da fonti animali come pesce grasso di acque profonde, tuorli d'uovo o fegato) o da integratori [1]. Pochi alimenti hanno naturalmente un contenuto sostanziale di vitamina D, per cui tale vitamina nella dieta si ottiene principalmente attraverso cibi o integratori fortificati. La vitamina D₂, che si trova in alcune piante commestibili ed è prodotta commercialmente dall'irradiazione del lievito, viene utilizzata per fortificazione e integrazione di alimenti. Sia la vitamina D₂ che la vitamina D₃ possono essere utilizzate per l'integrazione. Sebbene quindi la vitamina D presenti due vitameri,

soltanto uno di essi, la vitamina D₃, risulta essere di particolare interesse biologico [2].

Le proprietà chimico-fisiche della vitamina D₃ sono da ricercarsi nella particolare struttura della sua molecola (figura 1.1). Il nome chimico della molecola definito dalla IUPAC è: (1S,3Z)-3-{2-[(1R,3aS,4E,7aR)-7a-methyl-1-[(2R)-6-methylheptan-2-yl]-octahydro-1H-inden-4-ylidene] ethylidene}-4-methylidenecyclohexan-1-ol ma è nota più semplicemente come colecalciferolo. La sua formula chimica è C₂₇H₄₄O, ha una massa molare di 384,6 g/mol e una temperatura di fusione di 83 °C.

La vitamina D₃ è altamente idrofobica e sensibile a diversi fattori chimici e fisici, quali umidità, calore e luce, che possono indurre isomerizzazione o ossidazione della sua struttura e influire negativamente sulla sua bioattività [2].

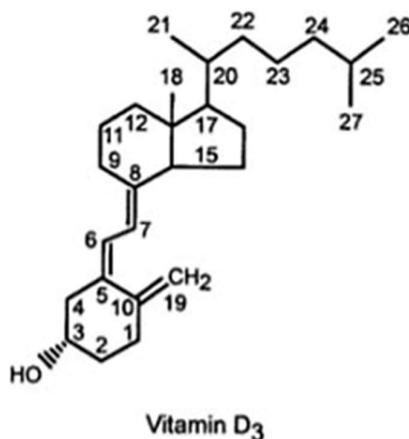


Figura 1.1: Struttura della vitamina D₃ o colecalciferolo [3].

La vitamina D₃ viene metabolizzata nel fegato e nel rene per produrre l'ormone calcitriolo; quest'ultimo migra poi verso una miriade di tessuti bersaglio agendo attraverso un recettore nucleare per svolgere le sue numerose funzioni, tra cui l'assorbimento del calcio, l'assorbimento del fosfato nell'intestino, la mobilizzazione del calcio nelle ossa e il riassorbimento del calcio nel rene [4].

Nel fegato la vitamina subisce una prima idrossilazione in corrispondenza del C-25 per formare la 25-idrossi-D₃ (25(OH)D₃), denominata anche calcidiolo. La 25(OH)D₃ lascia il fegato legata ad una specifica proteina (la "vitamin D binding protein" [4]) e il complesso viene captato dal rene per endocitosi. Nel rene il calcidiolo viene idrossilato in posizione 1 per formare la 1,25-diidrossi-D₃, cioè la forma biologicamente attiva della vitamina D₃ (figura 1.2) [4].

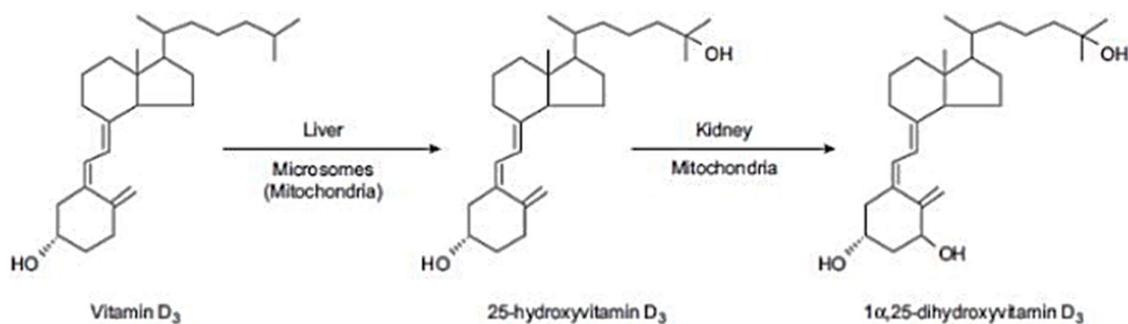


Figura 1.2: Trasformazione della vitamina D₃ in 1,25-diidrossi-D₃ [3].

Dal punto di vista chimico la vitamina D₃ può essere considerata un acido debole di Brønsted con pK_a pari a 18.38 [2]. Gli anelli rendono la molecola della vitamina D₃ idrofobica (LogP≈9) con una solubilità in acqua (a pH neutro o acido) pressoché nulla, mentre in soluzioni acquose basiche la solubilità della molecola aumenta [5].

1.3 Metabolismo e funzioni

Le due forme di vitamina D subiscono lo stesso metabolismo (figura 1.3). Inizialmente vengono convertite in 25-idrossivitamina (25(OH)D) nel fegato e il livello sierico di 25(OH)D viene misurato per determinare l'adeguatezza dello stato della vitamina D. Nel rene, 25(OH)D è idrossilata a 1,25-diidrossivitaminaD (1,25(OH)₂D), che è l'unica forma biologicamente attiva di vitamina D. Agendo principalmente sul duodeno, 1,25(OH)₂D incrementa l'assorbimento del calcio. Agisce anche sulle cellule ossee, sia osteoblasti che osteoclasti, per mobilitare il calcio [1]. Le caratteristiche dell'1,25(OH)₂D sono quelle di un ormone e di conseguenza la vitamina D è un proormone piuttosto che una vera vitamina. La struttura dell'1,25(OH)₂D, infatti, è simile a quella di altri ormoni steroidei. Finché l'esposizione alla luce solare è adeguata, l'organismo può produrre 1,25(OH)₂D senza necessità di ingestione nella dieta. Come altri ormoni, l'1,25(OH)₂D circola a concentrazioni di picogrammi che sono 1000 volte inferiori a quelle del precursore 25(OH)D [1]. Sulla base della necessità di un maggiore assorbimento del calcio, la sintesi di 1,25(OH)₂D è strettamente regolata e stimolata principalmente dall'ormone paratiroideo (PTH) sierico, nonché da bassi livelli sierici di calcio o fosforo, ed è inibita dall'FGF23 circolante prodotto da osteociti. Sebbene prodotto nel rene, l'1,25(OH)₂D agisce a distanza sulle cellule intestinali per aumentare l'assorbimento del calcio o nell'osso per stimolare la differenziazione e l'attivazione di osteoblasti e osteoclasti [1].

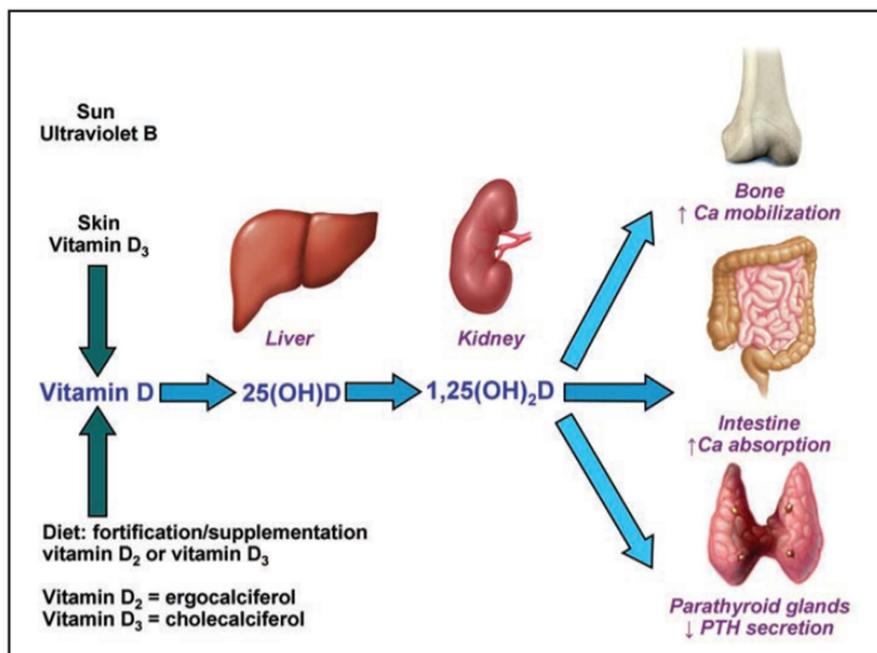


Figura 1.3: Metabolismo della vitamina D [1].



1.4 Tossicità

Un'assunzione eccessiva di vitamina D₃ (che viene smaltita molto lentamente) risulta tossica. Il limite tollerabile di assunzione è stato fissato a 50 µg/giorno per l'adulto [6]. L'intossicazione da vitamina D porta ad un elevato livello ematico di 25-idrossivitaminaD₃, questo metabolita può competere con il calcitriolo per i recettori nell'intestino e nelle ossa e può indurre effetti generalmente attribuiti al calcitriolo [3]. Pertanto, si ritiene che la 25-idrossivitaminaD₃ sia il fattore critico nell'intossicazione da vitamina D. L'aumento di livelli sierici di calcio nei casi più gravi porta a calcificazione anomala di tessuti molli (rene, cuore) [4]. La disfunzione renale diventa quindi il principale contributo alla perdita dell'omeostasi del calcio e alla conseguente ipercalcemia durante l'intossicazione da vitamina D. Perdita di appetito, disturbi gastrointestinali, dolore alla testa e alle articolazioni e debolezza muscolare sono sintomi clinici tipici. La morte per ipervitaminosi D è generalmente causata da insufficienza renale [7]. Quantità tossiche non vengono raggiunte con una dieta normale, ma sono conseguenza di un eccessivo uso di supplementi vitaminici [4].

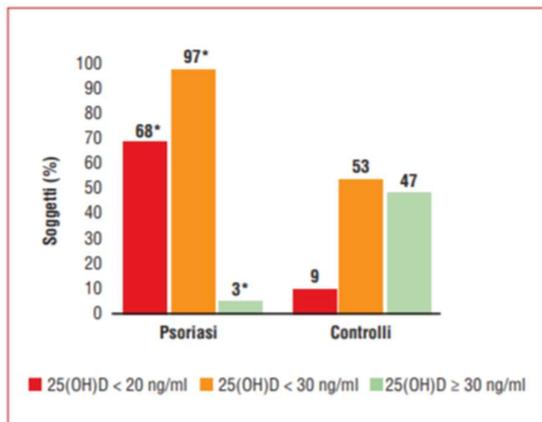
1.5 Psoriasi e vitamina D

La psoriasi è una malattia infiammatoria, immuno-mediata della pelle, a decorso cronico-recidivante. Nella forma più comune, psoriasi cronica a placche, la malattia è caratterizzata da placche eritematosa-desquamative ben demarcate, localizzate frequentemente sulle superfici estensorie del corpo e sul cuoio capelluto [8]. Le lesioni possono associarsi a prurito, bruciore e occasionalmente sanguinare. Alterazioni distrofiche delle unghie si osservano in più di un terzo dei pazienti [8]. L'attività della malattia presenta ampie variazioni tra individui e, nello stesso individuo, in differenti periodi di tempo. Le opzioni terapeutiche sono oggi classificate in tre grandi gruppi: trattamenti topici, trattamenti con luce ultravioletta e trattamenti sistemici [8].

La scelta del trattamento dipende da vari fattori e, in particolare, dalla gravità della psoriasi cutanea e dalla presenza o meno di artrite. La psoriasi lieve può essere trattata solo con farmaci topici, quella moderata grave richiede l'impiego di trattamenti con luce ultravioletta o farmaci sistemici, qualora vi sia artrite, il trattamento d'elezione è quello sistemico. I trattamenti topici comprendono principalmente gli steroidi topici potenti o molto potenti e, in particolare, è stata dimostrata l'efficacia dei derivati della vitamina D nel trattamento di questa patologia. La letteratura scientifica degli ultimi anni ha posto particolare attenzione non solo alle nuove strategie terapeutiche ma anche allo stato vitaminico D dei soggetti psoriasici. In particolare, un recente studio ha mostrato uno stato carenziale di vitamina D [25(OH)D < 20 ng/ml] nell'84% dei soggetti psoriasici reclutati [9]. Uno studio italiano ha invece evidenziato come la quasi totalità (97%) dei soggetti psoriasici presentasse livelli sierici di vitamina D insufficienti (inferiori a 30 ng/ml), mentre il 68% risultasse carente (livelli sierici inferiori a 20 ng/ml), in maniera statisticamente significativa rispetto ai controlli (figura 1.4) [10][11].

Ciò dimostra come, nel caso specifico di patologie dermatologiche estese, la carenza di vitamina D caratterizzi una percentuale piuttosto elevata di soggetti affetti. Il significato clinico dell'ipovitaminosi D in questa patologia e l'importanza della supplementazione sono ancora oggetto di studio. Per concludere, il dosaggio della 25(OH)D rappresenta oggi il metodo più

appropriato e raccomandabile per stimare lo stato di replezione vitaminica D durante la cura nei soggetti psoriasici, pertanto ove possibile è opportuno evitare condizioni di carenza attualmente prevenibili e trattabili con vitamina D₃ [8].



nmol/l	ng/ml	Interpretazione
< 25	< 10	Grave carenza
25-50	10-20	Carenza
50-75	20-30	Insufficienza
75-125	30-50	Range ideale

Figura 1.4: Stato vitaminico D nei soggetti con psoriasi e controlli. * $p < 0,05$ vs controlli (adattato da Ricceri et al., 2013) [7].

In conclusione, l'integrazione di vitamina D₃ è essenziale nei casi di forte carenza, ma anche la somministrazione deve essere controllata in modo da non provocare effetti tossici. Per questo motivo i sistemi per rilascio controllato di farmaci (*drug delivery systems*, DDS) sono molto interessanti per questo tipo di applicazione.



Capitolo 2 – Silici mesoporose come carrier di vitamina D₃

2.1 Sistemi per il rilascio di farmaco (DDS)

Un sistema per il rilascio di farmaco, o *drug delivery system* (DDS), è definito come una formulazione o dispositivo che consente l'introduzione di una sostanza terapeutica nel corpo umano o animale, con l'obiettivo di migliorarne l'efficacia e la sicurezza controllando la velocità, il tempo e il luogo del rilascio.

Lo sviluppo di qualsiasi DDS richiede diversi anni di studio dati gli innumerevoli fattori da considerare. Innanzitutto, è necessario conoscere il tipo di principio attivo che si vuole trasportare all'interno dell'organismo, sia dal punto di vista della formulazione sia gli effetti terapeutici e collaterali. Quindi, occorre comprendere il metodo di somministrazione ottimale (orale, nasale, topico...) e il carrier più adatto per il trasporto, nonché il meccanismo di incorporazione e di rilascio del farmaco e la cinetica di rilascio [12].

Uno dei parametri più importanti da studiare per la progettazione di un dispositivo per il rilascio di farmaco è la farmacocinetica. Un DDS ottimale deve garantire che il principio attivo sia disponibile nel sito di azione mediante una corretta tempistica della somministrazione e una cinetica controllata del rilascio. Inoltre, la concentrazione del farmaco nel sito deve essere compresa in un intervallo, definito intervallo terapeutico, che va dalla concentrazione minima efficace alla concentrazione minima tossica (figura 2.1). Pertanto, il rilascio controllato del farmaco regola la velocità, la localizzazione e mira a ottimizzare l'efficienza del farmaco riducendo contemporaneamente gli effetti collaterali negativi [12].

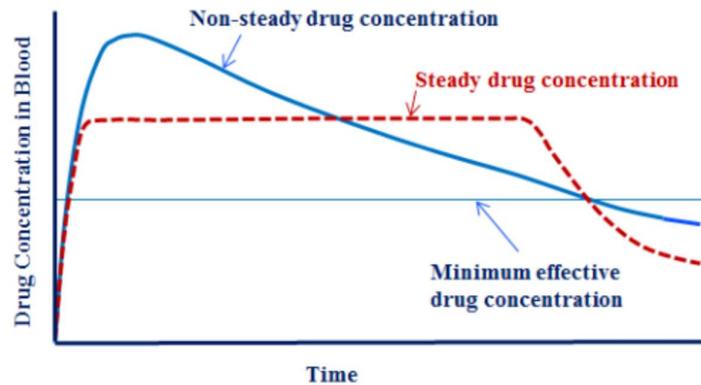


Figura 2.1: Profili per un rilascio costante e non del farmaco mediante sistemi di drug delivery [12].

Il successo di questo approccio dipende dalla capacità di costruire un vettore biocompatibile che consenta un elevato carico di molecole di farmaco, senza alcun rilascio prematuro del carico prima di raggiungere la destinazione. Di seguito, sono riassunte le caratteristiche ideali che un materiale dovrebbe avere per poter fungere da DDS efficiente:

- il materiale di supporto deve essere biocompatibile;
- alto carico delle molecole di farmaco desiderate;
- zero rilascio prematuro, ovvero nessuna fuoriuscita, di molecole di farmaco;
- specificità del tipo di cellula/tessuto e capacità di direzionamento del sito;
- rilascio controllato di molecole con una cinetica adeguata ad ottenere una concentrazione locale efficace [13].

I DDS commerciali, comunemente basati sulla tecnologia dei polimeri, sono sistemi di successo che coprono diversi campi, come i serbatoi di farmaci impiantabili, orali, transdermici e iniettabili. Questi sistemi servono un vasto numero di applicazioni mediche e farmaceutiche, come in ortopedia e odontoiatria. Tuttavia, uno dei problemi principali e più specifici dei DDS attualmente è la perdita di attività di diversi farmaci prima di raggiungere il tessuto bersaglio a seguito della degradazione prematura dell'agente attivo [14]. In questo contesto, i sistemi che rispondono allo stimolo e che mostrano "rilascio prematuro zero" potrebbero svolgere un ruolo chiave nel superare le attuali limitazioni dei DDS. La progettazione sofisticata e razionale di sistemi che rispondono agli stimoli spesso richiede porosità ben strutturate e superficie specifica elevata per supportare le specie chimiche (spesso polimeri) che devono controllare il rilascio del farmaco. I DDS a base di silice mesoporosa possono soddisfare questa condizione [14].

2.2 Sistemi per il rilascio di vitamina D₃

Il ruolo che svolge la vitamina D₃ nel corpo umano ha suscitato l'interesse di molti gruppi di ricerca che hanno studiato possibili carriers per questa molecola. In particolare, i carriers a base polimerica hanno permesso di oltrepassare le limitazioni dovute all'idrofobicità e alla sensibilità ai fattori esterni (luce, calore, umidità) della vitamina D₃.

Ignjatović et al. [15] hanno presentato uno studio sugli effetti della somministrazione locale di vitamina D₃ utilizzando trasportatori nanoparticellari composti da idrossiapatite (HAp) e poli (D,L-



lattico-co-glicolico) (PLGA). Queste polveri multifunzionali nanoparticellari sono state preparate per ottenere un rilascio localizzato rapido e sostenuto di vitamina D₃ e un effetto secondario osteoconduttivo [15]. I risultati hanno evidenziato una biocompatibilità soddisfacente dei sistemi particolati composti da HAp / D₃ / PLGA, quando incubati a contatto con cellule osteoblastiche *in vitro*. Inoltre, livelli più elevati di angiogenesi avanzata, vascolarizzazione, osteogenesi e differenziazione della struttura ossea sono stati raggiunti con l'implementazione dei sistemi HAp / D₃ / PLGA [15].

Laloz et al. [16] hanno studiato nanoparticelle (NP) a base di acido polilattico (PLA), senza e con rivestimento in polietilen glicole (PEG) o in poli (2-metacriloilossietilfosforilcolina) (PMPC) mediante nanoprecipitazione flash. In queste nanoparticelle è stata caricata vitamina D₃, tramite tecnica d'impregnazione da soluzione di acetone, e successivamente valutata l'influenza della composizione superficiale su diversi aspetti del rilascio cutaneo: stabilità chimica, rilascio e penetrazione cutanea. La stabilità della vitamina D₃ in mezzo acquoso è stata migliorata dall'incapsulamento polimerico con un prezioso effetto di rivestimento idrofilo [16], che non ha alterato la cinetica di rilascio del farmaco *in vitro*. Per quanto riguarda la penetrazione della vitamina D₃ all'interno di pelle sana ed integra, tutte le NP solide hanno mostrato la stessa efficienza nel trasportare la molecola all'interno della pelle, indipendentemente dalle proprietà superficiali delle NP, evidenziando il ruolo non selettivo della barriera dello strato corneo [16]. Tuttavia, le proprietà superficiali delle NP che trasportano il farmaco hanno chiaramente influenzato la penetrazione della vitamina D₃ quando lo strato corneo è stato rimosso per assomigliare alla pelle malata, sottolineando l'importanza di considerare l'influenza della patologia cutanea quando si progettano formulazioni topiche [16].

Vora et al. [17] hanno analizzato nanosospensioni di polivinil alcol (PVA) e polivinil pirrolidone (PVP), caricate entrambe con vitamina D₃ e successivamente processate per ottenere microaghi per incorporazione transdermica (*dissolving microneedles*, DMNs). Lo studio ha dimostrato risultati eccellenti per l'incorporazione della vitamina D₃, suggerendo che i sistemi DMNs contenenti nanosospensioni polimeriche potrebbero essere una strategia promettente per la somministrazione transdermica di farmaci idrofobici [17].

Ozturk et al. [18] hanno utilizzato delle nanoemulsioni che comprendono la vitamina D₃, un tensioattivo naturale e una varietà di olii portanti, verificando che la bioaccessibilità della vitamina varia in modo significativo nei diversi olii a causa di variazioni della solubilizzazione e della cinetica di rilascio da goccioline lipidiche. Infatti, le nanoemulsioni basate su trigliceridi a catena lunga (LCT), come olio di mais o olio di pesce, sono risultate particolarmente efficaci per aumentare la bioaccessibilità vitaminica e quindi migliorare l'efficacia di cibi e bevande funzionali arricchiti con vitamine [18].

Hanham et al. [19] hanno studiato micelle di caseine naturali nanostrutturate di dimensioni pari a circa 90 nm come nanoveicoli per la vitamina D₃. Le micelle di caseina prodotte sono state elaborate in modo da migliorare la farmacocinetica del principio attivo. La perdita di vitamina D₃ è risultata minima, con una buona stabilità termica e una migliore biodisponibilità [19].

In letteratura sono pochi gli esempi di incorporazione di vitamina D₃ in vettori alternativi ai polimeri, come la silice mesoporosa. Sumathra et al. [20] hanno sintetizzato nanocompositi di cellulosa (C), funzionalizzata con idrossiapatite (HAp), con differenti concentrazioni di nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN). Le MSN permettono di regolare le funzioni del fattore



di crescita endoteliale vascolare, che è coinvolto nella formazione dei vasi sanguigni e dell'osso [20]. Piccoli livelli di sostituzione dei silicati in HAp hanno dimostrato di avere effetti significativi sulla stabilità termica, solubilità e risposta cellulare nella progressione *in vitro* [20]. I nanocompositi sono stati successivamente caricati con vitamina D₃, la quale è stata disciolta preventivamente in acetone. La soluzione risultante è stata miscelata con i nanocompositi in un miscelatore magnetico. I nanocompositi VD₃ / C / HAp / MSN hanno mostrato una maggiore bioattività rispetto all'HAp puro e gli studi *in vitro* su osteoblasti (MG63) hanno rivelato che i materiali sono in grado di stimolare l'attività proliferativa e l'adesione cellulare e hanno effetti osteoinduttivi [20].

In conclusione, viste le potenzialità delle silici mesoporose come carriers innovativi di farmaci, questo lavoro di tesi è incentrato sullo studio di alcune silici mesoporose come possibili sistemi per la somministrazione di vitamina D₃. Inoltre, è da annoverare l'interessante effetto aggiuntivo in ambito topico del rilascio di silicio, il quale permetterebbe di incrementare l'attività enzimatica necessaria alla formazione di nuovo collagene [21], effetto altamente desiderato nel caso di trattamento della psoriasi.

2.3 Silici mesoporose

La ricerca sui materiali mesoporosi, cioè con diametro nominale delle porosità tra 2-50 nm, per scopi biomedici ha registrato un notevole aumento negli ultimi anni. Dal 2001, quando la silice MCM-41 è stata proposta per la prima volta come sistema di somministrazione di farmaci, i materiali a base di silice, come SBA-15 o MCM-48, e alcune strutture metallo-organiche sono stati studiati come trasportatori di farmaci e sistemi a rilascio controllato [13]. I materiali mesoporosi possono essere destinati sia a sistemi di somministrazione sistemica che a dispositivi di rilascio locale impiantabili. Quest'ultima applicazione offre possibilità molto promettenti nel campo della riparazione dei tessuti ossei a causa dell'ottimo comportamento di questi materiali come bioceramici [13].

Tra i materiali mesoporosi, quindi, spiccano per le loro proprietà le silici mesoporose, utilizzate anche in questo lavoro di tesi come carrier per la vitamina D₃. Le silici mesoporose sono studiate e utilizzate, da molti anni, per diversi impieghi. Inizialmente il loro studio è stato incentrato sulla funzionalizzazione e l'utilizzo per applicazioni, quali separazione di fluidi [22], catalisi e sensoristica [23].

I metodi di sintesi convenzionali per la preparazione di materiali di silice mesoporosa danno origine a particelle amorfe con diverse forme e dimensioni. La polidispersione e la natura amorfa delle silici mesoporose rappresentano una sfida importante nel controllo delle proprietà di trasporto di massa a livello nanometrico, che è di fondamentale importanza per la somministrazione di farmaci e il rilascio controllato nei sistemi biologici [13].

Le seguenti proprietà delle *silici a mesoporosità ordinata* (OMS) hanno attirato molta attenzione da parte del mondo scientifico per varie applicazioni di distribuzione a rilascio controllato:

- Elevata area superficiale specifica, la quale implica un alto potenziale di adsorbimento del farmaco. È possibile ottenere silici con aree maggiori di 1000 m²/g.
- Dimensione dei pori uniforme e regolabile. La distribuzione delle dimensioni dei pori delle OMS è molto stretta e il diametro dei pori può essere regolato tra 2 e 10 nm.



- Alto volume dei pori ($> 0,9 \text{ cm}^3/\text{g}$) che consente carichi elevati di molecole di farmaco.
- Agendo direttamente sul processo di sintesi, è possibile controllare la morfologia delle particelle, variandone sia le dimensioni che la funzionalizzazione.
- Struttura stabile e rigida. Rispetto ad altri trasportatori di farmaci a base di polimeri, le MSN sono più resistenti al calore, al pH, allo stress meccanico e alle degradazioni indotte dall'idrolisi. Questa caratteristica è dovuta ai forti legami Si-O che inibiscono la necessità di qualsiasi altro elemento stabilizzante esterno.
- Superficie contenente un'alta quantità di silanoli (utili per creare legami con il farmaco o per eventuali funzionalizzazioni).
- Tossicità trascurabile a contatto con i sistemi cellulari.

Di seguito verranno brevemente descritte le proprietà strutturali delle silici mesoporose che influiscono maggiormente sulle loro performance:

Dimensione delle particelle: Uno dei parametri più importanti che devono essere tenuti in considerazione quando si parla delle applicazioni in campo biomedicale è la dimensione delle particelle. Infatti, è ampiamente dimostrata la correlazione tra questo parametro e l'efficienza dell'assorbimento cellulare e la possibilità di penetrare attraverso membrane/tessuti [24].

La dimensione delle MSN può variare da qualche decina di nanometro a qualche micron, in base alle condizioni di sintesi. Ad esempio, influenzando le cinetiche di reazione dell'idrolisi e della condensazione si possono ottenere particelle di dimensioni differenti [24].

Questo fattore ha un impatto importante sulla biodistribuzione del materiale, come le interazioni delle particelle con il sistema reticoloendoteliale (RES) e il tempo di circolazione delle particelle nel corpo umano. Nanoparticelle mesoporose più piccole consentono una maggiore endocitosi da parte delle cellule, tuttavia, particelle con un diametro inferiore a 50 nm possono anche essere facilmente esocitate dalle cellule mirate [24]. Inoltre, è stata evidenziata l'influenza della dimensione delle particelle sulla biocompatibilità delle stesse. Ariano et al. [25] hanno confrontato l'effetto di due tipologie di nanoparticelle di silice (NPs), con diametro di 50 e 200 nm, sulle cellule neuronali GT1-7. Per identificare le risposte cellulari, sono stati analizzati i cambiamenti della concentrazione del calcio intracellulare indotti dalla somministrazione delle due nanoparticelle di silice. I risultati hanno dimostrato che in base alla taglia delle NPs si possono indurre effetti tossici sulle cellule neuronali. In particolare, le NPs con diametro pari a 50 nm possono stimolare i processi apoptotici in modo dose-dipendente, mentre la silice a 200 nm non mostra alcun effetto tossico anche a concentrazioni relativamente elevate.

Area superficiale: La fase di drug-loading è una fase cruciale nella preparazione del DDS ed è basata principalmente sull'adsorbimento di molecole sulla superficie della silice. La superficie è il luogo in cui avvengono le interazioni tra il carrier e la molecola, quindi ha un ruolo fondamentale nello stabilire il quantitativo di principio attivo che il materiale mesoporoso può riuscire ad adsorbire [26]. È conveniente avere a disposizione un'area superficiale elevata poiché permette un caricamento maggiore dell'agente terapeutico che poi verrà rilasciato nel corpo umano. Tuttavia, occorre sempre considerare i possibili effetti di tossicità del principio attivo.



Taglia dei pori: La dimensione dei pori determina la dimensione massima delle molecole che possono essere adsorbite, quindi se un farmaco specifico può penetrare all'interno dei mesopori o no. Generalmente, un diametro dei pori leggermente più grande del diametro delle molecole di farmaco è sufficiente per favorirne l'assorbimento [14].

La taglia dei mesopori può essere regolata da 2 nm a decine di nanometri variando il tipo di tensioattivo usato durante la sintesi. La scelta adeguata della lunghezza della catena alchilica del tensioattivo utilizzato permette di diminuire o aumentare la dimensione dei pori, costruendo un carrier "su misura" per un determinata molecola [14]. Tuttavia, per quanto riguarda la cinetica di rilascio occorre considerare anche la connettività dei pori e l'eventuale modalità di degradazione della matrice.

Volume poroso: La superficie dei mesopori è responsabile dell'interazione con in farmaco caricato; infatti, durante il processo di *drug loading* la fase iniziale consiste in un fenomeno di adsorbimento che coinvolge unicamente la superficie. Successivamente, l'aggiunta di ulteriore farmaco può portare al riempimento dei pori con l'instaurarsi di interazioni deboli farmaco-farmaco. A questo punto, il volume dei pori diventa un parametro fondamentale per determinare il quantitativo massimo di farmaco che il materiale può incorporare [14].

Poiché la dimensione dei pori nelle silici mesoporose è solitamente inferiore a 15 nm e la superficie specifica è di circa 1000 m²/g, i volumi dei pori sono generalmente nell'intorno di 2,0 cm³/g [14]. Questi elevati volumi porosi portano le OMS ad avere una maggiore capacità di carico del farmaco rispetto ad altri carrier [23]. Tuttavia, per migliorare ulteriormente il caricamento delle OMS sono state sintetizzate recentemente delle nanoparticelle di silice mesoporosa cave (HMSN), studiate nella terapia del cancro e nell'imaging. Presentano al loro interno una grande cavità in grado di trattenere una quantità di farmaco maggiore rispetto alle nanoparticelle di silice convenzionali, caratteristica che è stata dimostrata utilizzando l'ibuprofene come farmaco modello [27].

Funzionalizzazione dei mesopori: Un ruolo chiave nello sviluppo di materiali mesoporosi di silice come drug delivery system è svolto dalla modifica o funzionalizzazione della superficie attraverso gruppi funzionali.

Le OMS possiedono due superfici funzionali, la superficie interna dei pori e la superficie particellare esterna. Questa caratteristica consente la funzionalizzazione selettiva delle superfici interne e/o esterne [13].

Le molecole di silice sulla superficie del materiale possono essere idratate facilmente formando dei silanoli (Si – OH), si ottiene, quindi, una superficie caratterizzata da un'elevata presenza di gruppi funzionali che vengono sfruttati per aumentare le interazioni con le molecole di farmaco. Infatti, i gruppi silanoli possono essere utilizzati per graffiare il farmaco sul supporto o per funzionalizzare la superficie con gruppi chimici in grado di legarsi alle molecole dell'agente terapeutico attraverso legami ionici o esterei.

Questa modifica offre numerose possibilità per controllare l'assorbimento e il rilascio dei farmaci. A tal proposito, un aspetto molto importante da tenere in considerazione è che la funzionalizzazione comporta una diminuzione del diametro e del volume dei pori, con conseguente minor carico di molecole di farmaco [14].

2.4 Sintesi della SBA-15

I materiali di base utilizzati in questo lavoro di tesi come veicolo della molecola biologicamente attiva sono due silici mesoporose della tipologia SBA-15 (Santa Barbara Amorphous) (figura 2.2) con diametro medio nominale dei pori rispettivamente pari a 4 nm e 8 nm. Questo materiale non solo è caratterizzato da pori uniformi esagonali con dimensioni maggiori (4-30 nm) rispetto ad altre silici mesoporose, ma anche da ottime proprietà di resistenza termica, meccanica e chimica, e questo lo rende una scelta preferibile anche per l'applicazione come catalizzatore [28].

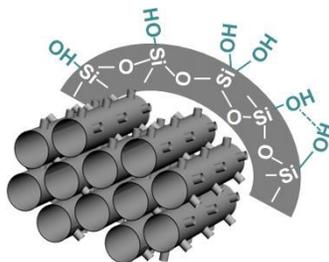


Figura 2.2: Struttura porosa della silice SBA-15 con silanoli in superficie [29].

La silice SBA-15 è sintetizzabile tramite la procedura originale riportata da Zhao (figura 2.3) [30]. Essa consiste nell'utilizzo del copolimero a blocchi Pluronic P123 ($\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$, $M_{av}=5800$) come agente templante, tetraetilortosilicato (TEOS) come precursore della silice e una soluzione 2 M di HCl, in rapporto molare $\text{TEOS} : \text{HCl} : \text{H}_2\text{O} : \text{Pluronic} = 1 : 5.5 : 193 : 0.017$. Il polimero Pluronic P123 viene disciolto in acqua distillata e una soluzione 2 M di HCl, mantenendo la soluzione per 16 ore sotto vigorosa agitazione all'interno di una beuta posta all'interno di un bagno di glicol etilenico ad una temperatura controllata di 36 °C. Dopo tale fase, durante la quale il templante forma una soluzione micellare stabile trasparente, viene aggiunto goccia a goccia il TEOS [31].

Nella fase finale dell'aggiunta del TEOS la soluzione si trasforma in una sospensione lattiginosa di colore bianco, che viene lasciata 24 ore in agitazione a 36 °C per permettere l'idrolisi e la condensazione del TEOS. La sospensione ottenuta è versata in una autoclave, chiusa ermeticamente e posta in stufa alla temperatura di 100 °C per 24 ore. Dopo la filtrazione sottovuoto e il lavaggio del prodotto solido con acqua distillata, il solido ottenuto, di colore bianco, è essiccato in stufa per una notte ad una temperatura di circa 35 °C. La rimozione completa dell'agente templante è effettuata mediante calcinazione in aria, aumentando lentamente la temperatura con una velocità di salita di 5 °C/min sino alla temperatura di 500 °C, mantenuta per 6 ore [31]. È così ottenuta una polvere finissima di SBA-15, che, nell'ambito del presente lavoro, costituisce il supporto per la fase attiva di vitamina D₃.

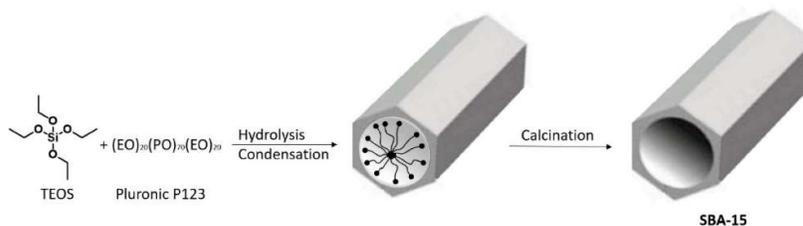


Figura 2.3: Processo di sintesi della silice SBA-15 [27].

2.5 Tecniche di impregnazione

La caratteristica unica delle silici a mesoporosità ordinata che le rende dei vettori ampiamente studiati per la somministrazione di farmaci è la loro elevata capacità di carico, dovuta al grande volume dei pori e alla chimica della superficie.

Negli ultimi decenni sono stati fatti diversi studi per ottimizzare varie tecniche che garantiscano impregnazioni ottimali dei principi attivi su matrici porose, in modo da ottenere dei sistemi ideali per applicazioni farmaceutiche e, al tempo stesso, economici e atossici.

L'industria farmaceutica deve affrontare sfide crescenti nella biodisponibilità delle formulazioni dei farmaci a causa della loro scarsa solubilità. Per superare questi limiti e aumentare il quantitativo dell'agente terapeutico occorre considerare le proprietà termodinamiche delle sostanze. Quando un principio attivo viene intrappolato in uno spazio ristretto, a livello del nanometro, passa dallo stato solido cristallino ad amorfo e questa modifica è definita fenomeno di amorfizzazione [32]. Nonostante lo stato amorfo sia considerato disordinato e metastabile, negli ultimi tempi ha suscitato grande interesse nell'industria farmaceutica, in quanto può essere associato a un livello metastabile che può essere sfruttato per massimizzare la concentrazione del principio attivo e migliorarne la solubilità [33].

In seguito, vengono descritti alcuni dei metodi che sono stati sviluppati per caricare i farmaci, ed in particolar modo la vitamina D₃, sui supporti di silice mesoporosa. I più classici e i più studiati sono vari processi con solventi organici e processi di fusione, mentre tra le tecniche più innovative troviamo l'uso di fluidi supercritici come la CO₂ supercritica, utilizzata in questo lavoro di tesi.

2.4.1 Adsorbimento da soluzione

L'adsorbimento da soluzione è il processo di caricamento del farmaco più utilizzato. Questo metodo consiste nel disciogliere il farmaco in un solvente adatto e immergere il materiale poroso nell'intera soluzione sotto agitazione in modo che le molecole del farmaco vengano adsorbite sulle superficie dei pori. Il processo avviene a temperatura ambiente e può durare da una a diverse ore, dopodiché viene eseguita una filtrazione o centrifugazione per recuperare le particelle cariche di farmaco. Successivamente, le particelle vengono essiccate andando a rimuovere il solvente [32].

Il caricamento da soluzione presenta dei vantaggi importanti, tra cui il poter essere applicato sia per farmaci idrofili che idrofobici (caso della vitamina D₃), è una tecnica semplice da eseguire e fornisce dei risultati riproducibili, inoltre, non richiede una temperatura elevata, rendendola adatta per il caricamento di molecole termosensibili. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, l'immersione in solvente è un processo che richiede molto tempo ed è a bassa resa. Per ottenere dei carichi elevati,



è necessario utilizzare concentrazioni relativamente elevate di soluzioni di carico, ma questo può essere complicato soprattutto con farmaci scarsamente solubili. D'altra parte, se la concentrazione è troppo alta, le molecole del farmaco si adsorbono sulla superficie esterna e possono bloccare i mesopori, riducendo la superficie disponibile per il caricamento del farmaco. Degli ulteriori svantaggi sono la difficoltà nel prevedere il grado di carico che verrà raggiunto e la grande frazione di farmaco sprecata durante la fase di filtrazione [34].

Jiang et al. [35] hanno disciolto vitamina D₃ in etanolo. Successivamente, la soluzione è stata incorporata in una proteina isolata di pisello (*Pea Protein Isolate*, PPI), pensata per soddisfare quel target di consumatori con allergie o intolleranze alimentari. In generale, utilizzare PPI modificate hanno mostrato una buona protezione della vitamina D₃ contro i raggi UV [35]. La stabilità delle nanostrutture proteiche dei piselli è stata confermata fino a 30 giorni. Pertanto, la PPI modificata può essere utilizzata come buon vettore naturale per la protezione e la somministrazione di principi attivi negli alimenti, tra cui la vitamina D₃ [35].

Dadkhodazade et al. [36] hanno preparato microcapsule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* caricate con vitamina D₃ utilizzando il metodo di adsorbimento da soluzione di etanolo. Inizialmente cellule di lievito sono state miscelate in acqua sotto agitazione magnetica; successivamente la soluzione di etanolo e vitamina D₃ è stata aggiunta alla sospensione di lievito. Le microcapsule caricate di vitamina D₃ sono state separate dal mezzo liquido mediante centrifugazione e seguite da lavaggio con acqua distillata per rimuovere i residui di vitamina non incapsulata. Infine, le microcapsule risultanti sono state congelate a -20 °C e, quindi, liofilizzate [36]. Lo studio ha evidenziato che aumentando il contenuto iniziale di vitamina nella formulazione, l'efficienza di incapsulamento diminuisce, mentre la dimensione media delle particelle aumenta. La morfologia della superficie ha mostrato che le microcapsule caricate di vitamina avevano una struttura quasi sferica e le immagini TEM hanno confermato che la parete cellulare del lievito era intatta [36]. Inoltre, analisi di rilascio in condizioni gastrointestinali simulate hanno indicato che il tasso di rilascio era inferiore nel fluido gastrico simulato (*simulated gastric fluid*, SGF, fino al 35,75%) rispetto al fluido intestinale simulato (*simulated intestinal fluid*, SIF) in cui il colecalciferolo era completamente rilasciato (fino al 97,9%). Questi risultati dimostrano che le microcapsule di cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* potrebbero fungere da nuovo vettore per l'incapsulamento del colecalciferolo al fine di aumentarne la biodisponibilità per l'utilizzo nelle industrie alimentari e farmaceutiche. Inoltre, sono un esempio della possibilità di incorporare la vitamina D₃ tramite adsorbimento da soluzione.

2.4.2 Incipient Wetness Impregnation

Il metodo Incipient Wetness Impregnation (IWI) consiste nell'impregnare il carrier con un volume di solvente pari al volume dei pori della silice. L'intera soluzione, composta da un solvente e da un farmaco in esso disciolto, si adsorbe sulla superficie e viene attirata nei pori per azione capillare. Successivamente, si allontanano i componenti volatili della soluzione per semplice evaporazione del solvente o per essiccazione del supporto, depositando il farmaco sulla superficie [33].

Il vantaggio principale di questa tecnica, rispetto all'impregnazione da soluzione, è il minor spreco di farmaco, visto che non è prevista una fase di filtrazione. Inoltre, il farmaco viene caricato in modo efficiente ed è facile controllare il quantitativo di principio attivo incorporato nel carrier,



rendendo questo processo adatto per l'utilizzo di molecole più costose.

Questo metodo d'incorporazione, così come l'adsorbimento da soluzione, ha uno svantaggio intrinseco: l'impiego di solventi organici che risultano tossici per l'uomo e l'ambiente. Le successive fasi di rimozione del solvente aggiungono complessità di elaborazione e aumento dei costi di questi processi. Inoltre, è anche necessario considerare i problemi di sicurezza associati a queste fasi e adottare adeguate misure di protezione ambientale. Per evitare ciò, possono essere impiegate anche altre tecniche per caricare i farmaci sui supporti di silice mesoporosa.

Per quanto riguarda il caricamento di vitamina D₃ in silici mesoporose con questa tecnica, il lavoro di tesi magistrale di Giulia Palestrini [37] ha utilizzato le medesime silici del presente lavoro di tesi, permettendo di confrontare due tecniche d'impregnazione differenti. È stata preparata una soluzione di etanolo e vitamina D₃ di concentrazione pari a 30 mg/mL. Quindi sono stati pesati 400 mg di entrambi i campioni di silice e sono stati riposti in due piastre di Petri. Successivamente, tramite l'utilizzo di una pipetta, le silici sono state impregnate con 1 mL di soluzione, ossia un quantitativo di soluzione paragonabile al volume poroso della silice. Questa fase del processo è stata ripetuta per un numero di volte tale da raggiungere il valore in peso di farmaco desiderato (100 mg, corrispondenti ad un contenuto del 25% in massa). Dopo ogni impregnazione, il solvente è stato fatto evaporare a temperatura ambiente. Dall'analisi termogravimetrica è risultato un elevato grado di incorporazione del principio attivo, infatti il contenuto in massa del farmaco è pari al 24,8% per il campione con pori nominali di 8 nm e 25,9% per il campione con pori nominali di 4 nm. La spettroscopia FT-IR ha confermato la presenza di molecole di vitamina D₃ all'interno dei campioni. I risultati derivanti dall'analisi di adsorbimento di azoto riportano, per entrambi i campioni di silice, una diminuzione dell'area superficiale specifica e del volume poroso a seguito dell'incorporazione della molecola. Il test di rilascio è stato condotto in una soluzione di sudore artificiale, ossia una soluzione che mimi la possibile applicazione del sistema silice-farmaco in ambito topico. Diversamente da come previsto, il risultato del test non è stato soddisfacente in quanto non si sono riscontrate concentrazioni significative di farmaco nella soluzione ricevente. Dal test di rilascio svolto sul campione si possono supporre alcune ipotesi:

1. La soluzione di sudore artificiale è una soluzione acquosa e, visto che la vitamina D₃ è una molecola altamente idrofobica e pressoché insolubile in acqua, questo può aver impedito il rilascio del principio attivo da parte della silice;
2. Il mancato rilascio della molecola da parte della silice può essere dovuto alla degradazione del farmaco stesso, avvenuta nel tempo che intercorre tra l'impregnazione e il test di rilascio oppure durante il test.

A prescindere dal risultato di questi test, comunque, il lavoro citato mostra come sia possibile incorporare con successo la vitamina D₃ su silice mesoporosa tramite il metodo IWI [37].

2.4.3 Metodo di fusione

Nel processo di fusione le molecole di farmaco vengono caricate da una fase fusa. Il principio attivo viene riscaldato, con il sistema mesoporoso, al di sopra del proprio punto di fusione, il che potrebbe provocare una potenziale degradazione del farmaco. Infatti, fattori importanti da considerare

quando si utilizza questo metodo sono la viscosità del fuso, che deve essere sufficientemente bassa da consentire alla molecola di entrare nella struttura dei pori, e la stabilità termica sia dell'adsorbente che del farmaco; questo esclude tutti i prodotti farmaceutici noti per la loro decomposizione alla fusione [33], quindi anche la vitamina D₃.

2.4.4 CO₂ supercritica

Le industrie farmaceutiche si stanno indirizzando sempre di più verso una tecnologia di tipo ecosostenibile; questo obiettivo ha portato allo sviluppo di una tecnica di impregnazione alternativa che permette di sostituire i solventi organici e che consiste nell'incorporare i farmaci dissolvendoli in fluidi compressi altamente volatili, come l'anidride carbonica supercritica (scCO₂). Le proprietà specifiche dei fluidi supercritici, infatti, ne consentono l'utilizzo come impregnanti.

Secondo la IUPAC, un fluido supercritico (SCF) può essere definito come qualsiasi sostanza presente a una temperatura e una pressione superiori ai loro valori critici. Superato il punto critico, esiste un'unica fase con caratteristiche fisiche intermedie tra quelle di un liquido e quelle di un gas: la viscosità e le proprietà di trasferimento di massa sono simili a quelle di un gas, ma la densità e le caratteristiche di solvatazione sono simili a quelle di un solvente liquido [38].

Nella pratica, la scCO₂ è uno dei fluidi supercritici maggiormente utilizzati poiché risulta avere le seguenti proprietà: inodore, incolore, non tossico, non infiammabile, non corrosivo, riciclabile, poco costoso e facile da maneggiare. Inoltre, presenta parametri critici relativamente bassi, quindi facilmente raggiungibili. La temperatura critica $T_c = 31,1\text{ °C}$ è molto vicina alla temperatura ambiente, mentre la pressione critica è mediamente alta $P_c = 73,8\text{ bar}$ (figura 2.4) [38]. Abbassando la pressione a condizioni ambientali il biossido di carbonio è un gas, condizione che lo rende facilmente separabile dal soluto. Tutti questi vantaggi rendono la scCO₂ interessante per l'incorporazione di farmaci, ma anche per l'estrazione, in quanto rappresenta un'alternativa promettente per separare i componenti termicamente sensibili da stampi organici [38].

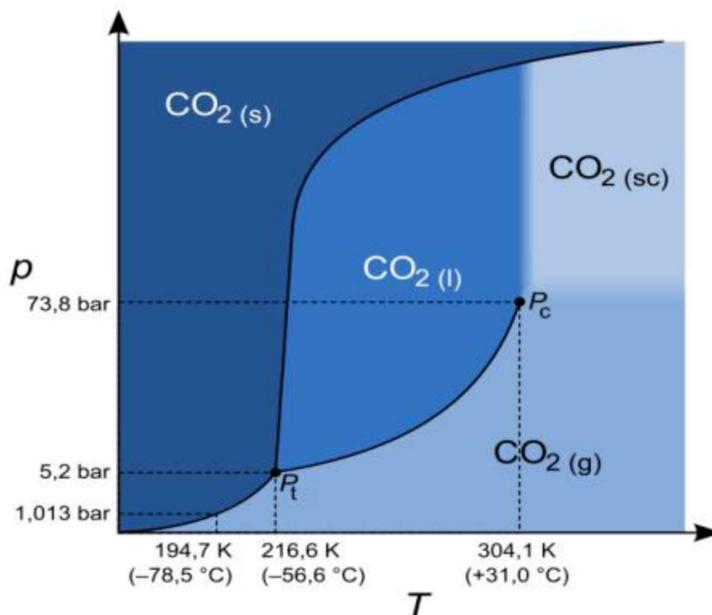


Figura 2.4: Diagramma di fase dell'anidride carbonica [39].

Tuttavia, la $scCO_2$ presenta alcune limitazioni, legate alle sue proprietà fisico-chimiche e alla sua struttura molecolare. Infatti, essendo una molecola lineare con nessun momento dipolo netto, possiede un potere dissolvente piuttosto limitato verso specie polari e ioniche [40]. Di conseguenza, non è utilizzabile come unico solvente con tutti i composti, ma è possibile aumentare la sua polarità e la gamma di materiali che possono essere estratti aggiungendo un co-solvente. Per tale scopo, l'etanolo e il metanolo sono i co-solventi maggiormente utilizzati [40].

Come descritto nella review di Gurikov e Smirnova [41], vi sono soluti più o meno solubili in $scCO_2$. Si possono così classificare i farmaci indagati per il drug delivery:

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

La preparazione di matrici di silice mesoporosa impregnate con un farmaco consiste nel solubilizzare la sostanza in $scCO_2$ e successivamente porla a contatto con la matrice stessa. Fondamentalmente, il processo di impregnazione coinvolge tre componenti: la CO_2 come solvente, il farmaco e il materiale. Il processo è costituito da tre fasi, rappresentate anche nelle figure 2.5-2.6 [42][43]:

1. dissoluzione del soluto in un'atmosfera di $scCO_2$;
2. contatto tra la soluzione [CO_2 + soluto] e il materiale;
3. stadio di depressurizzazione.

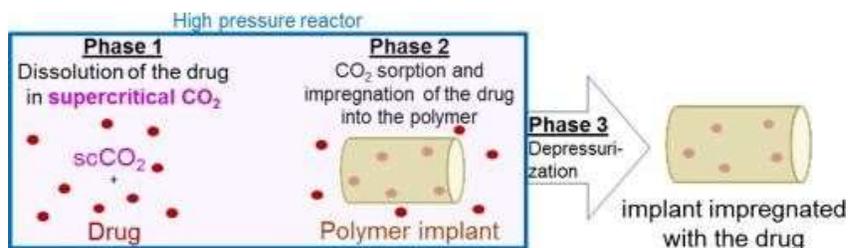


Figura 2.5: Rappresentazione schematica delle tre fasi del processo di impregnazione [42].

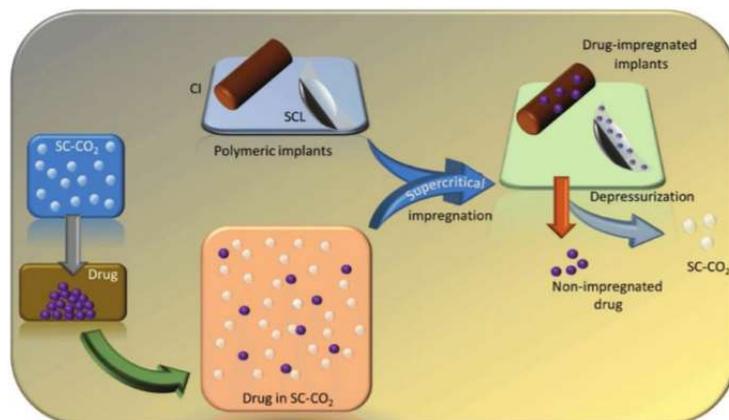


Figura 2.6: Esempio della rappresentazione schematica del processo di impregnazione mediato da $scCO_2$ in impianti polimerici [43].



L'impiego di $scCO_2$ per il caricamento del farmaco offre molti vantaggi rispetto ai tradizionali metodi di incorporazione. Innanzitutto, questo solvente ha un buon potere solvatante e un'elevata diffusività [42]. Inoltre, alla fine del processo è possibile ottenere nuovamente la CO_2 in forma gassosa semplicemente riportando il sistema in condizioni ambientali, successivamente questa può essere riutilizzata o scaricata nell'atmosfera. Il processo risulta più semplice, poiché non sono necessarie fasi di rimozione del solvente associate all'uso di solventi organici. Tuttavia, presenta anche alcuni svantaggi, tra cui la necessità di attrezzature e conoscenze specializzate per l'alta pressione. Inoltre, non tutte le sostanze sono solubili in $scCO_2$.

Nonostante i numerosi vantaggi intrinseci all'utilizzo della $scCO_2$ per l'incorporazione di farmaci e la buona solubilità della vitamina D_3 in $scCO_2$, in letteratura non sono riportati studi che prevedano l'utilizzo di questo approccio per l'adsorbimento di vitamina D_3 su carrier. Per questo motivo, il presente lavoro di tesi è stato dedicato allo studio di tale tecnica. In particolar modo, è stata indagata la possibilità di adsorbire vitamina D_3 in supporti di silice mesoporosa (SBA-15) tramite $scCO_2$. Infatti, come anticipato nei paragrafi 2.2 e 2.3, le silici mesoporose, benché particolarmente promettenti per il *drug delivery*, non sono state praticamente mai studiate come supporti per la somministrazione di vitamina D_3 . In aggiunta, l'eventuale rilascio di silicio da parte della silice avrebbe un effetto benefico per la formazione di nuovo collagene [21] e sarebbe altamente desiderabile nel caso di trattamento di problematiche della pelle, come la psoriasi. Infine, la tecnica d'impregnazione mediante CO_2 supercritica scelta in questo lavoro di tesi per l'incorporazione di vitamina D_3 è altamente promettente per i seguenti motivi:

- Il metodo di impregnazione è eco-compatibile. La CO_2 è disponibile, riciclabile, economica, non infiammabile e non tossica. Queste caratteristiche sono fondamentali per il suo utilizzo in ambito farmaceutico.
- La possibilità di agire su parametri operativi quali temperatura, pressione e tempo, permette di modificare l'interazione farmaco-materiale. Ciò garantisce l'ottenimento dell'interazione migliore, che prevede che il farmaco sia in condizioni amorfe, perché ciò migliora la sua biodisponibilità [43].
- Elevata solubilità della vitamina D_3 in CO_2 supercritica, pari a 43,8 g/kg nelle condizioni di processo [45].
- L'impregnazione avviene in un recipiente chiuso, permettendo di proteggere la vitamina D_3 dall'azione di fattori esterni, quali umidità, calore e luce, che possono indurre isomerizzazione o ossidazione della sua struttura.
- Le condizioni operative permettono l'impregnazione a temperature più basse rispetto alla temperatura di fusione della vitamina D_3 (83 °C).



Capitolo 3 – Materiali e metodi

I seguenti capitoli sono dedicati al lavoro sperimentale effettuato. Questo consiste nell'adsorbimento di vitamina D₃, tramite tecnica d'impregnazione mediante CO₂ supercritica, di due silici mesoporose commerciali. Successivamente, per valutare l'interazione tra farmaco e supporti, sono state eseguite caratterizzazioni fisico-chimiche dei campioni e una prova preliminare di estrazione in etanolo.

3.1 Materiali

Per l'impregnazione tramite CO₂ supercritica, le analisi spettroscopiche e l'estrazione in etanolo sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- vitamina D₃, colecalciferolo, (C₂₇H₄₄O), Merck®;
- etanolo (CH₃CH₂OH), anidro, Merck®;
- SBA-15, pore size 8 nm, Sigma-Aldrich®;
- SBA-15, pore size 4 nm, Sigma-Aldrich®;

3.2 Silici mesoporose utilizzate

Per questo lavoro di tesi è stata utilizzata una tipologia di silice mesoporosa commerciale, molto studiata per applicazioni biomediche, ovvero la SBA-15.

Nel 1998, un'importante ricerca dell'Università della California ha prodotto questo tipo di matrice caratterizzata da una struttura dei pori ordinata esagonale. Rispetto alla silice MCM-41, SBA-15 mostra una dimensione dei pori maggiore (4 - 30 nm), pareti dei pori più spesse (3,1 - 6,4 nm) e una morfologia della superficie più ruvida; inoltre, presenta delle ottime proprietà di resistenza termica, meccanica e chimica [30]. Il gruppo di ricerca di Zhao ha sintetizzato la SBA-15 con pori uniformi fino a 30 nm utilizzando copolimeri a blocchi anfifilici in mezzi fortemente acidi (pH~1) [30].

Nel caso in esame, sono state utilizzate due silici con diametro poroso differente, la prima con un diametro medio nominale dei pori di 8 nm e la seconda di 4 nm, in modo da valutare l'influenza di

questo parametro sull'incorporazione e la distribuzione del principio attivo. L'utilizzo di queste tipologie di silici mesoporose dovrebbe permettere l'adsorbimento all'interno del volume poroso della vitamina D₃, dal momento che si stima un ingombro sterico di questa molecola di circa 2 nm. Una caratteristica dell'SBA-15 è la presenza di un sistema poroso tridimensionale, dovuto al network microporoso attorno ad ogni mesoporo che genera una interconnessione tra i mesopori. La figura 3.1 è la rappresentazione dell'adsorbimento di un farmaco, riprodotto come delle sferette, nelle porosità della silice SBA-15: conseguentemente all'adsorbimento si verifica la riduzione del diametro medio dei pori.

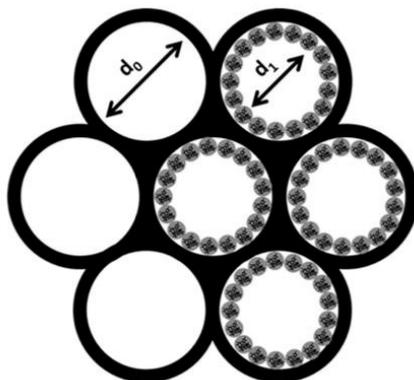


Figura 3.1: Disposizione delle molecole di farmaco all'interno dei pori [46].

3.3 Il processo di adsorbimento da scCO₂

La tecnica di impregnazione scelta per questo lavoro di tesi è una tecnica innovativa, ossia l'impregnazione mediante CO₂ supercritica, già descritta in dettaglio nel paragrafo 2.4.4.

Sono stati utilizzati, singolarmente, i due campioni di silice commerciale, SBA-15 con diametro medio nominale dei pori rispettivamente di 4 nm e 8 nm, sotto forma di pastiglia da 200 mg. Una pastiglia di farmaco, dal peso di 200 mg per la prima prova e di 100 mg per la seconda prova, è stata inserita all'interno di un cilindretto di vetro. All'interno dello stesso cilindretto è stata inserita anche la pastiglia di silice, separata da quella del farmaco da un filtro di carta dello stesso diametro del cilindro. Durante il processo d'impregnazione la vitamina D₃ diffonde tramite i pori del filtro stesso. Alle estremità del cilindro è stata inserita della lana di vetro per evitare contaminazioni esterne e come strumento contenitivo per le polveri (figura 3.2).

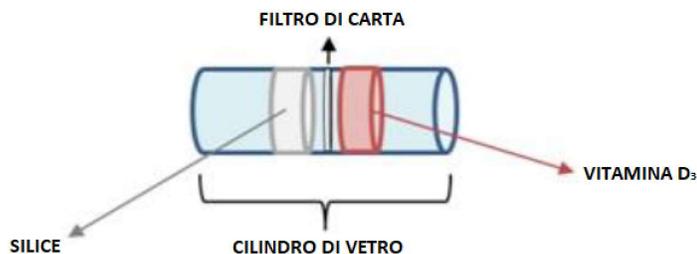


Figura 3.2: Schematizzazione dei cilindretti inseriti all'interno dell'apparato d'impregnazione di CO₂ supercritica.

La figura 3.3 riporta una rappresentazione schematica dell'impianto. I cilindri contenenti il supporto e la vitamina D₃ vengono inseriti in un'autoclave cilindrica in acciaio inossidabile (vessel), il quale, dopo il caricamento, viene posto all'interno di una stufa, che serve a mantenere costante la temperatura durante tutto il processo.

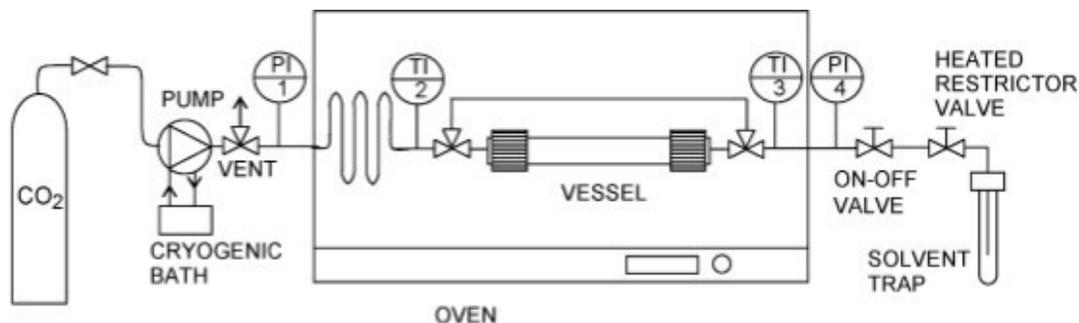


Figura 3.3: Apparato sperimentale [47].

Inizialmente, l'autoclave viene purificata con CO₂ gassosa per rimuovere l'aria residua, dopodiché viene azionata la modalità statica fino al raggiungimento delle condizioni di funzionamento desiderate (tabella 3.1), scelte in base a dati di letteratura [45] e a prove preliminari con altra tipologia di farmaco (ibuprofene [47][48]). L'autoclave viene poi riempita con il solvente supercritico (scCO₂) in modo che avvenga la dissoluzione del farmaco e successivamente l'impregnazione del carrier a contatto con la soluzione creatasi. Infine, avviene la depressurizzazione, passaggio in cui l'impianto viene scaricato e la CO₂ torna allo stato gassoso separandosi dal sistema carrier-farmaco [49].

Tabella 3.1: Condizioni operative.

Pressione	Temperatura	Tempo
35 MPa	60 °C	8 h

3.4 Tecniche di caratterizzazione

Di seguito vengono elencate e descritte le tecniche di caratterizzazione utilizzate.

3.4.1 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X (XRD) è un metodo analitico per lo studio della composizione chimica e delle fasi cristalline all'interno di un campione solido.

La diffrazione è un fenomeno di interferenza che si verifica quando un'onda incontra un ostacolo di dimensioni confrontabili alla sua lunghezza d'onda e che porta alla sua diffrazione. Questo fenomeno è utilizzabile per la determinazione della struttura dei materiali, dal momento che le distanze interatomiche sono dell'ordine dei Ångström (Å), permettendo ai cristalli di essere dei reticoli di diffrazione ideali per i raggi X (lunghezza d'onda dell'ordine degli Å) [49]. Quando un fascio di raggi X colpisce un materiale solido con una struttura cristallina, provoca la vibrazione degli elettroni che circondano un singolo atomo e questi iniziano ad emettere onde

elettromagnetiche alla stessa lunghezza d'onda dei raggi X incidenti in tutte le direzioni. Le onde diffuse possono interferire sia in modo costruttivo che distruttivo; per interferenza costruttiva si intende il fenomeno per cui i raggi X si rinforzano reciprocamente (figura 3.4), e ciò è assunto da considerazioni geometriche, ovvero solo quando la loro differenza di cammino ottico è pari ad un numero intero di lunghezza d'onda (il raggio diffratto con un angolo ϑ deve essere uguale al raggio di incidenza). Ciò si verifica quando essi vengono riflessi da piani atomici paralleli ed equidistanti (d) e se la distanza tra i piani è comparabile con la lunghezza dell'onda incidente [50]. Tale condizione è stabilita e descritta dalla legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin(\vartheta)$$

dove n è l'ordine di diffrazione, λ la lunghezza d'onda del raggio incidente, d la distanza tra i piani atomici e ϑ è l'angolo di incidenza.

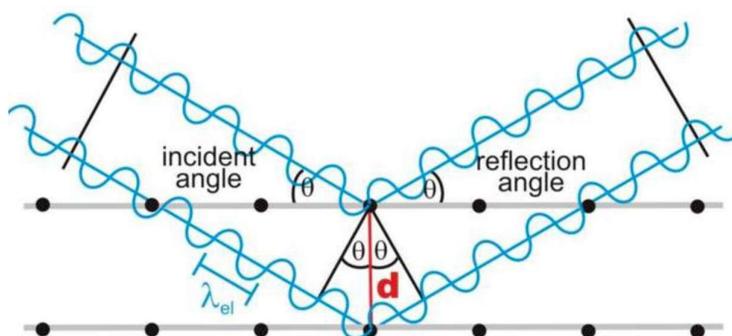


Figura 3.4: Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg [51].

La legge di Bragg permette di identificare univocamente la fase cristallina del campione e di determinarne la dimensione d .

I raggi X raggiungono la superficie del campione e lo scansionano attraverso un intervallo 2ϑ ; questi una volta diffratti, vengono elaborati e contati per produrre uno spettro di diffrazione.

I dispositivi utilizzati per determinare lo spettro di diffrazione sono chiamati diffrattometri a raggi X e sono costituiti da tre componenti principali:

- Tubo a raggi catodici: riscalda un filamento per produrre elettroni. Applicando una tensione appropriata, gli elettroni vengono accelerati verso un bersaglio e lo bombardano. Quando gli elettroni raggiungono un'energia sufficiente per rimuovere gli elettroni dal guscio interno del bersaglio, vengono prodotti spettri di raggi X caratteristici;
- Supporto del campione: contenitore in cui viene posto il campione che solitamente è in forma di strato sottile, omogeneo e piano di polvere (come nel caso dei campioni di silice utilizzati in questo lavoro di tesi). Di conseguenza, il campione viene preventivamente macinato per garantire una distribuzione statistica di tutte le possibili orientazioni nello spazio della cella elementare;
- Rilevatore di raggi X mobile: registra ed elabora il segnale prodotto dalle interferenze costruttive [50].



Per caratterizzare i materiali mesoporosi è possibile effettuare sia scansioni a bassi angoli sia ad alti angoli. Il primo tipo di analisi si effettua per verificare la presenza di un ordine strutturale a lungo raggio, mentre il secondo verifica se il sistema sia amorfo o cristallino. Poiché l'obiettivo principale di questa caratterizzazione era verificare che il principio attivo, una volta caricato nel sistema, non diventasse cristallino, sono state effettuate analisi unicamente ad alti angoli.

Lo strumento utilizzato è il diffrattometro *X'PERT3 Panalytical*. L'emissione di raggi X avviene da anodo in rame con lunghezza d'onda $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ e lo strumento viene impostato per operare con una tensione di 40 kV e una corrente di 40 mA. Attraverso un software collegato è possibile creare un diffrattogramma, un diagramma bidimensionale che mette in relazione l'intensità del segnale rilevato con l'intervallo dell'angolo di incidenza 2θ . Le condizioni di misura utilizzate sono riportate nella tabella 3.2.

Tabella 3.2: Condizioni operative del test XRD ad alti angoli.

Range angolare 2θ	5° - 60°
Step angolare	0,0131°
Voltaggio del generatore	40 kV
Corrente del tubo	40 mA
Filtro anti-divergenza	1/2
Filtro antiscatter	1/4

3.4.2 Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica di analisi di tipo quantitativo che permette di misurare la variazione di massa di un campione in funzione della temperatura e/o del tempo in atmosfera controllata a temperatura costante. Quest'analisi è stata effettuata per avere una misura approssimativa del contenuto di farmaco introdotto nel supporto mesoporoso, poiché è possibile associare la variazioni di peso alla perdita di acqua superficiale adsorbita, acqua strutturale e, nel caso del presente lavoro, di vitamina D₃ dovuta alla sua degradazione. Effettuando misure preliminari sui supporti di silice mesoporosa tal quali, è stata ricavata la percentuale di acqua adsorbita e strutturale presente, permettendo, con le dovute sottrazioni, di ottenere la quantità di vitamina D₃ adsorbita in ogni campione. La variazione di peso percentuale si può facilmente calcolare tramite la seguente equazione:

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

Lo strumento utilizzato è il *DSC/TGA 92-16.18 Setaram*. Per la misurazione, i campioni (circa 10 mg) sono stati inseriti all'interno di un piccolo crogiolo di allumina collegato ad una bilancia di precisione. Dopodiché, sono stati sottoposti ad una rampa di riscaldamento di 10°C/min fino al raggiungimento di 800°C, insufflando aria all'interno dello strumento per allontanare i prodotti di degradazione volatili.

3.4.3 Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è un'analisi non distruttiva che sfrutta l'interazione tra la radiazione infrarossa e il campione in esame per ricavare informazioni sui gruppi funzionali e i tipi di legami chimici presenti nel campione stesso.

Quando una molecola viene investita da una radiazione IR ad una certa frequenza ν (espressa come numero d'onda, $1/\lambda$, in cm^{-1}) che coincide con la frequenza caratteristica di vibrazione di uno dei legami presenti, l'energia ceduta dalla radiazione viene convertita in energia rotazionale e vibrazionale e, quindi, la molecola può ruotare o vibrare [52].

Esistono due tipi di vibrazioni: stiramento, o *stretching*, del legame chimico, in cui la vibrazione avviene lungo l'asse di legame e si può descrivere come una serie di allungamenti e accorciamenti dello stesso; piegamento, o *bending*, dell'angolo di legame, in cui si verifica una vibrazione oscillatoria che richiede meno energia rispetto lo stiramento.

Gli spettri IR prodotti possono fornire informazioni sia qualitative sui legami chimici, sia quantitative dovute all'intensità del picco di assorbimento (o assorbanza). Si possono distinguere due intervalli di frequenze, sempre espressi in numero d'onda: uno compreso tra 4000 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} relativo ai gruppi funzionali, e l'altro tra 1300 cm^{-1} e 600 cm^{-1} che contiene bande originate da vibrazioni dell'intero scheletro molecolare, quindi è caratteristico di ogni composto (figura 3.5) [49].

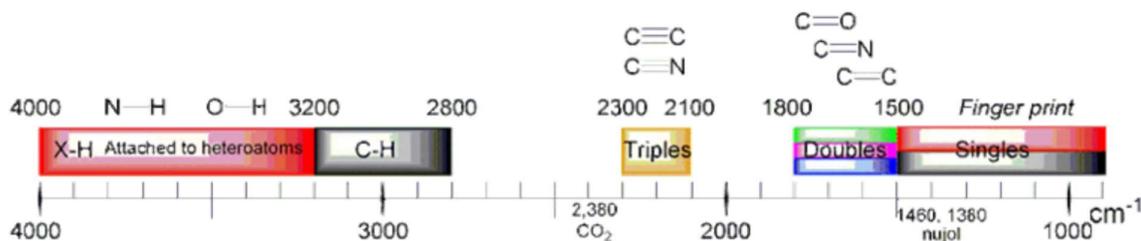


Figura 3.5: Regioni dello spettro IR [53].

Lo strumento utilizzato nella presente tesi è lo *spettrofotometro Equinox 55 Bruker*. Per la misurazione, il campione è stato diluito con alcuni mg di bromuro di potassio (KBr), essendo questo sale trasparente agli IR. Il tutto è stato macinato mediante un pestello e pressato con una pressa idraulica per ottenere delle pastiglie molto sottili. Le pastiglie ottenute sono state inserite in un portacampione forato, successivamente disposto in una cella trasparente alla radiazione IR, sempre in KBr. Per l'analisi sono state effettuate due spettri dello stesso campione, intervallati da una fase di degasaggio di circa un'ora fino alla pressione di 0,1 Pa, in modo tale da eliminare le specie adsorbite fisicamente sulla superficie che possono influenzare la misura.

3.4.4 Analisi di adsorbimento di azoto

La tecnica di adsorbimento di azoto misura la quantità di gas adsorbito o desorbito dalla superficie del materiale in funzione della temperatura e della pressione parziale dell'adsorbato. Questa analisi permette lo studio di parametri del materiale, quali l'area superficiale specifica, il volume poroso, il diametro medio e la distribuzione dei pori. Per ottenere questi risultati, si utilizza l'azoto che

viene fatto adsorbire sulla superficie del materiale in esame alla sua temperatura di liquefazione, ovvero 77 K.

I dati vengono rappresentati in curve chiamate isoterme di adsorbimento. Secondo la classificazione IUPAC (figura 3.6), esistono sei tipi di isoterme di assorbimento caratteristici degli adsorbenti microporosi (tipo I), non porosi o macroporosi (tipi II, III e VI) o mesoporosi (tipi IV e V) [28].

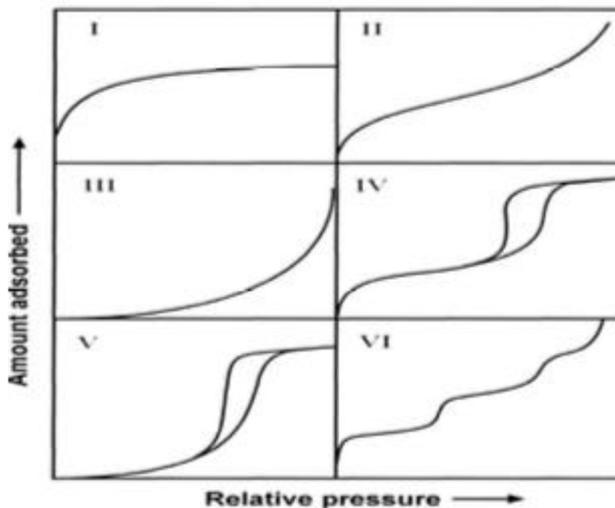


Figura 3.6: Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [28].

L'isoterma di tipo IV è caratteristica dei materiali mesoporosi, e quindi tipica anche dei supporti studiati in questo lavoro di tesi. La proprietà principale di questa curva è il rapido tratto verticale dovuto alla condensazione capillare nei mesopori, ad una pressione di equilibrio minore della tensione di vapore dell'adsorbato. Spesso in questo tipo di isoterma si osserva la presenza di un ciclo di isteresi, dovuto al fatto che la curva di desorbimento non corrisponde a quella di adsorbimento. La curva inizialmente segue lo stesso profilo dell'isoterma di tipo II e tende a stabilizzarsi per alti valori di pressione relativa, in cui si verifica la formazione del monostato e a seguire l'adsorbimento multistrato sulle pareti dei mesopori. Aumentando ancora il valore della pressione si verifica il fenomeno di condensazione capillare, ossia il gas adsorbito all'interno dei mesopori non è più stabile in fase di vapore e condensa. Questa tipologia di curva è propria di molti adsorbenti industriali mesoporosi. La IUPAC in presenza di isteresi classifica ulteriormente i materiali porosi in base alla forma che assume il coppia di isteresi (figura 3.7).

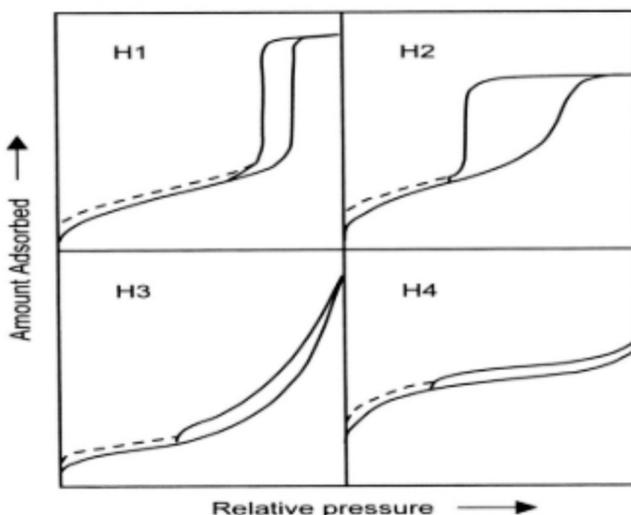


Figura 3.7: La relazione tra la forma dei pori e l'isoterma di adsorbimento-desorbimento [28].

Secondo la IUPAC, la tipologia H1 è spesso associata a materiali porosi con pori cilindrici ben definiti. Al contrario, la tipologia H2 è attribuita a materiali con una distribuzione della dimensione e forma dei pori disordinata, che presenta anche strozzature o colli di bottiglia.

I materiali che danno origine a isteresi con forma H3, in cui non è presente alcun limite di adsorbimento ad alti valori di P/P_0 , hanno pori a forma di fessura dovuti ad aggregati di particelle disposti in strati sottili. Infine, l'isteresi di tipo H4 è spesso associata a materiali contenenti sia micropori che mesopori [28].

Lo strumento utilizzato è *ASAP 2020 Plus Micrometrics*. Nella pratica sperimentale l'analisi si divide in due parti. Inizialmente il campione, inserito in una buretta di vetro ermetica, è stato sottoposto a un degasaggio a 60 °C (lontano dalla temperatura di fusione della vitamina D₃, 83 °C) per circa 3 ore allo scopo di eliminare eventuali impurezze e/o acqua già adsorbite sulla superficie del campione. La seconda parte consiste nell'analisi vera e propria in cui la buretta viene posta in un bagno di azoto liquido e viene inviato azoto gassoso per il ciclo di adsorbimento/desorbimento. A fine misura si ottengono i dati che permettono di costruire l'isoterma. Per ricavare il valore dell'area superficiale specifica è stato utilizzato il modello BET (Brunauer-Emmett-Teller); mentre per ricavare il valore della dimensione dei pori è stato utilizzato il modello BJH (Barett, Joyner and Halenda).

3.4.5 Spettroscopia UV/Visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica di caratterizzazione che fornisce informazioni di tipo qualitativo e quantitativo, basata sulla determinazione della lunghezza d'onda a cui assorbe una soluzione chimica. Infatti, ogni composto presenta un picco di assorbimento caratteristico ad una determinata lunghezza d'onda.

Quando una molecola viene colpita ed assorbe una radiazione di lunghezza d'onda tra 200-400 nm (UV) o 400-800 nm (Visibile) si determinano transizioni elettroniche tra livelli energetici e ciò significa che un elettrone si muove da un orbitale molecolare di livello energetico più basso ad uno di livello energetico più alto. Questo fenomeno di assorbimento viene sfruttato per determinare la

concentrazione di una specie assorbente all'interno di una soluzione diluita, poiché segue la legge di Lambert-Beer [54]:

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

dove A è l'assorbanza misurata (adimensionale), I_0 l'intensità della luce incidente a una determinata lunghezza d'onda, I l'intensità trasmessa, ϵ il coefficiente di assorbimento ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c la concentrazione della soluzione (mol L^{-1}) e l il cammino ottico (cm).

Lo spettrofotometro UV/Vis, schematizzato in figura 3.8, è costituito da alcuni componenti principali: una sorgente di energia radiante nella banda UV/Vis; un monocromatore, che isola un intervallo ristretto di radiazioni emesse e lo cambia gradualmente; due recipienti, chiamati cuvette, uno per il campione e uno per il riferimento; e un rivelatore.

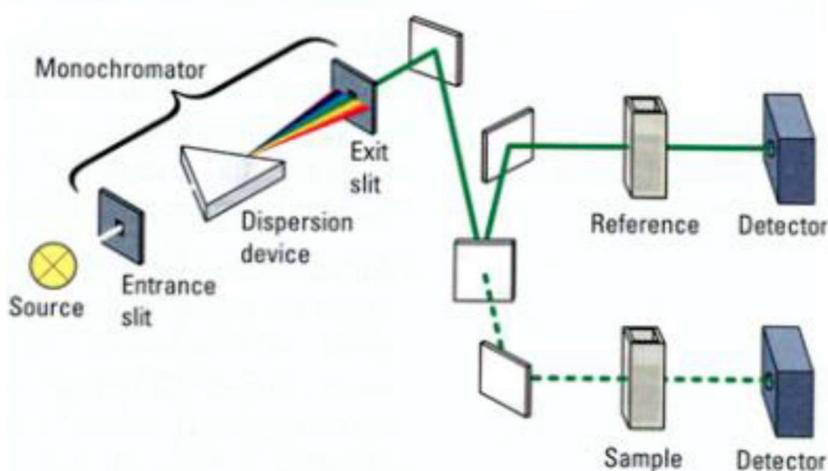


Figura 3.8: Schematizzazione di uno spettrofotometro UV/Vis [55].

Lo strumento utilizzato è lo spettrofotometro *Lambda 25 Perkin Elmer*. Per iniziare la misurazione è necessario riempire le due cuvette con il solvente puro, in modo da impostare il “bianco analitico” (o semplicemente bianco), ovvero la miscela in tutto e per tutto uguale al campione da analizzare ma priva degli analiti di interesse. In questa tesi il solvente puro è etanolo, mentre l'analita di interesse è la vitamina D_3 . Le cuvette utilizzate sono in quarzo e con un percorso ottico di 1 cm. Successivamente in una cuvette viene inserita la soluzione campione contenente vitamina D_3 e lo spettrofotometro misura la differenza di assorbanza tra quella del campione e quella di riferimento (il bianco).

Lo strumento è stato utilizzato per definire l'assorbanza del principio attivo, corrispondente alla lunghezza d'onda massima, per la realizzazione delle rette di taratura necessarie al successivo studio di rilascio del farmaco nel tempo.

Capitolo 4 – Caratterizzazione dei supporti in silice mesoporosa

La caratterizzazione dei supporti tal quali è stata eseguita mediante analisi di adsorbimento di azoto, analisi termogravimetrica e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, i cui risultati sono riportati di seguito.

4.1 Analisi di adsorbimento di azoto

Nelle figure 4.1-4.2 sottostanti vengono riportate le isoterme di adsorbimento di azoto a 77 K dei due supporti di SBA-15 con pori medi nominali di 8 nm e 4 nm.

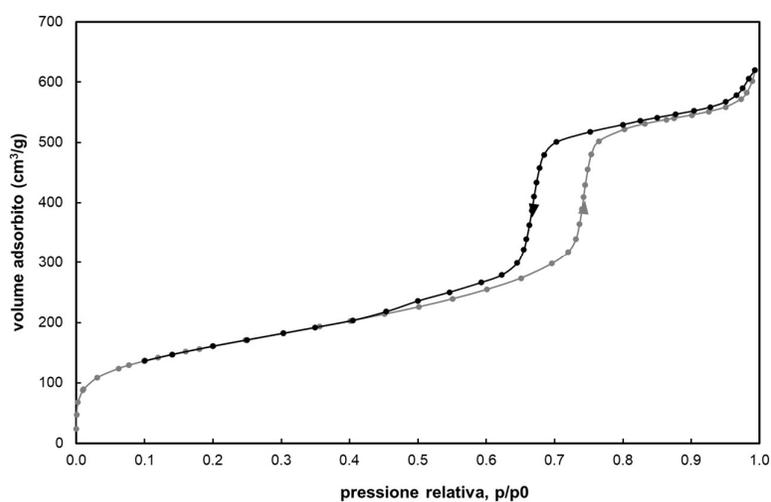


Figura 4.1: Isotherma di adsorbimento del supporto di silice SBA-15 con pori medi nominali di 8 nm.

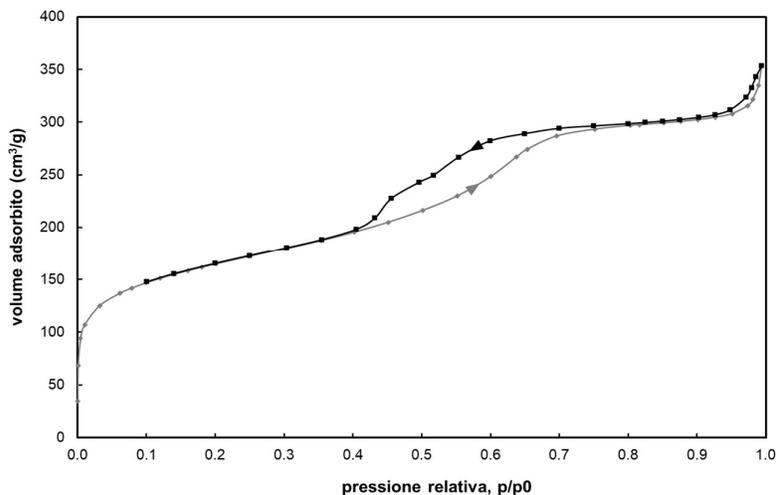


Figura 4.2: Isoterma di adsorbimento del supporto di silice SBA-15 con pori medi nominali di 4 nm.

L'isoterma di adsorbimento, per entrambe le tipologie di SBA-15, 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 per la tipologia SBA-15 con pori medi nominali di 8 nm (SBA_8nm_rif, figura 4.1) ha una forma tipica delle curve teoriche H1 descritte nel paragrafo 3.4.4, che indica una prevalenza di mesopori uniformi e di forma cilindrica. Tuttavia, il coppia d'isteresi mostra un allungamento per valori di pressione relativa tra 0,45 e 0,65, indice di una distribuzione non uniforme del diametro dei pori, come confermato anche dalla distribuzione bimodale del diametro dei pori ricavata con modello BJH e riportata in figura 4.3. È comunque possibile individuare una famiglia principale di pori, di diametro centrato a 6,4 nm. L'analisi dei dati ha permesso di ottenere i valori di area superficiale specifica, volume dei pori e diametro dei pori tramite modello BET e BJH. I dati ottenuti sono riportati in tabella 4.1. Il diametro dei pori del campione di riferimento non corrisponde al valore nominale fornito dal produttore (8 nm); questa discrepanza può essere giustificata ricordando che il metodo BJH sottostima di circa un 20-30% la dimensione dei pori con diametro minore di 10 nm [56].

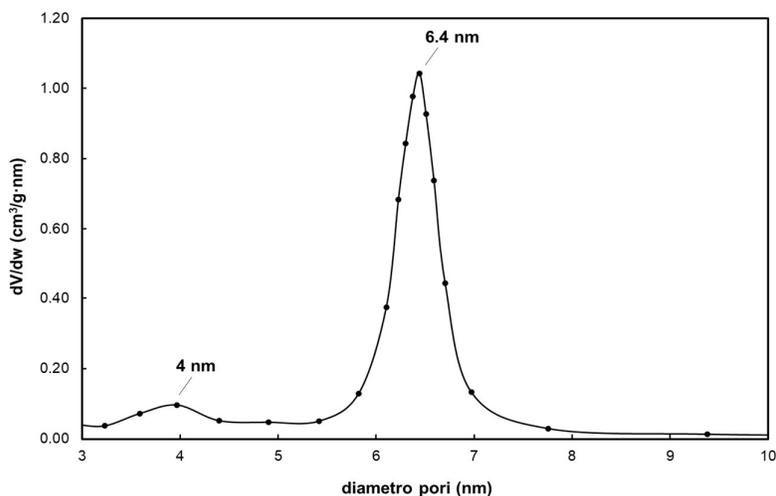


Figura 4.3: Grafico della distribuzione dei pori (BJH) nel supporto di silice SBA_8nm_rif.



Tabella 4.1: Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del supporto di SBA_8nm_rif.

Area superficiale specifica	571 m ² /g
Volume dei pori	0,90 cm ³ /g
Diametro dei pori	6,4 nm*

*Si trascura in questa tabella la famiglia di pori di diametro centrato intorno a 4 nm

Per quanto riguarda la SBA-15 con diametro medio dei pori nominale di 4 nm (SBA_4nm_rif), il cappio d'isteresi non la forma tipica H1 delle curve teoriche, e ciò indica come il campione sia caratterizzato da mesopori non omogenei né nel diametro né nella forma. Inoltre, è osservabile una distribuzione bimodale del diametro dei pori ottenuta tramite modello BJH e mostrata in figura 4.4. Si osservano due famiglie di pori, una con diametro pari a 3,6 nm e l'altra con diametro pari a 4,4 nm. Il valore di 4 nm può essere considerato un valore medio. L'analisi dei dati ha permesso di ottenere i valori di area superficiale specifica, volume dei pori e diametro principale dei pori tramite modello BET e BJH. I dati ottenuti sono riportati in tabella 4.2. Anche in questo caso, come si può notare dai dati riportati, la popolazione maggiore di pori ha un diametro inferiore al nominale (4 nm), a causa della sottostima dovuta all'utilizzo del modello BJH.

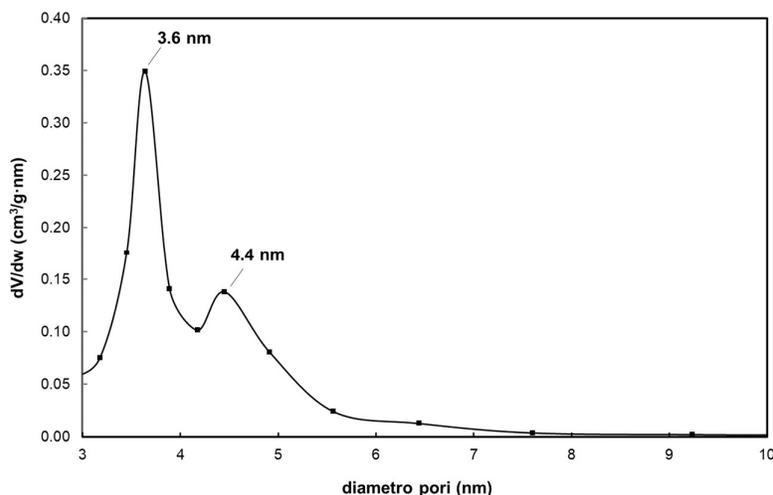


Figura 4.4: Grafico della distribuzione dei pori (BJH) nel supporto di silice SBA_4nm_rif.

Tabella 4.2: Valori ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto del supporto di SBA_4nm_rif.

Area superficiale specifica	551 m ² /g
Volume dei pori	0,49 cm ³ /g
Diametro dei pori	3,6 – 4,4 nm

In conclusione, le due silici mesoporosa analizzate presentano superfici specifiche comparabili e, coerentemente con il diverso diametro dei pori, la SBA_8nm_rif è caratterizzata da un volume poroso maggiore. Inoltre, la SBA_4nm_rif presenta una porosità meno omogenea, che in aggiunta al minor volume poroso e al minore diametro dei pori, può influenzare l'adsorbimento del farmaco.

4.2 Analisi Termogravimetrica

Dalle curve termogravimetriche, rappresentate nelle figure 4.5-4.6, si osserva, dalla temperatura ambiente ad una temperatura di circa 100 °C, un andamento decrescente con ripida pendenza a causa della perdita di acqua fisisorbita sulla superficie.

Per la silice SBA_8nm_rif (figura 4.5), dopo una perdita di peso di circa 2,8% dovuta all'acqua fisisorbita, la curva raggiunge un plateau fino ad una temperatura di circa 200 °C. Sopra i 200 °C la curva decresce nuovamente fino a raggiungere alla fine della prova un valore di massa residua del 95,5% (corrispondente ad una perdita di massa totale di 4,5%). Questa seconda diminuzione di massa rispetto al valore iniziale è data dalla perdita di silanoli, i quali risultano, quindi, pari a circa l'1,6% in peso.

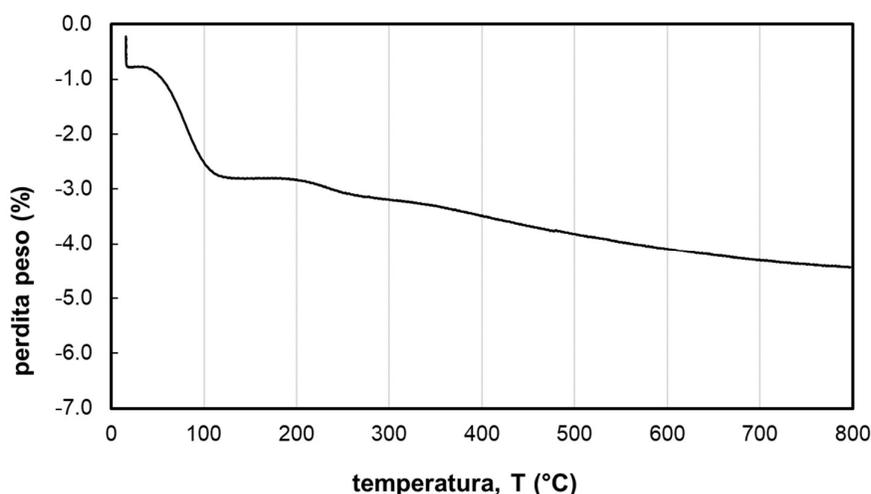


Figura 4.5: Curva termogravimetrica del supporto di SBA_8nm_rif [47].

La silice SBA_4nm_rif (figura 4.6), dopo aver perso circa il 3,6% del peso iniziale a seguito dell'evaporazione dell'acqua fisisorbita (entro 100 °C), presenta una massa costante (a parte lievi oscillazioni dovute alla misura) fino alla fine del test assestandosi ad un valore di massa residua del 96,5%. In base a questi dati, si può stimare che la perdita totale di massa, pari a circa il 3,6%, sia dovuta principalmente all'acqua (3,6%), mentre la variazione indotta dalla perdita di silanoli sia trascurabile (pari a circa lo 0,1%).

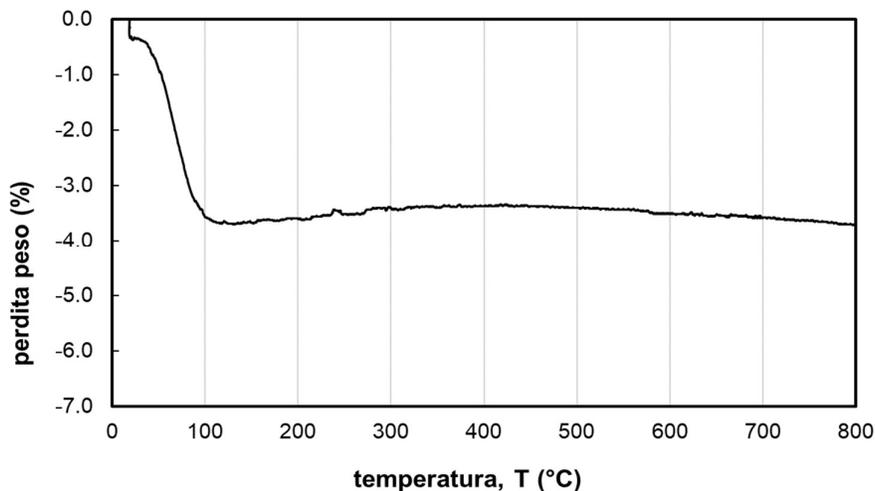


Figura 4.6: Curva termogravimetrica del supporto di SBA_4nm_rif [37].

4.3 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

I campioni sono stati sottoposti a spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e i grafici ottenuti sono riportati nelle figure 4.7-4.8. Entrambi gli spettri infrarossi delle silici hanno un andamento tipico, 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 per legame a idrogeno.

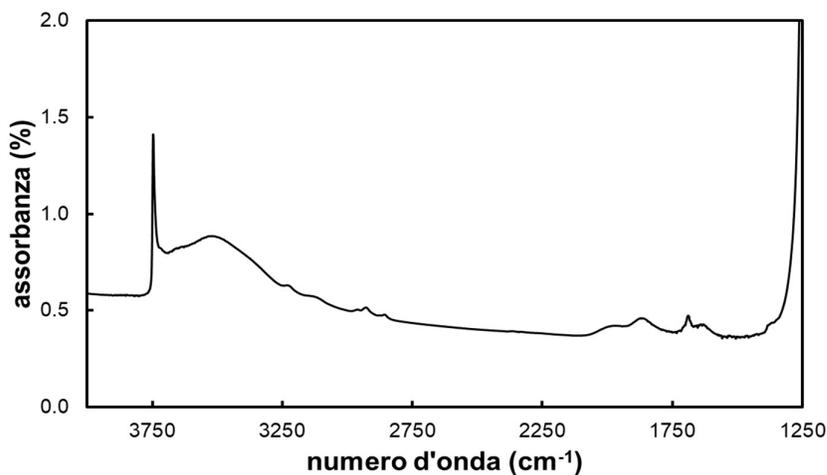


Figura 4.7: Spettro infrarosso del campione di SBA_8nm_rif [57].

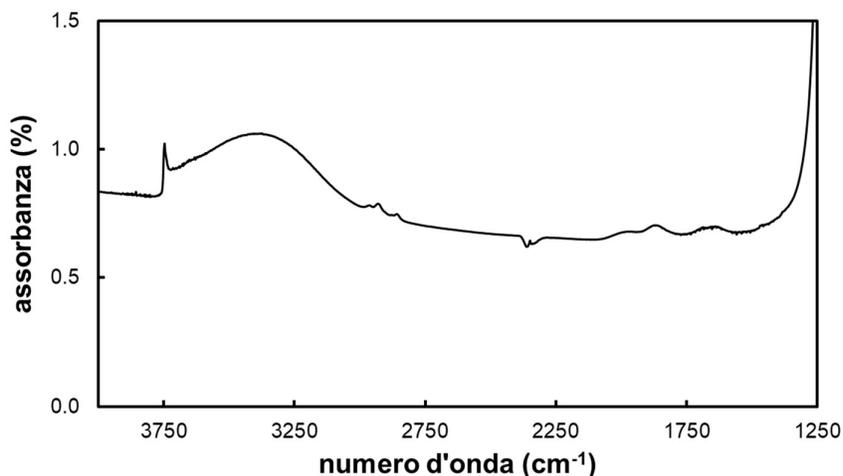


Figura 4.8: Spettro infrarosso del campione di SBA_4nm_rif.

Come si può notare dai due grafici, sono presenti un maggior quantitativo relativo di silanoli isolati nella silice SBA_8nm_rif. Mentre, l'intensità relativa della banda dovuta ai silanoli interagenti tramite legame idrogeno, rispetto a quella dovuta ai silanoli isolati, è maggiore per la tipologia di silice SBA_4nm_rif. Ci si aspetta, quindi, che quest'ultima sia leggermente più idrofilica, avendo un maggior quantitativo relativo di silanoli interagenti; tale caratteristica risulta coerente anche con la maggiore perdita di acqua fisisorbita osservata per la silice SBA_4nm_rif tramite ATG (figura 4.6). Vale la pena sottolineare questa differenza in quanto può portare a delle variazioni di comportamento tra i due tipi di silice nei confronti del farmaco.



Capitolo 5 – Caratterizzazione dei supporti contenenti vitamina D₃

L'incorporazione del principio attivo all'interno dei pori dei due campioni di silice è stata eseguita con la tecnica d'adsorbimento mediante scCO_2 , come già descritto nel paragrafo 3.3. Il principio attivo utilizzato è la vitamina D₃, o colecalciferolo, che viene fornita in polvere, è di colorazione bianca e inodore.

Nei successivi paragrafi vengono riportate e commentate le analisi effettuate sui campioni contenenti il principio attivo, con quantità di supporto/farmaco in proporzione di 1:1 per la prima serie di prove e di 2:1 per la seconda. Il fine è, quindi, quello di osservare se la variazione di tale rapporto ha delle conseguenze sull'adsorbimento (in termini di quantità incorporata, distribuzione del farmaco, interazione tra molecola e silice...). Per confronto vengono mostrate anche varie analisi di caratterizzazione della vitamina D₃ tratte dalla letteratura. Inoltre, insieme ai dati dei campioni contenenti il farmaco, vengono sistematicamente riportati quelli dei campioni di riferimento (supporti tal quali) per valutare gli effetti dell'incorporazione del principio attivo.

5.1 Diffrazione a raggi X

Lo spettro di diffrazione a raggi X della vitamina D₃ tal quale, riportato in figura 5.1, mostra la presenza di svariati picchi, tra cui i principali per valori 2θ di $5,05^\circ$, $15,75^\circ$ e $18,05^\circ$ [58], ed evidenzia la forma cristallina del principio attivo. Lo spettro viene confrontato con quelli eseguiti sui materiali per verificare lo stato cristallino o amorfo della vitamina D₃ nelle due silici.

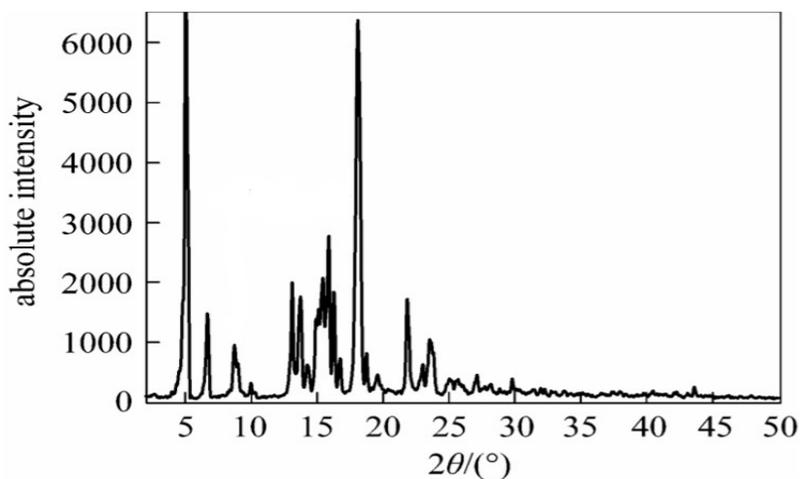


Figura 5.1: Spettro XRD della vitamina D₃ [58].

Nella figura 5.2 sono confrontati gli spettri di diffrazione ad alti angoli del campione con pori di diametro nominale di 8 nm caricato secondo un rapporto supporto/farmaco in massa di 1:1 (SBA_8nm_vitD3) e secondo un rapporto supporto/farmaco in massa di 2:1 (SBA_8nm_0.5vitD3).

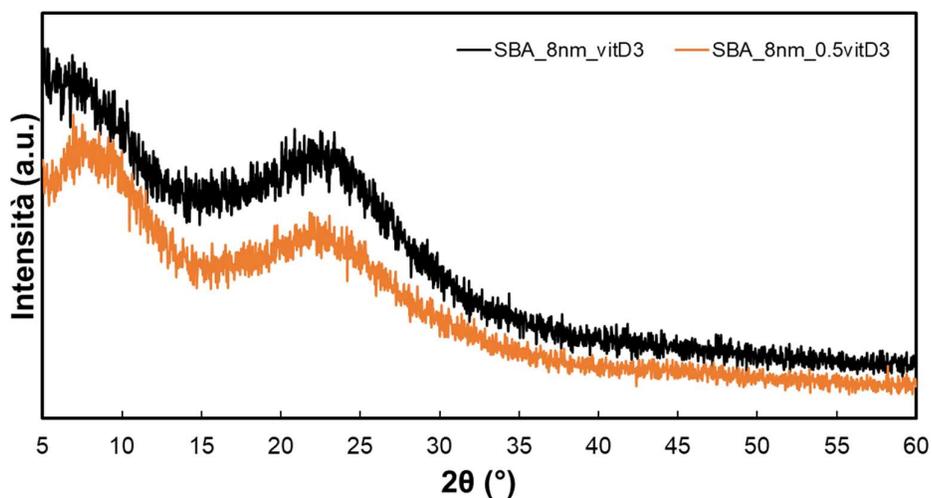


Figura 5.2: Spettro XRD – Confronto tra campioni caricati con pori di 8 nm.

Nella figura 5.3 sono confrontati gli spettri di diffrazione ad alti angoli del campione con pori di diametro nominale di 4 nm caricato secondo un rapporto supporto/farmaco in massa di 1:1 (SBA_4nm_vitD3) e secondo un rapporto supporto/farmaco in massa di 2:1 (SBA_4nm_0.5vitD3).

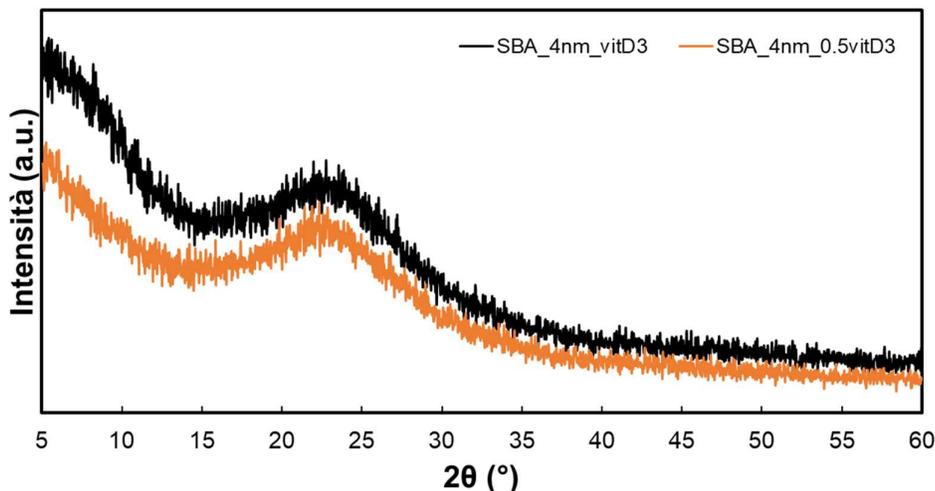


Figura 5.3: Spettro XRD – Confronto tra campioni caricati con pori di 4 nm.

In entrambe le silici caricate, la mancanza di picchi di diffrazione risolti e la presenza del tipico segnale mal definito per 2 theta compreso tra 20 e 25 confermano che la matrice del materiale sia costituita da silice amorfa. Inoltre, la mancanza dei picchi caratteristici della vitamina D₃ in fase cristallina evidenzia la presenza in forma amorfa farmaco. È particolarmente importante quest'ultimo aspetto poiché, grazie al fatto di essere metastabile, la forma amorfa dovrebbe migliorare considerevolmente la solubilità del principio attivo. Risultati analoghi sono stati riscontrati anche nel precedente lavoro di tesi sulle stesse silici mesoporose caricate con vitamina D₃ tramite tecnica d'impregnazione IWI [37].

5.2 Analisi termogravimetrica

La curva termogravimetrica del colecalciferolo (cristallino, in polvere) riportata in letteratura [59] è rappresentata in figura 5.4. Nell'intervallo di fusione 82-87 °C la curva mostra una trascurabile variazione di peso. La perdita di peso dovuta alla degradazione della vitamina D₃ inizia ad essere misurabile alla temperatura di circa 120 °C, da qui fino ai 400 °C si ha una perdita significativa con la degradazione completa del campione al termine della prova [59].

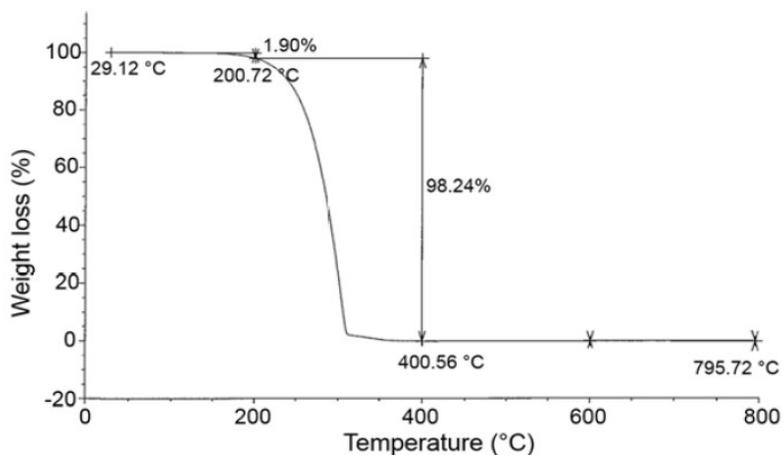


Figura 5.4: Curva termogravimetrica della vitamina D₃ [59].

Per avere una misura, seppur approssimativa, del contenuto di farmaco introdotto nel supporto mesoporoso si sceglie di lavorare per “sottrazione”, confrontando le perdite di peso delle silici contenenti vitamina D₃ e dei supporti di riferimento (SBA_8nm_rif e SBA_4nm_rif, riportate nel capitolo 4). Nelle figure 5.5-5.6 sono rappresentate le curve TGA di confronto dei campioni di riferimento e di quelli caricati secondo rapporto supporto/farmaco in massa di 1:1 (SBA_8nm_vitD3 e SBA_4nm_vitD3) e di 2:1 (SBA_8nm_0.5vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3).

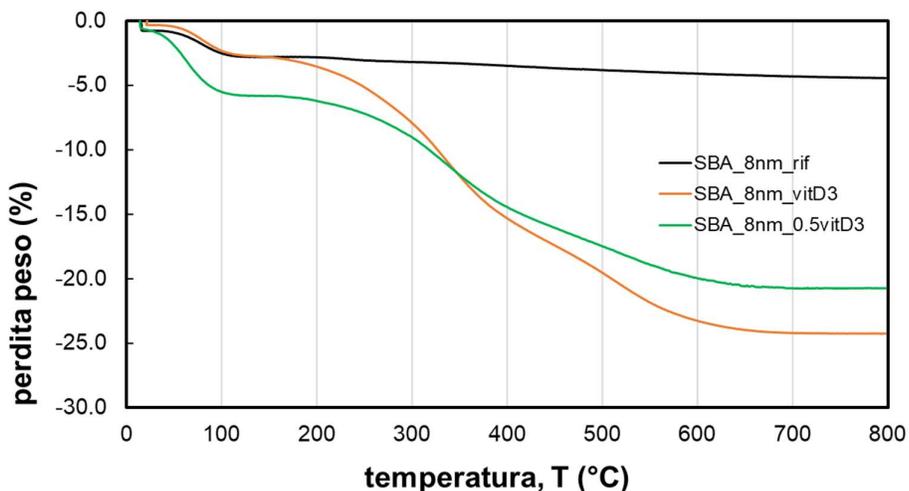


Figura 5.5: Curva TGA – Confronto tra campioni con pori da 8 nm.

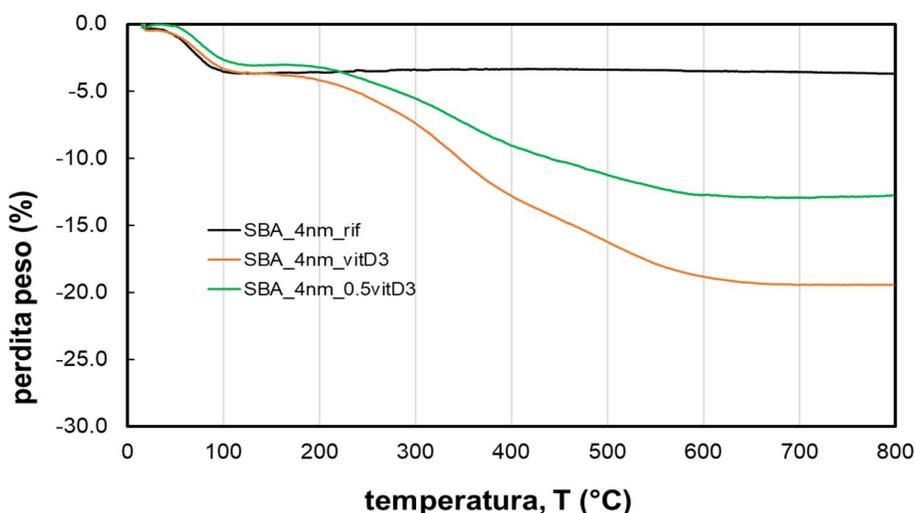


Figura 5.6: Curva TGA – Confronto tra campioni con pori da 4 nm.

La perdita di peso che si verifica da temperatura ambiente ad una temperatura di circa 100 °C è associabile alla perdita di acqua molecolare fisiorbita, ed è possibile osservare, per entrambi i grafici, che questo contributo è leggermente minore per le silici contenenti vitamina D₃. Questo risultato è coerente con l’occupazione della superficie da parte del farmaco (idrofobico) cui consegue una maggiore idrofobicità del materiale. Fa eccezione soltanto il campione caricato di SBA_8nm_0.5vitD3 (figura 5.5) che mostra un andamento differente, con una perdita di peso percentuale maggiore già a temperatura ambiente. Questa differenza potrebbe essere imputabile ad un differente stato di idratazione del sistema che, però, non può essere supportato al momento da

ulteriori dati sperimentali.

A partire da circa 120 °C la variazione di peso è considerevole, per poi essere più modesta nell'intorno dei 400 °C, fino al raggiungimento di un plateau dai 600 °C a fine prova. Questa perdita di peso è dovuta in piccola parte alla condensazione dei silanoli, contributo che viene assunto come valore costante (< 2% wt. dalle prove sui campioni di riferimento, riportate nel capitolo 5), e per la maggior parte alla degradazione della vitamina D₃.

Nelle figure 5.7-5.8 sono rappresentate le curve TGA di confronto dei campioni caricati. Da tali dati si ricava un contenuto di vitamina D₃ nei vari campioni pari a: 19,8% in SBA_8nm_vitD3, 13,3% in SBA_8nm_0.5vitD3, 15,7% in SBA_4nm_vitD3 e 9,7% in SBA_4nm_0.5vitD3. Si osserva, in entrambi i grafici, una perdita totale di peso minore nel caso dei campioni caricati con rapporto di supporto/farmaco 2:1, indice del fatto che è stata incorporata una quantità minore di vitamina D₃ in questi campioni. Inoltre, i campioni caricati con pori da 8 nm (SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3) mostrano una maggior capacità di incorporazione del farmaco rispetto ai campioni caricati con pori da 4 nm (SBA_4nm_vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3). Questa differenza può essere spiegata considerando la maggiore idrofilicità di quest'ultimi supporti (testimoniata dal quantitativo superiore di silanoli interagenti) e, potrebbe essere imputabile anche al fatto che in pori più piccoli il farmaco diffonda con maggiore difficoltà.

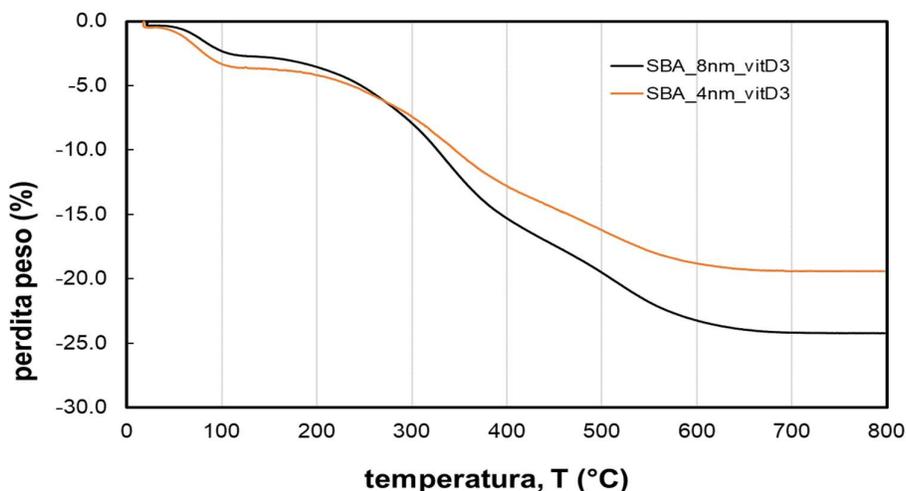


Figura 5.7: Curva TGA – Confronto su campioni caricati con quantità di supporto/farmaco in proporzione di 1:1.

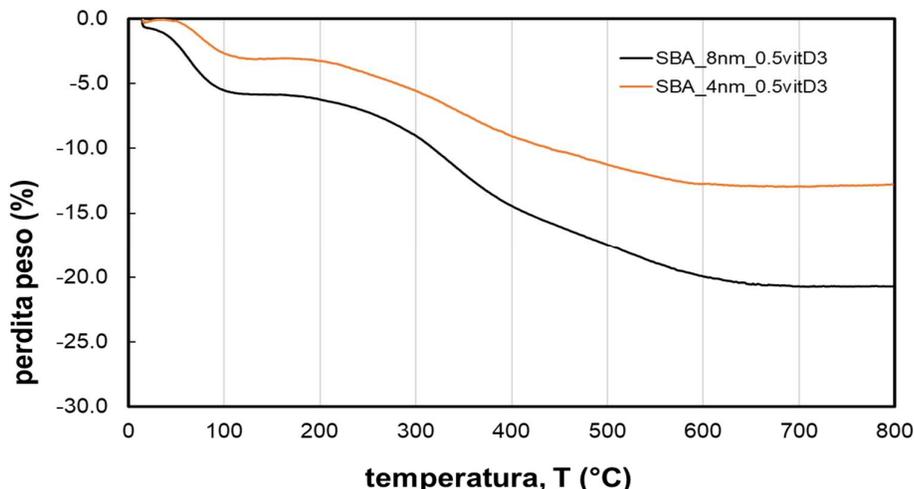


Figura 5.8: Curva TGA – Confronto su campioni caricati con quantità di supporto/farmaco in proporzione di 2:1.

Infine, in tabella 5.1 vengono riportate le perdite di peso percentuali in vari intervalli di temperatura, il contenuto percentuale di silanoli nei sei campioni e la quantità percentuale di vitamina D₃ nei campioni caricati, per permettere una più facile lettura dei grafici di questo paragrafo.

Tabella 5.1: Perdite di peso percentuali, contenuto di silanoli e di vitamina D₃ nei supporti.

Campione	% 150 °C	% 150-800 °C	% Totale	% Silanoli	% VitD ₃
SBA_8nm_rif	2,8	1,6	4,4	1,6	/
SBA_8nm_vitD3	2,8	21,4	24,2	1,6	19,8
SBA_8nm_0.5vitD3	5,8	14,9	20,7	1,6	13,3
SBA_4nm_rif	3,7	0,03	3,7	0,03	/
SBA_4nm_vitD3	3,7	15,7	19,4	0,03	15,7
SBA_4nm_0.5vitD3	3,0	9,7	12,7	0,03	9,7

In conclusione, la percentuale in massa di vitamina D₃ nei campioni caricati è significativa. Tuttavia, la quantità di farmaco è leggermente inferiore rispetto ai risultati ottenuti sugli stessi supporti con processo d'impregnazione IWI nell'ambito di un lavoro di tesi precedente [37]. Quest'ultimi, infatti, si attestano a valori di 24,8% per il campione SBA_8nm_vitD3 e 25,9% per il campione SBA_4nm_vitD3, dimostrando, quindi, una miglior efficienza della tecnica IWI sia per il contenuto di farmaco, sia per l'omogeneità dei risultati (in entrambe le silici il contenuto è paragonabile). In letteratura sono riportati anche alcuni studi su diverse tipologie di carrier non silicei impregnati con vitamina D₃, tramite adsorbimento da soluzione. In generale, in questi lavori si riscontrano valori di *loading capacity* (rapporto tra massa totale di vitamina D₃ incorporata su carrier e massa del carrier stesso) più bassi rispetto a quelli della presente tesi; in particolare, vengono riportate delle *loading capacity* pari a 7% nel caso di nanoparticelle polimeriche [16], > 1% per nanoparticelle di proteina isolata di pisello [35], > 1% per l'alginato idrofobico [60] e 3,47% per la gomma arabica [61]. Unica eccezione è quella delle microparticelle di gelatina nelle

quali la *loading capacity* risulta superiore e raggiunge un valore di circa 51% [62]. Alla luce di questi confronti, è importante rammentare che, sia la tecnica IWI che quella di adsorbimento da soluzione, utilizzano solventi organici che risultano tossici per l'uomo e l'ambiente, i quali aggiungono complessità di elaborazione e aumento di costi per le successive fasi di rimozione del solvente stesso. Quest'ultima considerazione, in aggiunta all'ottima percentuale di caricamento di vitamina D₃ ottenuta con scCO₂ come solvente, confermano i vantaggi di questa tecnica d'impregnazione e dei vettori in silice mesoporosa.

Per quanto riguarda le possibili applicazioni, i campioni caricati sembrano essere compatibili sia per somministrazione orale giornaliera di vitamina D₃ (il fabbisogno giornaliero di vitamina D₃ è circa 500 – 1000 UI, corrispondenti a 12,5 – 25 µg [63]), sia per somministrazione orale settimanale per il trattamento della psoriasi (dosi di 40.000 UI settimanali, corrispondenti a 1 mg [64]). Infatti, per il campione con il maggior contenuto di vitamina D₃ (SBA_8nm_vitD3) basterebbero solo circa 0,125 mg di materiale per l'assunzione giornaliera e circa 5 mg per quella specifica per il trattamento settimanale della psoriasi, quantità più che ammissibili per una formulazione in pastiglie. Infine, i sistemi ottenuti nel presente lavoro di tesi risultano compatibili anche con applicazioni topiche, dal momento che questa via di somministrazione richiede dosi inferiori a quelle dell'assunzione orale [65].

5.3 Spettroscopia FT-IR

Lo spettro infrarosso in figura 5.9 evidenzia le bande di assorbimento caratteristiche della vitamina D₃ pura; l'analisi è stata effettuata andando a diluire in KBr il campione (50% in peso). Si può osservare un ampio picco intorno alla lunghezza d'onda di 3300 cm⁻¹ attribuibile allo stretching del legame O-H. Lo spettro mostra gli stretching dei gruppi CH₃ e CH₂, rispettivamente a 2943 cm⁻¹ e 2875 cm⁻¹ [15]. Inoltre, si osservano tre picchi, con il principale a 1647 cm⁻¹ dovuto allo stretching C=C e bande nell'intervallo dai 1460 cm⁻¹ ai 1440 cm⁻¹ dovute ai modi di bending dei legami C-H [66].

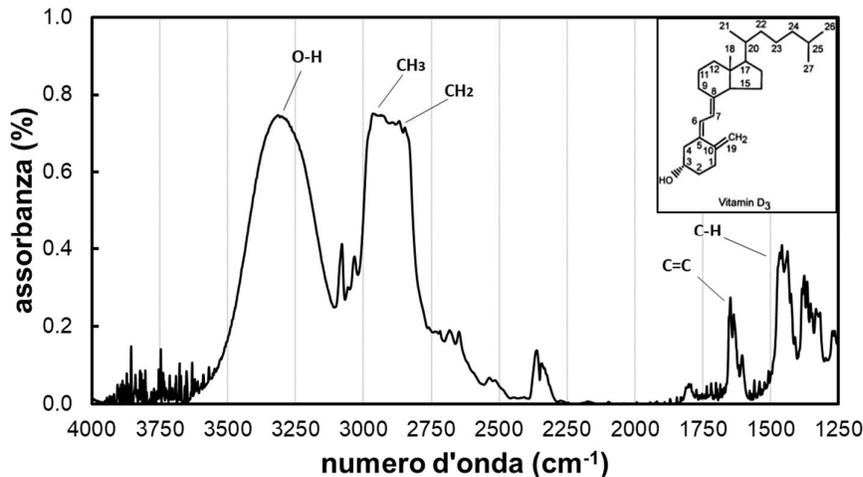


Figura 5.9: Spettro FT-IR della vitamina D₃.

Le analisi spettroscopiche FT-IR sono state effettuate sui campioni caricati per avere conferma della presenza di principio attivo e, eventualmente, delle sue interazioni con il supporto. Gli spettri ottenuti vengono posti a confronto nelle figure 5.10-5.11. In entrambi i grafici, per quanto riguarda la zona dei silanoli, i campioni di riferimento SBA_8nm_rif e SBA_4nm_rif mostrano un picco a 3745 cm^{-1} attribuibile ai silanoli isolati, picco praticamente inesistente nei campioni caricati con il principio attivo. Inoltre, in quest'ultimi si osserva un aumento evidente della banda larga tra 3600 e 3300 cm^{-1} dovuta ai silanoli interagenti per legame a idrogeno. Questo risultato è indice del fatto che la vitamina D₃ (il suo gruppo ossidrilico) interagisce con la superficie della silice attraverso la formazione di legami a idrogeno con i silanoli. Infine, l'aumento della banda tra 3600 e 3300 cm^{-1} può indicare anche una mutua interazione tra i gruppi OH della vitamina D₃.

Inoltre, negli spettri di tutti i campioni caricati è possibile osservare alcune bande caratteristiche del farmaco. La banda per valori tra 2990 e 2850 cm^{-1} è riconducibile allo stretching dei gruppi CH₃ e CH₂, mentre per quanto riguarda il doppio legame C=C si può osservare, in entrambe le curve, la presenza del picco intorno a 1647 cm^{-1} . Le bande dovute ai doppi legami C=C sono più larghe e meno definite rispetto allo spettro della vitamina D₃ in fase cristallina. Questa evidenza è in accordo con la natura non cristallina della vitamina D₃ all'interno dei pori, come mostrato dalla diffrazione di raggi X.

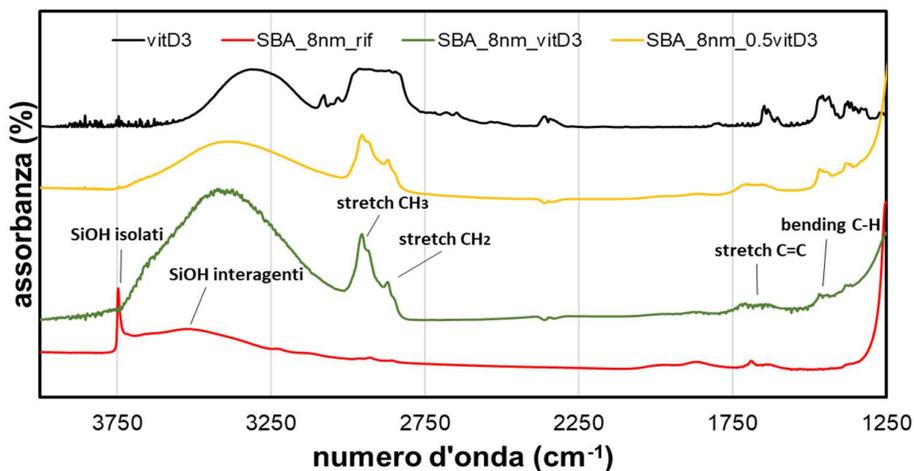


Figura 5.10: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni con pori da 8 nm.

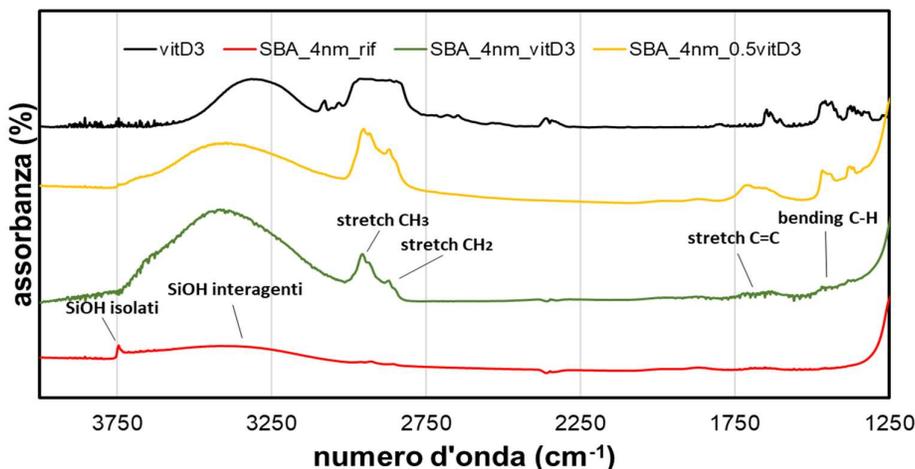


Figura 5.11: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni con pori da 4 nm.

Infine, i confronti tra i vari campioni mostrano che in tutti è stata incorporata la vitamina D₃ in forma amorfa (osservabile dal picco del C=C a 1647 cm⁻¹). Inoltre, sono presenti legami a idrogeno tra il farmaco e la superficie del carrier e, presumibilmente, anche tra più molecole di vitamina D₃. Risultati paragonabili sono stati riscontrati anche nel precedente lavoro di tesi sulle stesse silici mesoporose caricate con vitamina D₃ tramite tecnica d'impregnazione IWI [37].

5.4 Analisi adsorbimento di azoto

Nelle figure seguenti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e le distribuzioni porosimetriche dei campioni carichi con vitamina D₃. Per una più facile comprensione dei dati, le curve vengono sempre confrontate con quelle dei campioni di riferimento.

Silici SBA-15 con pori di diametro nominale di 8 nm

Il confronto tra l'isoterma del riferimento e l'isoterma dei campioni carichi SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3 è rappresentato in figura 5.12. Tutte le isoterme sono di tipo IV, tipico di materiali mesoporosi, ma le curve dei campioni carichi con il farmaco presentano dei cambiamenti importanti rispetto alla curva del riferimento. Infatti, si può osservare una modifica della forma del coppia di isteresi, il quale non presenta più una forma tipica delle curve teoriche; ciò indica come il campione sia caratterizzato da mesopori non omogenei né nella dimensione né nella forma. Ciò è imputabile al riempimento del volume poroso con vitamina D₃, come si riscontra nella drastica diminuzione del volume adsorbito (asse ordinate destro). Inoltre, la curva del campione caricato SBA_8nm_0.5vitD3 mostra valori di volume adsorbito più alti rispetto al campione SBA_8nm_vitD3, essendo quest'ultimo caricato con un quantitativo maggiore di principio attivo.

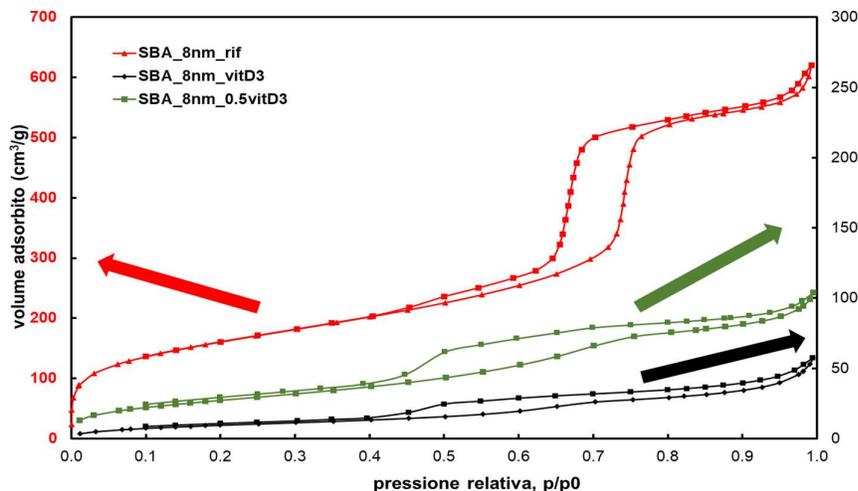


Figura 5.12: Isotherme di adsorbimento – Confronto tra SBA_8nm_rif e campioni caricati SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3.

Tramite il modello BJH è stato possibile ricavare la distribuzione dimensionale dei pori riportata in figura 5.13. Si può notare come la distribuzione dei campioni caricati sia spostata a valori più bassi di diametro dei pori rispetto a quella del riferimento. Nella tabella 5.2 sono invece riportati i valori dei parametri caratteristici ottenuti tramite modello BET e BJH.

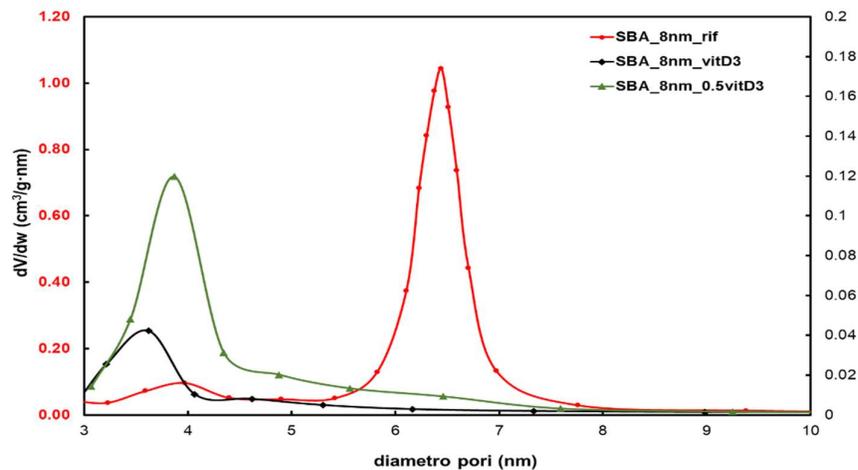


Figura 5.13: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_8nm_rif e campioni caricati SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3.

Tabella 5.2: Confronto dei parametri caratteristici tra SBA_8nm_rif e campioni caricati SBA_8nm_vitD3 e SBA_8nm_0.5vitD3.

	SBA_8nm_rif	SBA_8nm_vitD3	SBA_8nm_0.5vitD3
Area superficiale specifica	571 m ² /g	38 m ² /g	102 m ² /g
Volume dei pori	0,90 cm ³ /g	0,07 cm ³ /g	0,15 cm ³ /g
Diametro dei pori	6,4 nm	3,6 nm	3,8 nm

Osservando i dati in tabella si può notare come i valori siano cambiati considerevolmente in seguito all'adsorbimento del principio attivo. In particolare, i valori di area superficiale e volume poroso si

sono drasticamente ridotti, indice della presenza della vitamina D₃ all'interno dei pori. Questi effetti sono di entità minore per il campione SBA_8nm_0.5vitD₃ rispetto a SBA_8nm_vitD₃. Ciò è imputabile al maggior quantitativo di vitamina D₃ contenuto in quest'ultimo.

È importante sottolineare che la presenza di una nuova famiglia di pori ben definita e di dimensioni minori, tra 3 e 4 nm, è in accordo con una distribuzione delle molecole sulla superficie interna dei mesopori. È inoltre interessante notare che la variazione del diametro dei pori, compresa tra i 2 e 3 nm, è in ragionevole accordo con la stima proposta per l'ingombro sterico della molecola di vitamina D₃.

Silici SBA-15 con pori di diametro nominale di 4 nm

Il confronto tra l'isoterma del riferimento e l'isoterma dei campioni caricati con vitamina D₃ è rappresentato in figura 5.14. Le curve relative ai campioni contenenti vitamina D₃ mostrano un notevole cambiamento rispetto alla curva del campione di riferimento. Infatti, si può osservare una transizione all'isoterma di tipo II, con presenza di un coppia di isteresi di forma più vicina a quella di tipo H₃. Il coppia è attribuibile alla porosità interparticellare tra le particelle di silice e/o tra particelle di farmaco amorfo, oppure tra particelle cristalline di dimensioni così ridotte da non dare i riflessi tipici del bulk nel pattern XRD [67]. Inoltre, si nota una diminuzione del volume libero (le curve risultano traslate verso pressioni relative più basse) dovuta alla presenza del farmaco. Inoltre, la curva del campione SBA_4nm_0.5 mostra valori di volume adsorbito leggermente più bassi rispetto al campione caricato SBA_4nm_vitD₃.

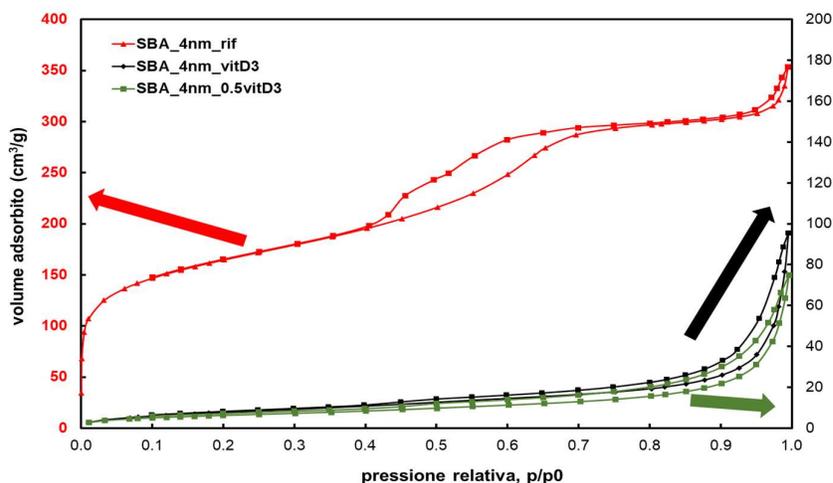


Figura 5.14: Isoterme di adsorbimento – Confronto tra SBA_4nm_rif e campioni caricati SBA_4nm_vitD₃ e SBA_4nm_0.5vitD₃.

In figura 5.15 vi è il confronto tra le distribuzioni delle dimensioni dei pori ricavate tramite il modello BJH. È ben evidente che la distribuzione relativa ai campioni caricati, per quanto larga, sia unimodale, a differenza del campione di riferimento, il quale presenta una distribuzione bimodale. Infatti, nei campioni caricati sparisce completamente la popolazione di pori di diametro di 4,4 nm. Questo può essere imputabile all'occupazione totale del volume poroso da parte delle molecole di farmaco oppure a una occlusione dei pori (*pore blocking*). L'altro picco, centrato

intorno a 3,5 nm e 3,8 nm, presenta in entrambi i campioni caricati un decremento drastico (corrispondente ad una diminuzione drastica del volume accessibile all'azoto) e una piccola variazione (dell'ordine di 0,1 – 0,2 nm) della posizione del massimo. Tale variazione, tuttavia, presenta un andamento irregolare, di difficile interpretazione: una diminuzione per SBA_4nm_vitD3 e una aumento per SBA_4nm_0.5vitD3. La drastica perdita di volume accessibile dei pori, insieme ad una trascurabile variazione del loro diametro, suggerisce anche per questa famiglia di pori un fenomeno di parziale riempimento o di occlusione (*pore blocking*) da parte delle molecole di vitamina D₃. Nella Tabella 5.3 sono riportati i valori dei parametri caratteristici ricavati tramite modello BET e BJH.

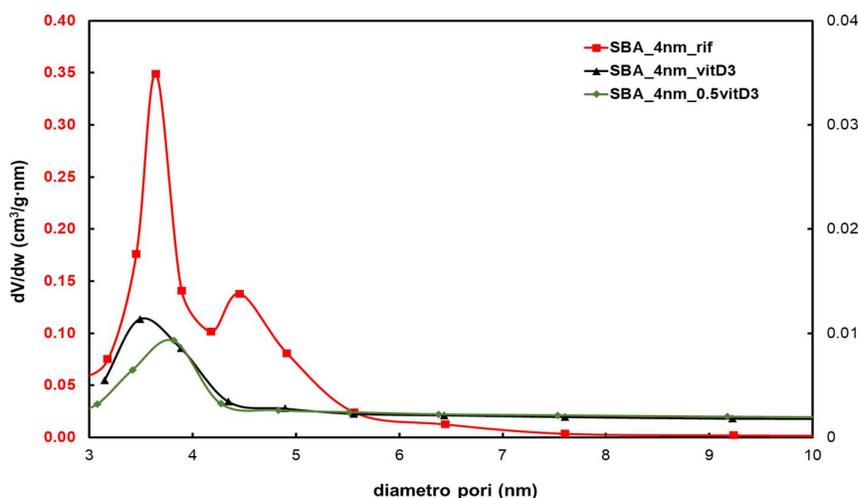


Figura 5.15: Distribuzioni porosimetriche – Confronto tra SBA_4nm_rif e campioni caricati SBA_4nm_vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3.

Tabella 5.3: Confronto dei parametri caratteristici tra SBA_4nm_rif e campioni caricati SBA_4nm_vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3.

	SBA_4nm_rif	SBA_4nm_vitD3	SBA_4nm_0.5vitD3
Area superficiale specifica	551 m ² /g	30 m ² /g	23 m ² /g
Volume dei pori	0,49 cm ³ /g	0,12 cm ³ /g	0,08 cm ³ /g
Diametro dei pori	3,6 – 4,4 nm	3,5 nm	3,8 nm

Si può osservare come i dati in tabella abbiano subito una drastica diminuzione nei campioni caricati, così come si è verificato nei campioni con pori nominali di 8 nm precedenti. Infatti, anche in questo caso vi è una considerevole diminuzione dell'area superficiale specifica e del volume poroso, imputabile anche a *pore blocking*. Inoltre, il campione SBA_4nm_0.5vitD3 ha mostrato un'ulteriore diminuzione dell'area superficiale specifica e del volume poroso, maggiore anche del campione di SBA_4nm_vitD3, imputabile ad un più efficace riempimento dei pori oppure a un *pore blocking* più esteso.

In conclusione, i risultati ottenuti dall'analisi di adsorbimento di azoto dimostrano come la vitamina D₃ sia stata incorporata in tutti i sistemi in quantità significative. La distribuzione del farmaco appare omogenea nei campioni con pori di diametro nominale pari a 8 nm, mentre si riscontrano

segni di probabile occlusione dei pori nei campioni con pori di diametro nominale pari a 4 nm. Per i campioni con pori di diametro nominale pari a 4 nm, risulta interessante, inoltre, effettuare un paragone con i risultati ottenuti nel precedente lavoro di tesi sulla medesima silice mesoporosa caricata con vitamina D₃ tramite IWI [37]. Le isoterme di adsorbimento e i parametri calcolati dei campioni impregnati in tale lavoro (denominati SBA_4_vitD3) sono riportati in figura 5.16 e in tabella 5.4, dove vengono confrontati con il campione di riferimento (denominato SBA_4 e corrispondente a SBA_4nm_rif della presente tesi). Nel caso di impregnazione tramite IWI, la curva relativa al campione impregnato SBA_4_vitD3 resta sempre un'isoterma di tipo IV, anche se con una diminuzione del volume libero, dovuta alla presenza del farmaco, e una variazione della forma del cappio di isteresi, indice di una transizione da una porosità ordinata ad una meno definita a seguito dell'incorporazione di vitamina D₃ [37]. Ciò, insieme al valore dell'area superficiale specifica significativamente maggiore nel campione caricato con tecnica IWI (tabella 5.4), è imputabile ad una distribuzione più omogenea ed efficace del farmaco all'interno delle porosità. Quest'ultima considerazione è coerente anche con la maggiore percentuale in massa di vitamina D₃, ottenuta con analisi TGA mostrata nel paragrafo 5.2, contenuta nei campioni impregnati con tecnica IWI (25,9% per SBA_4_vitD3). L'evidenza di una maggiore quantità di farmaco ospitata nella SBA-15 con pori di 4 nm tramite IWI, a fronte del mantenimento della mesoporosità, conferma che il fenomeno osservato per adsorbimento tramite scCO₂ è, almeno in parte, occlusione dei mesopori (*pore blocking*). In conclusione, quindi, almeno per quanto riguarda i campioni con pori di diametro nominale pari a 4 nm, la tecnica IWI sembra preferibile, in quanto riduce il fenomeno del *pore blocking* e permette un *drug loading* più elevato. L'adsorbimento tramite scCO₂ resta comunque una valida alternativa per i campioni con pori di diametro nominale pari a 8 nm e, più in generale, per eventuali applicazioni per le quali è sufficiente una quantità di farmaco inferiore, ma è di primaria importanza l'assenza di eventuali residui di solventi nel materiale.

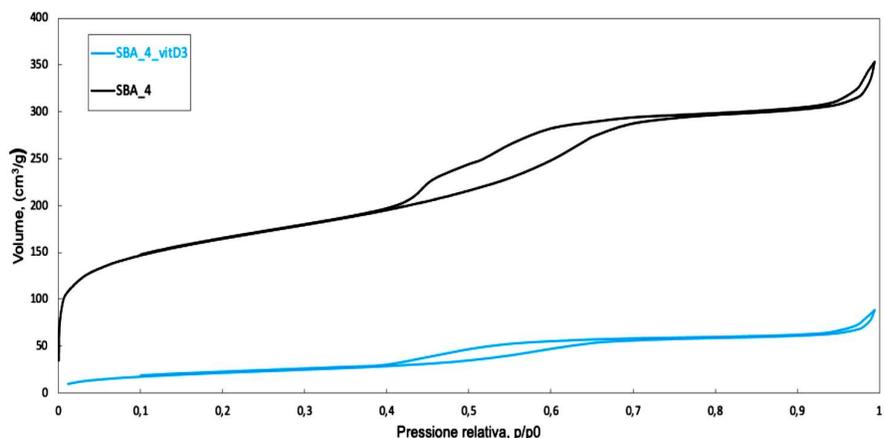


Figura 5.16: Isoterme di adsorbimento – Confronto tra SBA_4 e SBA_4_vitD3 (tecnica IWI) [37].

Tabella 5.4: Confronto dei parametri superficiali tra SBA_4 e SBA_4_vitD3 (tecnica IWI) [37].

	SBA_4	SBA_4_vitD3
Area superficiale specifica	551 m ² /g	81 m ² /g
Volume dei pori	0,49 cm ³ /g	0,11 cm ³ /g
Diametro dei pori	3,6 nm	3,5 nm



Capitolo 6 – Estrazione della vitamina D₃

Come ultima fase dell'attività sperimentale si è scelto di effettuare uno studio sull'estrazione della vitamina D₃ dai sistemi preparati. I test di estrazione sono mirati a confermare la quantità di principio attivo nei campioni. L'estrazione sfrutta l'elevata solubilità della vitamina D₃ nell'etanolo con l'obiettivo di estrarre tutto il quantitativo di principio attivo dal campione.

6.1 Retta di taratura

Prima di eseguire il test di estrazione è necessario costruire una retta di taratura in modo da poter mettere in relazione il valore dell'assorbimento UV/Vis della soluzione utilizzata con concentrazioni note del farmaco. Di seguito viene elencato il procedimento:

1. Prima di tutto, occorre preparare una soluzione madre di vitamina D₃ nel solvente scelto per l'estrazione, ovvero etanolo. La concentrazione della soluzione deve essere sufficientemente elevata, restando però nel limite di solubilità del farmaco, e viene espressa in ppm (parti per milione) secondo l'equazione:

$$[vitamina D_3] = \frac{mg_{vitamina D_3}}{kg_{soluzione}}$$

2. Vengono preparate delle soluzioni figlie prelevando delle aliquote dalla soluzione madre e successivamente diluendole per portarle al volume desiderato. In questo modo si ottengono diverse soluzioni figlie, ognuna delle quali a concentrazione nota. I mL di soluzione madre da prelevare sono stati calcolati tramite la seguente equazione:

$$V_{madre} = \frac{[vitamina D_3]_{figlia} \cdot V_{figlia}}{[vitamina D_3]_{madre}}$$



3. Per ogni soluzione figlia sono state eseguite tre analisi spettroscopiche UV/Vis. Di queste tre misurazioni viene fatta una media dei valori di assorbanza ad una specifica lunghezza d'onda al fine di ottenere le assorbanze necessarie per la realizzazione della retta di taratura (assorbanza in funzione della concentrazione).
4. Infine, utilizzando un foglio di calcolo elettronico, i punti ottenuti vengono regrediti linearmente imponendo l'intercetta nulla. Per valutare la qualità della regressione occorre prestare attenzione al quadrato del coefficiente di correlazione.

Nella pratica sperimentale, vengono disciolti 5 mg di vitamina D₃ in 10 g di etanolo, ottenendo una soluzione madre con concentrazione pari a 499,57 ppm. Successivamente, vengono realizzate le soluzioni figlie, riportate nella tabella 6.1, e la retta di taratura ottenuta a $\lambda = 265$ nm (corrispondente al picco di assorbanza della vitamina D₃ in etanolo [66]), mostrata in figura 6.1.

Tabella 6.1: Taratura della vitamina D₃ in etanolo.

Peso madre (g)	Peso soluzione (g)	[figlia] _{desiderata} (ppm)	[figlia] _{reale} (ppm)
0,1024	50,0047	1	1,02
0,1036	25,0058	2	2,07
0,2547	25,0103	5	5,09
0,5031	25,0040	10	10,05
1,0062	25,0113	20	20,10
0,7552	12,5025	30	30,18

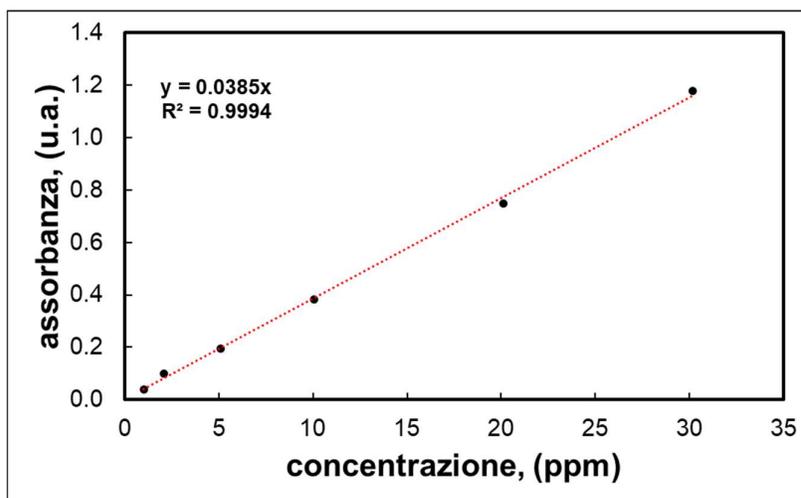


Figura 6.1: Retta di taratura – Vitamina D₃ in etanolo.

6.2 Prove di estrazione in etanolo

Per svolgere il test è stato utilizzato lo spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer, la cui modalità di utilizzo viene descritta nel paragrafo 3.4.5. Una determinata quantità di materiale e di etanolo



vengono mescolati; ad intervalli regolari di tempo, viene prelevata una quota della soluzione così ottenuta e su di essa viene effettuata un'analisi spettroscopica impostata alla lunghezza d'onda di maggior assorbimento della vitamina D₃ in etanolo, ovvero $\lambda = 265$ nm. Ogni misura è ripetuta tre volte.

In totale sono state effettuate quattro prove di estrazione, una per ogni campione caricato. Dettagli sperimentali e risultati sono illustrati nei seguenti paragrafi.

Prove di estrazione in etanolo campioni con rapporto supporto/farmaco 1:1

Sono stati dispersi 3,4 mg del campione SBA_8nm_vitD3 in 30,0103 g di etanolo e 4,4 mg del campione SBA_4nm_vitD3 in 30,0012 g di etanolo. Ad ogni intervallo di tempo prefissato sono stati prelevati, tramite una siringa, alcuni mL di soluzione etanolo/polvere, successivamente processati in tre analisi spettroscopiche UV/Vis. Dopo il prelievo effettuato a 24 ore, la soluzione viene passata agli ultrasuoni in modo tale che le polveri disperse di SBA-15 caricate rilascino tutto il farmaco; viene quindi effettuata una nuova analisi spettroscopica sulle soluzioni estratte (sol_8nm_vitD3_24h+US e sol_4nm_vitD3_24h+US).

La prima considerazione che occorre fare è che lo spettro UV/Vis, ottenuto dopo l'estrazione di entrambi i campioni, è significativamente diverso dallo spettro UV/Vis della vitamina D₃ in etanolo della retta di taratura (figura 6.2). Quest'ultimo presenta bande, una alla lunghezza d'onda di 212 nm e una, più intensa, a 265 nm ed è coerente con quanto riportato in letteratura [66].

Nello spettro UV/Vis dell'estratto, invece, sono visibili sempre due bande, ma spostate a lunghezze d'onda inferiori e con drastici cambiamenti di intensità. Questo risultato può essere giustificato con l'effettiva degradazione del farmaco. Questa ipotesi, che giustificherebbe sia la variazione di lunghezza d'onda che il cambiamento di intensità delle bande, implicherebbe una degradazione del principio attivo o nel sistema o durante il test di estrazione. Fenomeni di degradazione, infatti, sono stati osservati anche nel corso del precedente lavoro di tesi sulla medesima silice mesoporosa caricata con vitamina D₃ tramite IWI [37]. Per confermare tale ipotesi sono necessarie delle ulteriori analisi. Purtroppo, a causa della variazione dello spettro UV/Vis dell'estratto non è stato possibile utilizzare la retta di taratura della vitamina D₃ in etanolo per quantificare il farmaco presente nei campioni caricati.

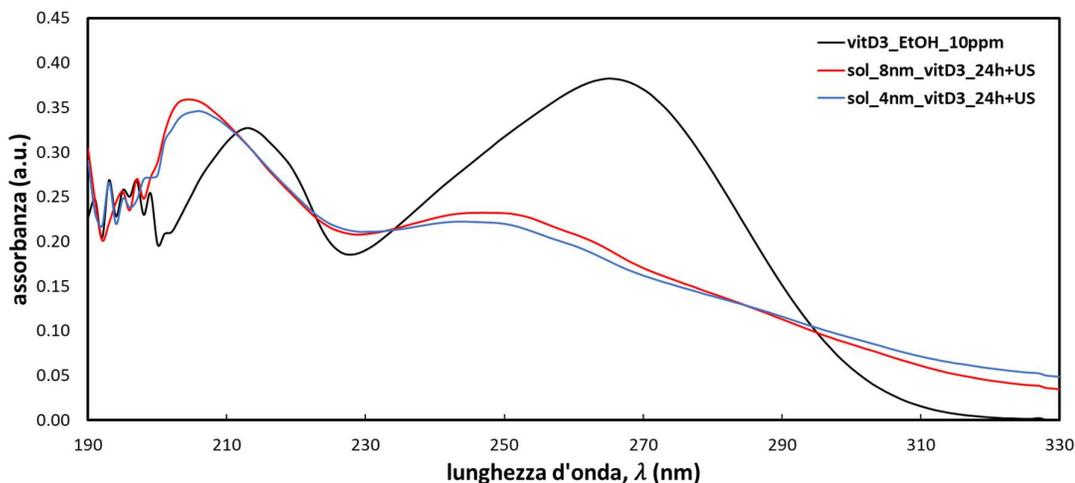


Figura 6.2: Spettro UV/Vis – Confronto tra le soluzioni estratte e la soluzione figlia da 10 ppm.

Prove di estrazione in etanolo campioni con rapporto supporto/farmaco 2:1

Sono stati dispersi 10,3 mg del campione SBA_8nm_0.5vitD3 in 50,0091 g di etanolo e 13 mg del campione SBA_4nm_0.5vitD3 in 50,0067 g di etanolo. Sui campioni è stato effettuato lo stesso procedimento utilizzato per i campioni con rapporto di supporto/farmaco 1:1.

In figura 6.4 si osserva che lo spettro UV/Vis degli estratti sono analoghi a quelli dei campioni precedenti, quindi valgono le stesse considerazioni.

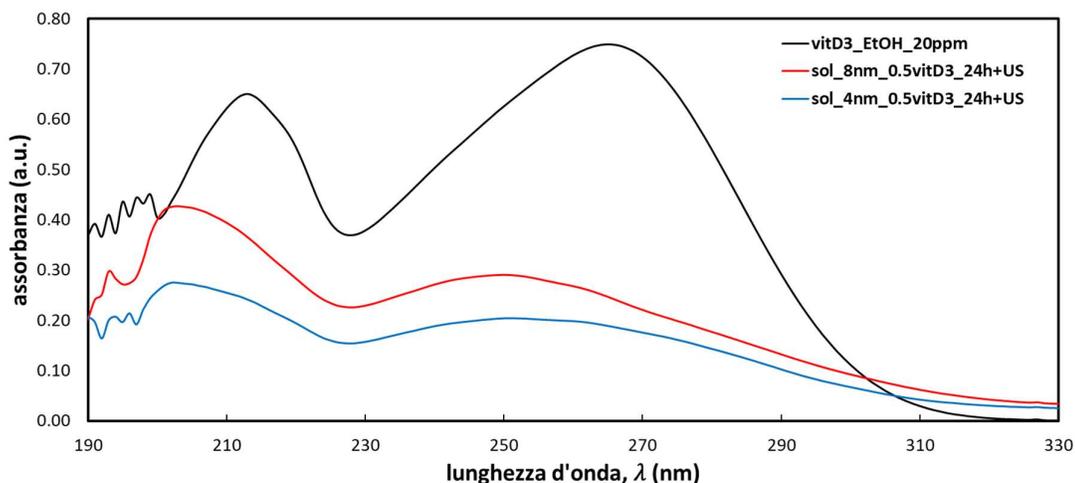


Figura 6.3: Spettro UV/Vis – Confronto tra le soluzioni estratte e la soluzione figlia da 20 ppm.

In conclusione, non è stato possibile fornire una motivazione certa sulle modifiche degli spettri UV/Vis delle soluzioni estratte (osservata sia sui campioni con rapporto supporto/farmaco 1:1 che 2:1). Di conseguenza, sui campioni con rapporto di supporto/farmaco di 2:1 sono state eseguite delle analisi supplementari. In particolare, sono state effettuate delle analisi FT-IR sui materiali a 48 giorni dall'adsorbimento di vitamina D₃, sia sui supporti caricati tal quali che sui supporti filtrati

dopo estrazione in etanolo. Queste analisi sono state effettuate per verificare se fossero ancora presenti i picchi caratteristici della vitamina D₃ o se mostrassero eventuali modifiche.

Gli spettri ottenuti, rappresentati nelle figure 6.6-6.7, vengono confrontati con quelli ottenuti sui campioni subito dopo l'impregnazione (SBA_8nm_0.5vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3). È evidente che dopo 48 giorni dall'adsorbimento la molecola di farmaco (o una molecola affine) sia ancora presente all'interno della silice, ma si nota una variazione di forma e di intensità della banda intorno a 1650 cm⁻¹ dovuta allo stretching del legame C=C (campioni SBA_8nm_0.5vitD3_48gg e SBA_4nm_0.5vitD3_48gg). Questi cambiamenti sarebbero coerenti con la degradazione della vitamina D₃ che interessa il cromoforo a cui corrisponde l'assorbimento più intenso della molecola (a 265 nm). Ciò è in accordo con l'evidenza, ottenuta tramite analisi UV/Vis precedente, di uno shift ed una diminuzione dell'intensità degli spettri UV/Vis dei campioni sottoposti ad estrazione in etanolo.

Infine, negli spettri FT-IR ottenuti sui campioni dopo l'estrazione in etanolo i picchi riconducibili alla vitamina D₃ sono difficilmente distinguibili e appaiono di intensità drasticamente ridotta (campioni SBA_8nm_0.5vitD3_postEtOH e SBA_4nm_0.5vitD3_postEtOH). Questo risultato conferma che il principio attivo è stato efficacemente estratto durante il test.

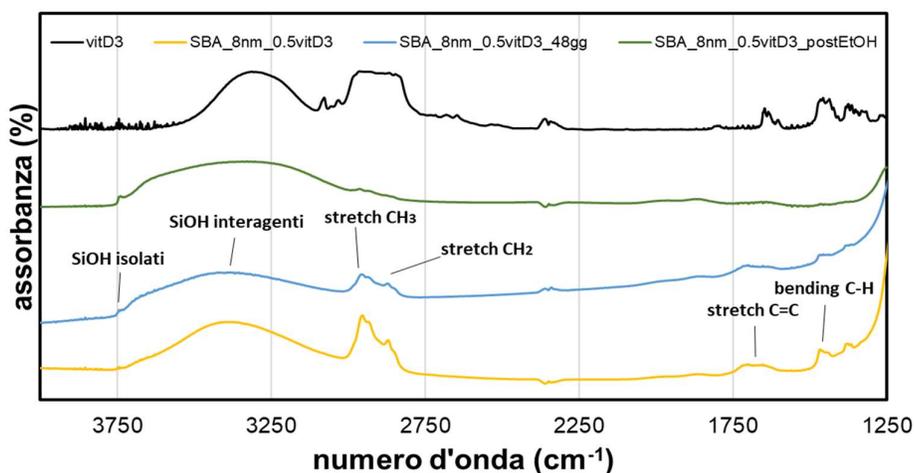


Figura 6.4: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni caricati con pori da 8 nm.

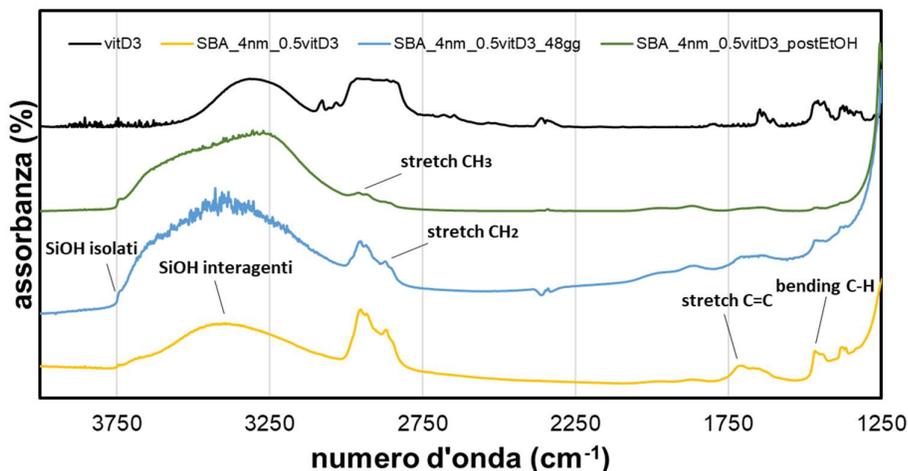


Figura 6.5: Spettro FT-IR – Confronto tra campioni caricati con pori da 4 nm.

In conclusione, l'analisi spettroscopica FT-IR sui campioni caricati, in combinazione con gli spettri UV/Vis delle soluzioni estratte, hanno confermato che la vitamina D₃ subisce un processo degradativo. Secondo gli studi di Grady et al. [68], la vitamina D₃ è molto labile in ambienti con presenza d'ossigeno e valori di umidità relativa elevati, già a partire dalla temperatura di 25 °C. Le analisi hanno riscontrato una degradazione percentuale di circa 11% dopo 56 giorni (RH = 85%, T = 25 °C), mentre alla temperatura di 40 °C la degradazione percentuale è stata di circa il 20% dopo solo 16 h, del 50% dopo 3 giorni e quasi totale (circa 97%) dopo 21 giorni [68]. Inoltre, Temova et al. [69] hanno determinato i possibili prodotti di degradazione mediante tecnica *High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection* (HPLC-UV), stabilendo che la vitamina D₃ viene convertita in vari isomeri: pre-vitamina D₃ per azione del calore (test a 25 e 60 °C per 24 h), trans-vitamina D₃ e lumisterolo D₃ in seguito ad esposizione prolungata alla luce [69]. Alla luce di questi dati, si può ipotizzare che le condizioni operative d'impregnazione ed il metodo di conservazione dei campioni caricati con vitamina D₃ adottati nel presente lavoro di tesi possano aver inficiato l'integrità del principio attivo.

Infine, si può presumere che neanche il confinamento all'interno delle mesoporosità dei supporti di silice sia sufficiente a preservare il principio attivo dai fenomeni di degradazione (dovuti a luce e umidità) ai quali questo è normalmente soggetto. Purtroppo, in letteratura mancano esempi di studi di degradazione della vitamina D₃ in carrier silicei e non, quindi non è possibile effettuare un confronto per confermare o meno le ipotesi avanzate nella presente tesi.



Capitolo 7 – Conclusioni e sviluppi futuri

Nel presente lavoro di tesi sono stati studiati dei sistemi per il rilascio di vitamina D₃ basati su silici a mesoporosità ordinata. Sono state utilizzate due silici commerciali, le SBA-15, con diametri nominali dei pori differenti, rispettivamente di 8 nm e 4 nm.

Dopo un'analisi bibliografica sulla vitamina D₃ e i sistemi per somministrarla, è stata effettuata la prima parte di lavoro sperimentale dedicata all'adsorbimento della vitamina D₃ sui due campioni tramite CO₂ supercritica come solvente. Infatti, ad ora, sono scarsi gli studi di silici contenenti vitamina D₃ e del tutto assenti lavori che sfruttino la CO₂ supercritica come solvente per adsorbire questo principio attivo su dei carrier.

Nella seconda parte del lavoro è stata eseguita la caratterizzazione chimico-fisica dei campioni caricati, i quali sono stati confrontati con i campioni di riferimento (supporti tal quali) per valutare gli effetti dell'incorporazione del farmaco.

I dati ottenuti tramite diffrazione a raggi X indicano lo stato amorfo della vitamina D₃ in entrambi i campioni. Nei sistemi di rilascio è preferibile la forma amorfa per principi attivi scarsamente solubili in acqua, come la vitamina D₃. La forma amorfa, infatti, essendo metastabile, ha il vantaggio di migliorarne la solubilità.

Dall'analisi termogravimetrica è risultato un elevato contenuto del principio attivo: il contenuto in massa percentuale del farmaco è pari a 19,8% in SBA_8nm_vitD3, 13,3% in SBA_8nm_0.5vitD3, 15,7% in SBA_4nm_vitD3 e 9,7% in SBA_4nm_0.5vitD3. Inoltre, si osserva un quantitativo di farmaco maggiormente adsorbito nella tipologia di silice con pori di dimensione maggiore.

La spettroscopia FT-IR ha confermato la presenza di molecole di vitamina D₃ all'interno dei campioni e la loro interazione con la superficie della silice attraverso legami idrogeno con i silanoli. Inoltre, gli spettri dei campioni caricati sono coerenti con i dati XRD che rivelano lo stato amorfo del farmaco.

I risultati derivanti dall'analisi di adsorbimento di azoto riportano, per entrambi i campioni di silice, una diminuzione sostanziale dell'area superficiale specifica e del volume poroso a seguito dell'adsorbimento delle molecole. La distribuzione del farmaco appare omogenea nei campioni con pori di diametro nominale pari a 8 nm, mentre si ha un fenomeno di *pore blocking* nei campioni con pori di diametro nominale pari a 4 nm. Sulla base dei dati di assorbimento di azoto, il campione



SBA_8nm_0.5vitD3 risulta essere preferibile, dal momento che presenta un'area superficiale specifica e un volume poroso accessibili relativamente significativi (non c'è occlusione totale) e la quantità di farmaco incorporato è più del 50% rispetto al campione SBA_8nm_vitD3.

La fase finale del lavoro sperimentale è stata dedicata allo studio dell'estrazione di vitamina D₃ dalle silici mesostrutturate. Il test d'estrazione è stato condotto in etanolo, sfruttando l'elevata solubilità della vitamina D₃ in questo solvente. I dati derivanti dall'estrazione mostrano uno spettro UV/Vis che non può essere confrontato con lo spettro della molecola in etanolo della retta di taratura, in quanto sono significativamente diversi. Questo discostamento può essere dovuto alla possibile degradazione della vitamina D₃ che va ad alterare in modo particolare il cromoforo a 265 nm, in cui si ha l'assorbimento più intenso.

Per indagare maggiormente su questo punto si è eseguita una spettroscopia FT-IR dei campioni SBA_8nm_0.5vitD3 e SBA_4nm_0.5vitD3 dopo 48 giorni dall'adsorbimento del farmaco, e sui medesimi campioni filtrati dopo l'estrazione in etanolo. L'analisi ha mostrato che il farmaco è ancora presente all'interno del materiale, in minima percentuale nel caso dei campioni filtrati, ma ha subito una parziale modificazione dei legami C=C, coerente con ciò che si osserva dallo spettro UV/Vis. Anche questo è imputabile ad un probabile processo degradativo.

In conclusione, la silice mesoporosa con diametro nominale dei pori di 8 nm è preferibile in quanto garantisce un quantitativo di farmaco adsorbito maggiore, una sua migliore distribuzione all'interno dei pori e una minore occlusione dei pori. Inoltre, la vitamina D₃ è presente all'interno di tutti i sistemi, ma subisce un processo degradativo, dovuto probabilmente alle condizioni operative d'impregnazione e/o al metodo di conservazione dei campioni caricati con vitamina D₃. Infine, è plausibile che anche il confinamento all'interno delle mesoporosità dei supporti di silice non sia sufficiente a preservare il principio attivo dai fenomeni di degradazione (dovuti a luce e umidità) ai quali questo è normalmente soggetto.

Per approfondire l'indagine di questo fenomeno e superare questi problemi è possibile sviluppare lo studio verso:

- l'analisi di condizioni operative più adeguate (temperatura, pressione e tempo), facendo riferimento sia allo studio di solubilità della vitamina D₃ in scCO₂ [45], sia alle analisi di degradazione della vitamina stessa [68][69]. In particolare, sarebbe opportuno eseguire una prova di impregnazione a temperature inferiori (inferiore a 40 °C);
- l'ottimizzazione delle condizioni di conservazione dei campioni impregnati, facendo particolare attenzione a preservarli dalla luce e, soprattutto, dall'umidità, in quanto questi fattori sono particolarmente deleteri per la stabilità della vitamina D₃ [68];
- l'utilizzo di supporti in silice mesoporosa di diversa tipologia, con diverse proprietà di superficie (quali popolazione silanolica e idrofilicità) o carrier del tutto diversi (ad esempio polimerici), dal momento che analoghi fenomeni di degradazione sono stati riscontrati anche nel precedente lavoro di tesi sulla medesima silice mesoporosa caricata con vitamina D₃, ma con tecnica d'impregnazione IWI [37].



Bibliografia

- [1] Tom D. Thacher, Bart L. Clarke Vitamin D Insufficiency, Mayo Clinic Proceedings, Volume 86, Issue 1, 2011, Pages 50-60, ISSN 0025-6196, <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0567>.
- [2] Ramezanli, Tannaz, Kilfoyle, Brian E., Zhang, Zheng, Michniak-Kohn, Bozena B., Polymeric Nanospheres for Topical Delivery of Vitamin D₃, International Journal of Pharmaceutics, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.072>.
- [3] H. F. DeLuca, "Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.," Am. J. Clin. Nutr., vol. 80, no. 6 Suppl, pp. 1689–1696, 2004, doi: 10.1093/ajcn/80.6.1689s.
- [4] S. F. and T. G., Biochimica medica: strutturale metabolica e funzionale, 1st ed. 1992.
- [5] Novak and A. W. Potts, "Electronic structure of vitamins D₂ and D₃," Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg., vol. 1319, no. 1, pp. 86–90, 1997, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00118-1.
- [6] Institute of Medicine, IOM, 1997.
- [7] C. F., Fisiologia medica, S. l. 2005.
- [8] <http://www.pacinimedica.it/wp-content/uploads/39550-PSORIASI.-Ruolo-della-vitamina-D.pdf>.
- [9] Maleki M, Nahidi Y, Azizahari S, et al. Serum 25-OH Vitamin D Level in Psoriatic Patients and Comparison with Control Subjects. J Cutan Med Surg. 2015 Dec 9. pii: 1203475415622207.
- [10] Ricceri F, Pescitelli L, Tripo L, et al. Deficiency of serum concentration of 25-hydroxyvitamin D correlates with severity of disease in chronic plaque psoriasis. J Am Acad Dermatol 2013;68:511-2.
- [11] Orgaz-Molina J, Buendía-Eisman A, Arrabal-Polo MA, et al. Deficiency of serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in psoriatic patients: a case-control study. J Am Acad Dermatol 2012;67:931-8.
- [12] K. Park, "Controlled drug delivery systems: Past forward and future back," J. Control. Release, vol. 190, pp. 3–8, 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.054.
- [13] Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu, and V. S. Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers," Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 60, no. 11, pp. 1278–1288, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.03.012.
- [14] Vallet-Regí, M., Balas, F. and Arcos, D. (2007), Mesoporous Materials for Drug Delivery. Angewandte Chemie International Edition, 46: 7548-7558. <https://doi.org/10.1002/anie.200604488>.
- [15] Ignjatović, Nenad; Uskoković, Vuk; Ajduković, Zorica; Uskoković, Dragan (2013). Multifunctional hydroxyapatite and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol. Materials Science and Engineering: C, 33(2), 943–950. doi:10.1016/j.msec.2012.11.026.
- [16] Lalloz, Augustine; Bolzinger, Marie-Alexandrine; Faivre, Jimmy; Latreille, Pierre-Luc; Garcia Ac, Araceli; Rakotovo, Cyrielle; Rabanel, Jean-Michel; Hildgen, Patrice; Banquy, Xavier; Briançon,



- Stéphanie (2018). Effect of Surface Chemistry of Polymeric Nanoparticles on Cutaneous Penetration of Cholecalciferol. *International Journal of Pharmaceutics*, S0378517318307051–. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.09.046.
- [17] Vora, Lalit K.; Vavia, Pradeep R.; Larrañeta, Eneko; Bell, Steven E.J.; Donnelly, Ryan F. (2018). Novel nanosuspension-based dissolving microneedle arrays for transdermal delivery of a hydrophobic drug. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*, 3(2), 89–101. doi:10.1002/jin2.41.
- [18] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, and D. J. McClements, “Nanoemulsion delivery systems for oil soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D₃ bioaccessibility,” *Food Chem.*, vol. 187, pp. 499–506, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.065.
- [19] M. Haham et al., “Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles,” *Food Funct.*, vol. 3, no. 7, pp. 737–744, 2012, doi: 10.1039/c2fo10249h.
- [20] Sumathra, Murugan; Munusamy, Murugan A.; Alarfaj, Abdulla A.; Rajan, Mariappan (2018). Osteoblast response to Vitamin D₃ loaded cellulose enriched hydroxyapatite Mesoporous silica nanoparticles composite. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103(), 858–868. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.078.
- [21] Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res.* 2002 Dec;89(3):251-61. doi: 10.1385/bter:89:3:251. PMID: 12462748.
- [22] T. Itoh, K. Yano, Y. Inada, and Y. Fukushima, “Photostabilized chlorophyll a in mesoporous silica: Adsorption properties and photoreduction activity of chlorophyll a,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 45, pp. 13437–13441, 2002.
- [23] V. S. Y. Lin, C. Y. Lai, J. Huang, S. A. Song, and S. Xu, “Molecular recognition inside of multifunctionalized mesoporous silicas: Toward selective fluorescence detection of dopamine and glucosamine [8],” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 46, pp. 11510–11511, 2001.
- [24] J. Florek, R. Caillard, and F. Kleitz, “Evaluation of mesoporous silica nanoparticles for oral drug delivery-current status and perspective of MSNs drug carriers,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 40, pp. 15252–15277, 2017, doi: 10.1039/c7nr05762h.
- [25] P. Ariano et al., “Interaction of spherical silica nanoparticles with neuronal cells: Size-dependent toxicity and perturbation of calcium homeostasis,” *Small*, vol. 7, no. 6, pp. 766–774, 2011, doi: 10.1002/smll.201002287.
- [26] 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, doi:10.1016/j.supflu.2017.03.005.
- [27] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, and S. Garg, “Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–49, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030118.



- [28] Z. A. Alothman, “A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials,” *Materials* (Basel), vol. 5, no. 12, pp. 2874–2902, 2012, doi: 10.3390/ma5122874.
- [29] Zienkiewicz-Strzałka, Malgorzata & Pikus, Stanislaw & Deryło-Marczewska, Anna & Błachnio, Magdalena. (2015). NOBLE METAL NANOPARTICLES IN MESOPOROUS ORDERED SILICA SYSTEMS. 10.13140/RG.2.2.33747.37921.
- [30] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, “Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 Angstrom pores”, *Science*, 279 (1998), 548-552.
- [31] https://www.enea.it/it/Ricerca_sviluppo/documenti/ricerca-di-sistema-elettrico/carbone-pulito-e-ccs/2011/176-rds-pdf.
- [32] 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, doi:10.1016/j.supflu.2017.03.005.
- [33] Z. Li, Y. Zhang, and N. Feng, “Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 16, no. 3, pp. 219–237, 2019, doi: 10.1080/17425247.2019.1575806.
- [34] Dott. Gignone A., “Ordered Mesoporous Silica for Drug Delivery in Topical Applications,” Politecnico di Torino, 2016.
- [35] Jiang, Shanshan; Yildiz, Gulcin; Ding, Junzhou; Andrade, Juan; Rababah, Taha M.; Almajwal, Ali; Abulmeaty, Mahmoud M.; Feng, Hao (2019). Pea Protein Nanoemulsion and Nanocomplex as Carriers for Protection of Cholecalciferol (Vitamin D₃). *Food and Bioprocess Technology*, doi:10.1007/s11947-019-02276-0.
- [36] Dadkhodazade, Elahe; Mohammadi, Abdorreza; Shojaee-Aliabadi, Saeedeh; Mortazavian, Amir Mohammad; Mirmoghtadaie, Leila; Hosseini, Seyede Marzieh (2018). Yeast Cell Microcapsules as a Novel Carrier for Cholecalciferol Encapsulation: Development, Characterization and Release Properties. *Food Biophysics*, -. doi:10.1007/s11483-018-9546-3.
- [37] Palestini G., tesi di laurea magistrale su “Silici nanoporose come carrier di vitamina D₃”, relatore prof.ssa Barbara Onida, correlatori Prof.ssa Silvia Maria Ronchetti e Dott.ssa Marta Gallo, Politecnico di Torino, 2020.
- [38] S. Kawi and M. W. Lai, “Supercritical fluid extraction of surfactant template from MCM-41,” *Chem. Commun.*, no. 13, pp. 1407–1408, 1998, doi: 10.1039/a802907e.
- [39] https://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_dioxide, “Carbon_dioxide_p-T_phase_diagram.”.
- [40] Z. Huang, L. Xu, J. H. Li, S. Kawi, and A. H. Goh, “Organic template removal from hexagonal mesoporous silica by means of methanol-enhanced CO₂ extraction: Effect of temperature, pressure and flow rate,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 77, no. 1, pp. 112–119, 2011, doi: 10.1016/j.seppur.2010.11.029.



- [41] 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, doi: 10.1016/j.supflu.2017.03.005.
- [42] Prof.ssa Vitale Brovarone, “Dispense lezioni”, Politecnico di Torino 2020.
- [43] M. Champeau, J. M. Thomassin, T. Tassaing, and C. Jérôme, “Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review,” *J. Control. Release*, vol. 209, pp. 248–259, 2015.
- [44] R. K. Kankala, Y. S. Zhang, S. Bin Wang, C. H. Lee, and A. Z. Chen, “Supercritical Fluid Technology: An Emphasis on Drug Delivery and Related Biomedical Applications,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 16, 2017.
- [45] Monika Johannsen and Gerd Brunner, “Solubilities of the Fat-Soluble Vitamins A, D, E, and K in Supercritical Carbon Dioxide”, *Journal of Chemical & Engineering Data* 1997 42 (1), 106-111 DOI: 10.1021/je960219m.
- [46] 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, doi: 10.1016/j.micromeso.2014.05.031.
- [47] Bitto M., tesi di laurea magistrale su “Silice a mesoporosità ordinata come carrier di curcumina”, relatore prof.ssa Barbara Onida, correlatori Prof. Luigi Manna e Dott.ssa Marta Gallo, Politecnico di Torino, 2020.
- [48] Banchemo M, Mohamed SSY, Leone F, Lopez F, Ronchetti S, Manna L, Onida B. Supercritical Solvent Impregnation of Different Drugs in Mesoporous Nanostructured ZnO. *Pharmaceutics*. 2019; 11(7):340. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070340>.
- [49] M. Banchemo, L. Manna, S. Ronchetti, P. Campanelli, and A. Ferri, “Supercritical solvent impregnation of piroxicam on PVP at various polymer molecular weights,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 49, no. 2, pp. 271–278, 2009, doi: 10.1016/j.supflu.2009.01.008.
- [50] Prof.ssa Federica Bondioli, “Dispense lezioni”, Politecnico di Torino, 2020.
- [51] “Bragg’s Law of Diffraction.” <https://www.microscopy.ethz.ch/bragg.htm>.
- [52] <http://www.ipac.regione.fvg.it/userfiles/file/gorassini.pdf>.
- [53] “Spettroscopia FT-IR.pdf.”, <http://webusers.fis.uniroma3.it/iucci/gio/FTIR.pdf>.
- [54] <https://people.unica.it/flaminiacesaremarincola/files/2011/12/Lez2-ChimFisBiol-UV-vis-ParteI.pdf>.
- [55] “SlidePlayer. [Online].” <https://slideplayer.it/slide/10794993/>.
- [56] M. Thommes et al., “Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 87, no. 9–10, pp. 1051–1069, 2015, doi: 10.1515/pac-2014-1117.
- [57] Serpella L., tesi di laurea magistrale su “Silice mesoporosa come carrier di piroxicam”, relatore



prof.ssa Barbara Onida, correlatori Prof.ssa Silvia Maria Ronchetti e Dott.ssa Federica Leone, Politecnico di Torino, 2017.

- [58] F. Xia, H. Jin, Y. Zhao, and X. Guo, “Supercritical antisolvent-based technology for preparation of vitamin D₃ proliposome and its characteristics,” *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 19, no. 6, pp. 1039-1046, 2011, doi: 10.1016/S1004-9541(11)60089-X.
- [59] Alice Branton, Snehasis Jana, A Study on the Effect of the Energy of Consciousness Healing Treatment on Physicochemical and Thermal Properties of Vitamin D₃ (Cholecalciferol), *Science Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 5, No. 4, 2017, pp. 46-55. doi: 10.11648/j.sjac.20170504.11.
- [60] Li, Qian; Liu, Chen-Guang; Huang, Zhen-Hua; Xue, Fang-Fang (2011). “Preparation and Characterization of Nanoparticles Based on Hydrophobic Alginate Derivative as Carriers for Sustained Release of Vitamin D”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1962–1967. doi:10.1021/jf1020347.
- [61] Lamsen, Mary Ross L.; Wang, Tiannan; D'Souza, Doris; Dia, Vermont; Chen, Guoxun; Zhong, Qixin (2020). “Encapsulation of vitamin D in gum arabic to enhance bioavailability and stability for beverage applications”. *Journal of Food Science*, (), 1750-3841.15340–. doi:10.1111/1750-3841.15340.
- [62] Jannasari, Nafiseh; Fathi, Milad; Moshtaghian, Seyed Jamal; Abbaspourrad, Alireza (2019). Microencapsulation of vitamin D using gelatin and cress seed mucilage: Production, characterization and in vivo study. *International Journal of Biological Macromolecules*, (), S0141813018365802–. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.096.
- [63] <https://www.humanitas.it/enciclopedia/vitamine/vitamina-d/>.
- [64] <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04036188>.
- [65] Araujo, Oscar E.; Flowers, Franklin P.; Brown, KimDebra (1991). Vitamin D Therapy in Psoriasis. *DICP*, 25(7-8), 835–839. doi:10.1177/106002809102500720.
- [66] Mahendra Kumar Trivedi and Snehasis Jana. Physicochemical, Thermal, and Spectroscopic Characterization of the Consciousness Energy Healing Treated Cholecalciferol. *J Nutri Diet Probiotics* 2019, 2(1): 180016.
- [67] [M. Thommes et al., “Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 87, no. 9–10, pp. 1051–1069, 2015, doi: 10.1515/pac-2014-1117.
- [68] Grady, L. T., & Thakker, K. D. (1980). Stability of Solid Drugs: Degradation of Ergocalciferol (Vitamin D₂) and Cholecalciferol (Vitamin D₃) at High Humidities and Elevated Temperatures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(9), 1099–1102. doi:10.1002/jps.2600690932.
- [69] Žane Temova, Robert Roškar, Stability-Indicating HPLC–UV Method for Vitamin D₃ Determination in Solutions, Nutritional Supplements and Pharmaceuticals, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 54, Issue 7, 1 August 2016, Pages 1180–1186, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw048>.



Ringraziamenti

A conclusione di questo lavoro di tesi, è doveroso porre i miei più sentiti ringraziamenti alle 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.

In, particolare, un ringraziamento sentito per la guida competente e solerte va alla Prof.ssa Barbara Onida. La mia stima in lei è dovuta, oltre che alla sua profonda esperienza e conoscenza, ai preziosi consigli che assumono un valore inestimabile considerando il particolare periodo che tutti stiamo vivendo. Seppur a distanza, i suoi incoraggiamenti sono stati fondamentali per compiere gli ultimi e decisivi passi.

Vorrei poi ringraziare la Dott.ssa Marta Gallo, la quale è stata sempre disponibile a dirimere i miei dubbi durante questi mesi di lavoro e a guidarmi nella stesura di questa tesi. Ricorderò sempre l'eccezionale determinazione e meticolosità, che ha saputo trasmettermi, la simpatia e la pazienza nel risolvere ogni mio problema. In questi mesi gli insegnamenti da lei ricevuti sono stati un fattore importante per la mia crescita.

Desidero ringraziare anche tutti i miei nuovi amici che ho conosciuto in questo percorso magistrale: Romina Arena, Andrea Tiano, Carla Malinverni, Diego Orifici, Elona Gjopalaj, Erika Lannunziata, Marta Ceroni, Nicola Ripoli, Paolo Ledonne, Simone Sturiale e Tonino Alessi. Grazie a loro la mia esperienza nella città di Torino è stata inestimabile.

Ringrazio anche Giorgio Mollo, Vincenzo Alfieri, Emanuele D'Elia e Antonio Gallo, con i quali, oltre a vivere insieme le vicende universitarie, ho passato momenti di ordinaria follia e indescrivibile gioia.

Ringrazio anche la mia fidanzata Maria Di Matteo, per la costante forza che ha saputo darmi in ogni situazione difficile, soprattutto in quella che stiamo affrontando tutti, l'immutato affetto e vicinanza, anche a 1000 km di distanza.

Infine, ringrazio i miei genitori e la mia famiglia, perché questo mio traguardo raggiunto è un premio anche per loro. Un infinito grazie per l'affetto, il sostegno e la pazienza. Grazie per i consigli e critiche che mi hanno fatto crescere. Grazie per il vostro amore.