

**POLITECNICO DI TORINO**

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

**Silice mesoporosa come carrier di  
Piroxicam**



**Relatori**

Prof.ssa Barbara Onida  
Prof.ssa Silvia Ronchetti  
Federica Leone

**Candidato**

Luca Serpella

Dicembre 2017

# *Indice*

1	Introduzione .....	1
2	Tecniche di incorporazione e supporti utilizzati .....	3
2.1	Adsorbimento da soluzione .....	3
2.2	Incipient wetness impregnation .....	3
2.3	CO <sub>2</sub> supercritica.....	3
2.4	Supporti .....	5
3	Tecniche di caratterizzazione.....	9
3.1	Diffrazione a raggi X .....	9
3.2	Analisi di adsorbimento di azoto .....	9
3.3	Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier .....	9
3.4	Microscopia elettronica a scansione .....	9
3.5	Analisi termogravimetrica .....	10
3.6	Spettroscopia Ultravioletto-Visibile .....	10
4	Caratterizzazione dei supporti.....	11
4.1	Grace GMP .....	11
4.1.1	Caratterizzazione .....	11
4.2	SBA-15 .....	15
4.2.1	Caratterizzazione .....	15
4.3	Confronto tra i supporti .....	19
5	Impregnazione del Piroxicam .....	23
5.1	Piroxicam.....	23
5.2	Incorporazione del Piroxicam con CO <sub>2</sub> supercritica .....	26
5.3	Caratterizzazione .....	27
5.3.1	Grace GMP.....	27
5.3.2	SBA-15.....	34
5.4	Adsorbimento da etanolo .....	41
5.4.1	Caratterizzazione .....	44
5.5	Incipient wetness impregnation .....	54
5.5.1	Caratterizzazione .....	55
6	Confronti .....	65
6.1	Grace GMP .....	65

6.2	SBA-15 .....	70
6.3	CO <sub>2</sub> supercritica.....	75
6.4	Drug loading tramite CO <sub>2</sub> supercritica - 2 a 1 .....	79
7	Rilascio del farmaco .....	81
8	Conclusioni e sviluppi futuri.....	87
9	Bibliografia .....	89
10	Ringraziamenti .....	91



# 1 Introduzione

Le silici mesoporose sono state utilizzate, da molti anni, in diverse impieghi. Inizialmente lo studio è stato incentrato sulla funzionalizzazione e l'utilizzo di essa per varie applicazioni, quali separazione di fluidi [1], catalisi e sensoristica [2]. Silici di questo tipo sono caratterizzate da proprietà molto interessanti, quali elevata area superficiale (superiore ai 700 m<sup>2</sup>/g), elevato volume dei pori (maggiore di 0,9 cm<sup>3</sup>/g), la distribuzione porosimetrica variabile tra i 2 e i 30 nm circa. Più in generale, l'ossido di silicio è dotato di inerzia chimica e termica, grande vantaggio per il suo utilizzo in applicazioni biomediche quali biovetri, somministrazione di farmaci e il loro rilascio [3][4][5].

Il seguente elaborato di tesi si rivolge proprio allo studio, alla caratterizzazione e alla realizzazione di un sistema di delivery orale di farmaci. Solitamente, applicazioni di questo tipo sfruttano matrici polimeriche che permettono il rilascio tramite diffusione della molecola biologicamente attiva. Di norma, il farmaco viene caricato tramite compressione diretta, granulazione a umido o miscela meccanica con la matrice [6]. La principale problematica di un sistema di questo tipo è legata all'eterogeneità dei campioni, a causa di un mancato ottenimento omogeneo nella distribuzione del farmaco nella matrice, la quale quindi può generare problemi nel rilascio tra i diversi materiali. Ecco che, dunque, l'attenzione deve ricadere sulla necessità del controllo della porosità e della mesostruttura, al fine di ottimizzare la diffusione e la cinetica del rilascio del farmaco [4].

A proposito di quest'ultimo punto, la mesoporosità delle silici e la diffusione delle molecole incorporate può essere controllata attuando determinate condizioni di sintesi, quali templante, solvente, temperatura e agitazione e, nondimeno, il modo in cui il farmaco viene caricato.

Applicazioni per il rilascio di farmaci sono presenti in dermatologia, dove vengono utilizzati cerotti transdermici, composti da strati di polipropilene e altri polimeri nei quali viene inglobato il farmaco o principi attivi che vengono rilasciati per diffusione: in questo caso si avrà un'azione topica da parte del medicamento, a seguito dell'attraversamento della barriera cutanea [7].

Tornando all'argomento principale di quest'elaborato, i materiali di base utilizzati come veicolo della molecola biologicamente attiva sono due silici mesoporose con diametro dei pori simile di circa 8 nm, ma diversa morfologia: una gode di struttura ordinata, forma allungata e dotata di una porosità cilindrica interna a queste particelle, determinata dal templante utilizzato; l'altra, Grace GMP, non è caratterizzata da un ordine dei pori, i quali vengono definiti come spazio tra le particelle. Questa differenza viene presa in considerazione come parametro di riferimento discriminante nell'incorporazione e nel rilascio del farmaco stesso.

Va evidenziata inoltre, con particolare enfasi, la differenza in termini di bagnabilità delle due silici in relazione ai gruppi presenti sulla superficie. La presenza di una quantità maggiore di gruppi silanolicci isolati o interagenti può essere presa in considerazione per valutare l'idrofilicità e l'idrofobicità della superficie. Questo parametro può essere sfruttato, in prima approssimazione, per la valutazione dell'interazione tra i gruppi superficiali e il farmaco, in quanto una maggiore incorporazione di quest'ultimo rende la silice più idrofoba. Viene in aiuto nella valutazione di questo rapporto tra silanoli isolati e interagenti la spettroscopia

infrarossa, la quale gioca un ruolo importante nell'interpretazione del *drug loading*. Ulteriori differenze verranno descritte nel quarto capitolo.

Obiettivo principe di questo lavoro è quindi individuare se la diversa struttura mesoporosa del carrier abbia qualche influenza sulla quantità di piroxicam incorporato e sul tipo di rilascio dello stesso. In particolare, per entrambi i materiali, l'attenzione è stata rivolta all'amorfezzazione del farmaco, in quanto la struttura non cristallina gioca un ruolo importante nella cinetica di rilascio del medicamento, come verrà ribadito e spiegato nei successivi capitoli. Questa condizione risulta essere ottimale, in quanto comporta una maggiore solubilità di queste sostanze idrofobiche rispetto al materiale cristallino e la maggiore velocità di dissoluzione, aumentando quindi la biodisponibilità del farmaco poco solubile in sostanze acquose.

Il processo di incorporazione su cui è stata posta l'attenzione è stato tramite l'utilizzo di CO<sub>2</sub> supercritica, metodo relativamente recente, green, rapido e vantaggioso in termini della non necessità di smaltire le soluzioni utilizzate per l'impregnazione. Risulta essere, quindi, una valida alternativa per la solubilizzazione del piroxicam, il quale ha una bassissima solubilità nei solventi organici.

Al fine di poter sottolineare che la CO<sub>2</sub> supercritica sia un valido sostituto ai tradizionali metodi di incorporazione di farmaci, si è scelto di comparare questo processo innovativo ai classici sistemi di adsorbimento da soluzione (nel caso in esame etanolo) e *incipient wetness recipient*. Il confronto tra i tre metodi succitati viene riportato nel sesto capitolo.

In ultimo, a completezza del lavoro, sono stati realizzati dei rilasci in soluzione gastrica simulata, al fine di poter valutare la differente cinetica del rilascio.

## 2 Tecniche di incorporazione e supporti utilizzati

Come primo approccio risulta conveniente descrivere le tre tecniche di incorporazione del farmaco utilizzate, due classiche (da umido) e una innovativa, ovvero l'utilizzo di biossido di carbonio. Tutte le tecniche sono state utilizzate per entrambe le silici, nelle stesse modalità e quantità.

### 2.1 *Adsorbimento da soluzione*

Questa prima tecnica di incorporazione classica consiste nell'utilizzare un solvente nel quale viene disciolto il farmaco e porre l'intera soluzione a contatto con il materiale di base sotto agitazione [8]. Nello specifico, 160 mg di piroxicam sono stati disciolti in 50 ml di etanolo e posti all'interno di un palloncino contenente 1 grammo di silice (l'esperimento è stato condotto per entrambi i supporti, in modo separato). Il processo avviene a temperatura ambiente per 48 ore. In seguito, la soluzione è stata filtrata ed essiccata a 40°C. Il surnatante è stato poi analizzato tramite spettroscopia UV-visibile al fine di calcolare la quantità di farmaco incorporata nella silice. La caratterizzazione si trova al il paragrafo 5.4.

### 2.2 *Incipient wetness impregnation*

La seconda tecnica utilizzata è in qualche modo simile alla prima, ma diversa in "posologia". Il farmaco è stato disciolto in etanolo con un ben preciso rapporto, in modo da fornire alla silice, di volta in volta, 1,8 mg di farmaco all'interno di 1,2 ml di etanolo, mantenendo il tutto sotto agitazione. Una volta evaporato il solvente si è proceduto a rimpinguare la stessa quantità.

A tal proposito, si deve sottolineare come sia stato scelto di utilizzare un quantitativo di farmaco quanto più possibile simile a quello incorporato tramite CO<sub>2</sub> supercritica, al fine di poter fare un confronto qualitativo fra i due metodi di *drug loading*.

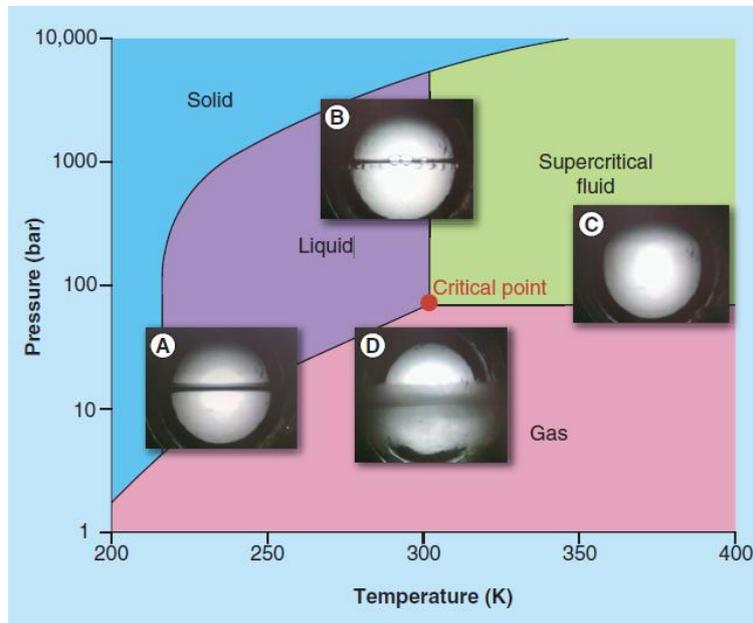
Alla fine del processo, tirando le somme, il quantitativo di farmaco a contatto con la silice risulta essere pari a 156 mg.

### 2.3 *CO<sub>2</sub> supercritica*

Lo sviluppo di nuovi prodotti farmaceutici e terapie portano alla necessità di un rilascio efficace dei prodotti ai pazienti. Questi farmaci o molecole biologiche possono essere caratterizzati da bassa solubilità, stabilità, o richiederne la somministrazione frequente, quindi richiedono un rilascio ottimizzato. I fluidi supercritici, quali la CO<sub>2</sub>, possono essere utilizzati per incapsulare molecole biologiche attive, aumentarne la solubilità o garantire un rilascio sostenuto.

Nell'industria farmaceutica questa nuova tecnologia di *drug loading* sta prendendo sempre più piede: l'utilizzo di fluidi supercritici, i quali mostrano proprietà in parte simili a quelle di un liquido (potere solvente o bassa tensione superficiale) e in parte simili a quelle di un gas

(quali proprietà di trasporto). Ciò si verifica quando si è in condizioni di temperatura e pressione superiore al valore critico. La maggior parte dei processi farmaceutici utilizzano come fluido supercritico il diossido di carbonio ( $\text{CO}_2$ ): esso è un gas inodore, incolore, non tossico, non infiammabile e, soprattutto, riciclabile. Questo presenta un punto critico estremamente basso (temperatura critica pari a  $31,4^\circ\text{C}$  e pressione critica pari a 74 bar) [9].



**Figura 2.1 - Diagramma di fase della  $\text{CO}_2$**

Al di sopra di questo punto critico la  $\text{CO}_2$  è nella fase supercritica e si presenta come un mezzo omogeneo, con proprietà intermedie fra stato gassoso e stato liquido. Risulta possibile indurre una transizione liquido-gas senza generare un sistema bifasico, nelle condizioni vicine a quelle supercritiche.

Si avranno quindi proprietà quali alta densità e diffusività, bassa viscosità e tensione superficiale, proprietà solventi di molecole non polari (quindi vantaggioso per i farmaci).

In base a queste caratteristiche, la  $\text{CO}_2$  supercritica può:

- diffondere facilmente nella matrice solida e nel reticolo cristallino, grazie alla sua bassa tensione superficiale, e fungere da plasticizzante;
- comportarsi come un solvente non polare, grazie alla densità simile a quella di un fluido e alle capacità solventi;
- subire variazioni significative di densità grazie a minime modificazioni della pressione e della temperatura;
- facilitare la trasmissione del calore e la dissipazione tramite rapida espansione.

Dal momento che i processi farmaceutici stanno diventando estremamente importanti, la competizione globale in questo settore si sta focalizzando, oltre che sull'aspetto economico, anche sull'impatto ambientale. Proprio per questo motivo, l'utilizzo di fluidi supercritici sta assumendo sempre più visibilità, in quanto le loro proprietà rendono il processo di incorporazione ecofriendly e rispettoso verso l'ambiente [10][11].

Questa tecnica è stata utilizzata per l'incorporazione di farmaci che sono fondamentalmente poco solubili in soluzioni acquose, quali clotrimazolo [12]. Più in generale, questo fluido supercritico è una potente tecnica per la purificazione di prodotti farmaceutici contenenti solventi residui [13].

Ulteriori considerazioni delle condizioni utilizzate nello specifico di quella tesi si trovano nel paragrafo 5.2.

## 2.4 Supporti

I materiali mesoporosi hanno l'abilità di aumentare le proprietà dissolutive e la cinetica di rilascio di farmaci poco solubili, rispetto al loro equivalente cristallino, rendendo possibile l'amorfizzazione del farmaco. Da diversi anni, le silici mesoporose sono state sfruttate per l'incorporazione e la *delivery* di farmaci. Studi a riguardo sono stati effettuati per il rilascio di ibuprofene da parte di silici MCM-41 [4], simile all'SBA-15 in morfologia, e da parte di quest'ultima sfruttando la funzionalizzazione tramite ammine [14] per il rilascio sostenuto di ibuprofene [15], citalopram [16] e carbamazepina [17]. Sempre a proposito dell'MCM-41 è stato condotto uno studio sul miglioramento della dissoluzione del piroxicam [18], dove il drug loading è stato effettuato a temperatura ambiente, utilizzando una soluzione di piroxicam in una miscela di acetonitrile e diclorometano (che non può essere utilizzato da solo in quanto estremamente volatile), il quale aumenta considerevolmente la concentrazione del piroxicam nella soluzione da caricare.

Ulteriori studi sono stati condotti per valutare l'influenza della funzionalizzazione di questo supporto e il rilascio controllato di azatioprina e relative proprietà citotossiche [19]. Si aggiunge inoltre l'utilizzo di questi carrier per l'incorporazione di farmaci anticancro, quali doxorubicina [20], dimostrando che questi materiali possono fornire valide soluzioni alle sfide odierne della nanomedicina.

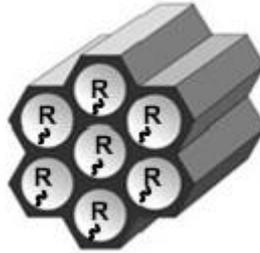
A proposito dell'SBA-15, materiale a mesoporosità ordinata, va sicuramente citato uno dei capisaldi della sintesi di questo supporto, redatto da Zhao et al [21] il quale, nel 1998, ha condotto uno studio sull'influenza del template e della temperatura sulla mesofase, diametro dei pori, superficie e volume dei pori della silice. Tra questi, è stata sintetizzata quella che è nota come SBA-15, dotata di disposizione periodica e ordine mesoscopico dei pori a simmetria 2-d esagonale ( $p6mm$ ), utilizzando il Pluronic P123 ( $EO_{20}PO_{70}EO_{20}$ ), un copolimero a blocchi, come template.

A tutto ciò si aggiunge una ricerca sull'effetto di una migliore solubilità del farmaco nell'intestino se viene sfruttata la silice come carrier [22]. In più, la silice mesoporosa sotto forma di nanoparticelle ha dato buoni risultati riguardo l'ottimizzazione delle caratteristiche di biocompatibilità con cellule in vitro e una migliorata permeabilità della membrana cellulare [23].

Le due silici utilizzate per il seguente lavoro sono, come detto, diverse nella morfologia:

- **SBA-15:** questa silice ( $SiO_2$ ) mesoporosa ha una struttura molto regolare, formata da pori cilindrici arrangiati secondo un ordine esagonale. Possiede una distribuzione porosimetrica molto stretta e un diametro compreso tra i 5 e i 15 nm (nel caso in

esame si attesta nell'intorno di 7,6 nm). La lunghezza dei pori varia tra 200 nm a diversi micron. Attorno ad ogni mesoporo è presente un network microporoso, il quale interconnette le varie porosità ed è responsabile dell'elevata area superficiale dell'SBA-15.

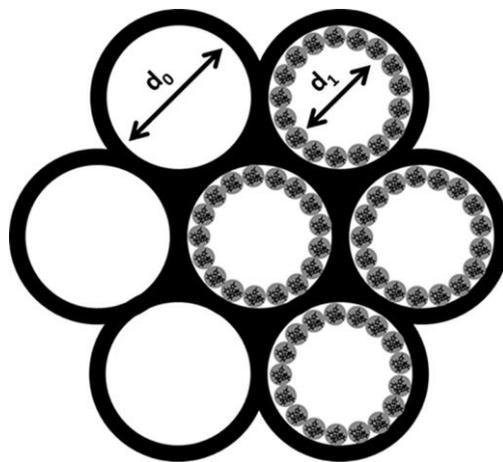


**Figura 2.2 - Schematizzazione di una particella allungata di SBA-15**

Essa possiede una simmetria esagonale ben definita, con parete dei pori spessa, la quale conferisce stabilità e resistenza meccanica. Più i pori sono piccoli, più viene ridotta la velocità di rilascio e, all'interno di questi, si andrà a posizionare il piroxicam, a seguito del *drug loading*.

Le caratteristiche della superficie di questo materiale sono molto interessanti: molti dei silanoli presenti sull'SBA-15 sono isolati e il loro contenuto dipende dal modo in cui viene rimosso il template utilizzato nella sintesi tramite trattamenti successivi.

Chiaramente, la presenza di questi gruppi silanoli in superficie favorisce l'adsorbimento di molecole.



**Figura 2.3 - Schematizzazione della disposizione delle molecole di farmaco adsorbite all'interno dei pori**

In figura 2.3 [12] si trova la schematizzazione dell'adsorbimento del farmaco (riprodotto come delle sferette) all'interno delle porosità dell'SBA-15. Si verifica quella che è la riduzione del diametro medio dei pori;

- **Grace GMP:** in questo caso, la porosità non si trova all'interno del materiale, ma all'esterno. Come confermato dalle immagini FESEM, paragrafo 4.1, questo supporto è formato da aggregati di forma sferica, di dimensione nell'ordine dei nanometri. La

porosità viene determinata quindi dallo spazio fra le particelle e, di conseguenza, questo carrier non possiede una regolarità dei mesopori, il che viene evidenziato dalla mancanza di un pattern di diffrazione nell'analisi XRD.

Come conseguenza, il farmaco andrà a depositarsi all'interno di queste porosità, senza essere in qualche modo limitato nella diffusione verso l'esterno.



### **3 Tecniche di caratterizzazione**

Nel seguente capitolo vengono elencate e descritte le tecniche di caratterizzazione utilizzate nella parte sperimentale di questa tesi.

#### ***3.1 Diffrazione a raggi X***

La diffrazione a raggi X è stata utilizzata per determinare lo stato fisico del farmaco nel supporto. È stato utilizzato un diffrattometro Philips X'Pert-MPD e diversi portacampioni fissi sui quali è stata depositata la polvere, con un movimento simultaneo della sorgente di raggi X e il detector sotto certi angoli specifici. I bassi angoli sono serviti per valutare se l'incorporazione abbia modificato la struttura del carrier, mentre gli alti angoli hanno permesso di valutare l'eventuale avvenuta amorfizzazione del farmaco.

#### ***3.2 Analisi di adsorbimento di azoto***

Sono state condotte delle prove di adsorbimento di azoto a 77K, al fine di avere un riscontro quantitativo dei valori di area superficiale, volume totale e diametro medio delle due materiali mesostrutturati. È stato utilizzato un Quantachrome Autosorb1: inizialmente è stato avviato un degasamento a 70°C per due ore, seguito dall'analisi vera e propria.

Conoscendo i parametri di interazione molecolari (gas-solido, gas-liquido, gas-gas), i quali variano in relazione al materiale sondato, si può conoscere la quantità di fase adsorbita. Questi vengono poi messi in relazione, tramite modello BET (Brunauer–Emmett–Teller) e modello DFT Montecarlo (Density Functional Theory), a valori numerici dei dati sopracitati.

#### ***3.3 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier***

Per poter valutare le interazioni chimiche del farmaco con la silice è stata effettuata un'analisi di spettroscopia infrarossa, utilizzando compresse di silice “tal quale”, impregnata tramite i tre metodi di questo lavoro e su compresse di piroxicam con l'aggiunta di bromuro di potassio (KBr). L'analisi è stata condotta effettuando due spettri dello stesso campione, intervallati da un degasamento di un'ora a  $10^{-3}$  mbar, in modo tale da poter avere un riscontro sull'interazione tra carrier e farmaco, evitando il più possibile influenza di umidità e fattori ambientali.

#### ***3.4 Microscopia elettronica a scansione***

La morfologia delle due silici commerciali è stata valutata mediante analisi di microscopia ottica FESEM, Field Emission - Scanning Electron Microscopy (FESEM) con uno strumento Supra 25 associato ad una sonda Energy Dispersive Spectroscopy INCA X-Sight. Per l'incorporazione tramite CO<sub>2</sub> supercritica è stata condotta, con lo stesso strumento, un'analisi EDS, Energy Dispersive X-ray Spectrometry, sfruttando l'emissione di raggi X generati da un

fascio elettronico accelerato incidente sul campione. In questo modo è stato possibile individuare la presenza del piroxicam sul supporto.

### ***3.5 Analisi termogravimetrica***

L'analisi termogravimetrica è stata utilizzata per avere una misura approssimativa del contenuto di farmaco introdotto nel supporto. Le curve vengono normalizzate in base al peso per poter confrontare le varie analisi. Le misure hanno previsto l'utilizzo di un piccolo crogiolo di allumina, all'interno del quale è stato inserito il campione, utilizzando una rampa di riscaldamento di 10°C/min in flusso di aria.

### ***3.6 Spettroscopia Ultravioletto-Visibile***

Quest'analisi è stata condotta utilizzando uno spettrofotometro Cary 500 Scan UV-Vis, con un campo di lunghezze d'onda pari a 190-400  $\text{cm}^{-1}$ . Sono state utilizzate delle cuvette da 5 mm all'interno delle quali è stato posto il fluido da analizzare. Tramite quest'analisi è stata costruita una retta di taratura per poter valutare il contenuto di piroxicam incorporato tramite adsorbimento da soluzione e la quantità di farmaco liberata dal carrier nelle prove di rilascio.

## 4 Caratterizzazione dei supporti

Nel capitolo seguente verranno presentate le caratterizzazioni delle due diverse silici utilizzate.

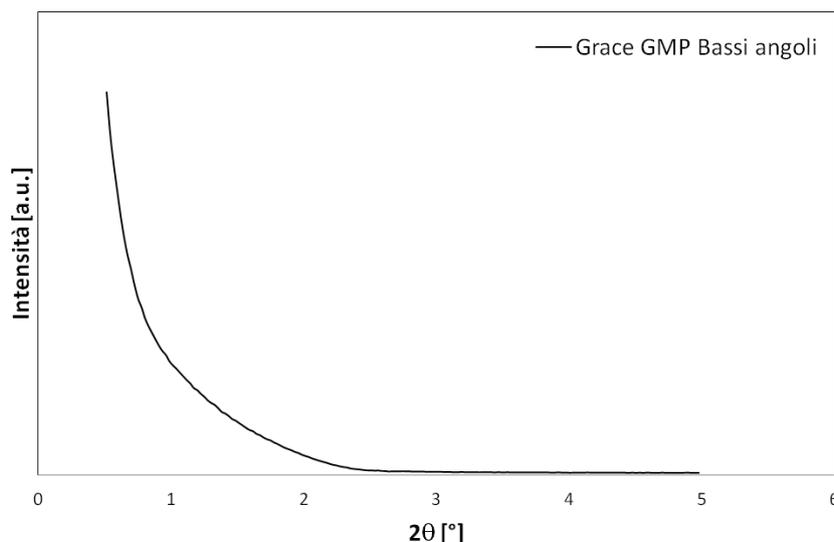
### 4.1 *Grace GMP*

#### 4.1.1 Caratterizzazione

La caratterizzazione del campione è stata eseguita con differenti tecniche: diffrattometria a raggi X, analisi di adsorbimento di azoto, analisi termogravimetrica, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier e microscopia elettronica a scansione.

- Diffrattometria a raggi X

Lo spettro XRD della Grace commerciale è riportata nella figura sottostante.

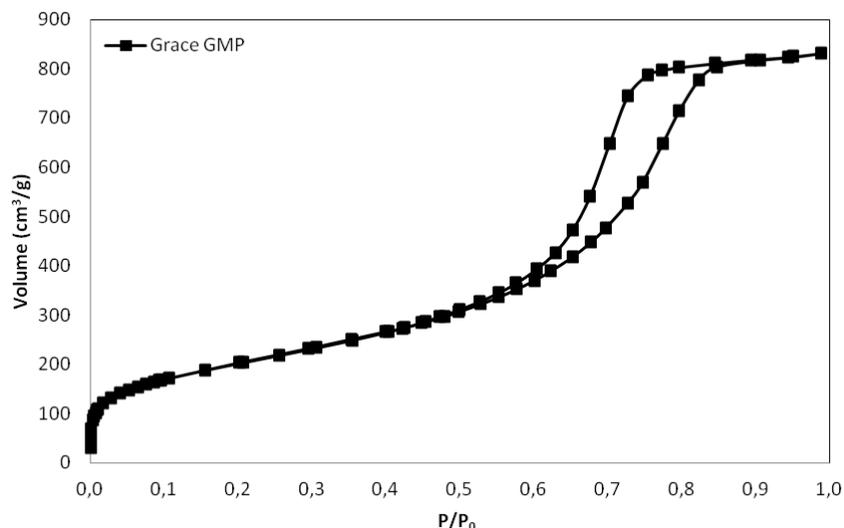


**Figura 4.1 - Spettro di diffrazione della silice commerciale Grace - Bassi angoli**

È possibile notare la totale assenza di picchi di diffrazione, a testimonianza della mesoporosità non ordinata di questa particolare silice e la mancanza di una mesostruttura. L'analisi ha quindi rilevato la struttura totalmente amorfa del supporto.

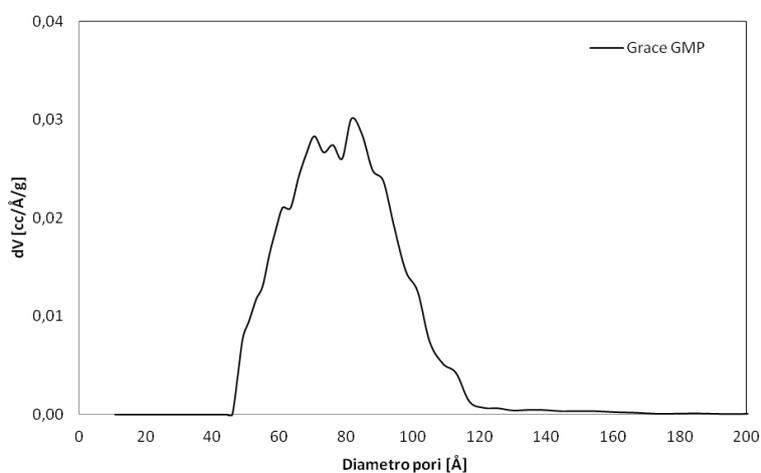
- Analisi di adsorbimento di azoto

Nella figura sottostante viene riportata l'isoterma di adsorbimento di azoto a 77 K e la relativa gaussiana di distribuzione porosimetrica. Valutando le informazioni ottenute dall'analisi BET è stato possibile ricavare l'area superficiale specifica del campione, il volume e il diametro dei pori, i cui valori vengono riportati in una tabella sottostante.



**Figura 4.2 - Isotherma di adsorbimento del carrier Grace GMP**

L'isoterma di adsorbimento relativa a questa silice è del IV tipo e la forma del coppia di isteresi non è tipica di mesopori cilindrici, quindi non riconducibile ad una ben determinata forma ma ad un sistema disordinato. La distribuzione porosimetrica è larga e centrata intorno a 8 nm: evidenzia una eterogeneità della dimensione dei pori ed è rappresentativo di un materiale a mesoporosità non controllata e non ordinata.



**Figura 4.3 - PSD della silice Grace GMP**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale ( $m^2/g$ ), volume dei pori ( $cm^3/g$ ) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 4.3, come punto medio del picco a metà altezza.

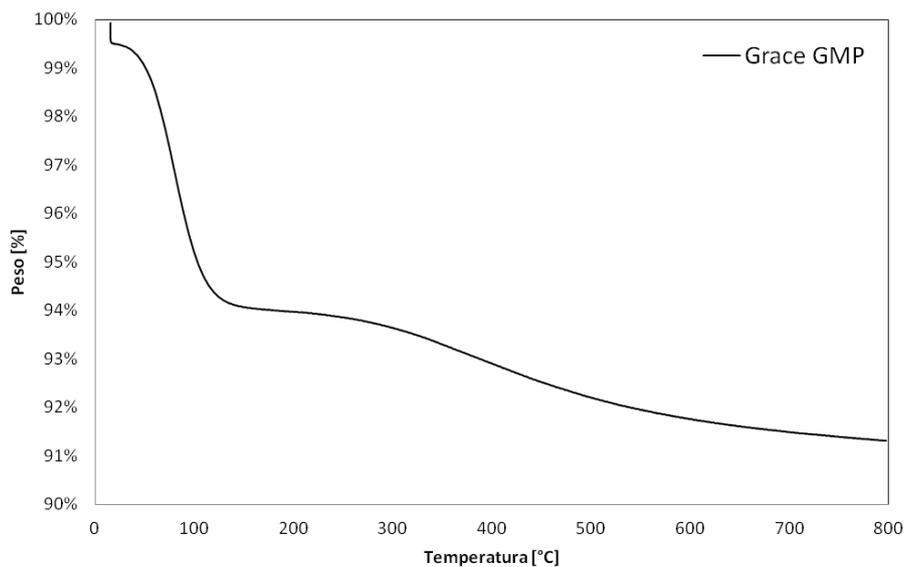
I dati vengono riportati nella tabella sottostante.

**Tabella 4.1 - Valori caratteristici del supporto commerciale Grace GMP**

BET - Grace	Valori
<b>Surface area data</b>	
Multipoint BET	732 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>	
Total Pore volume	1,29 cc/g
<b>Pore size data</b>	
Average pore diameter	7,6 nm

- Analisi termogravimetrica

Nella figura sottostante viene riportata la curva termogravimetrica del supporto commerciale Grace GMP.

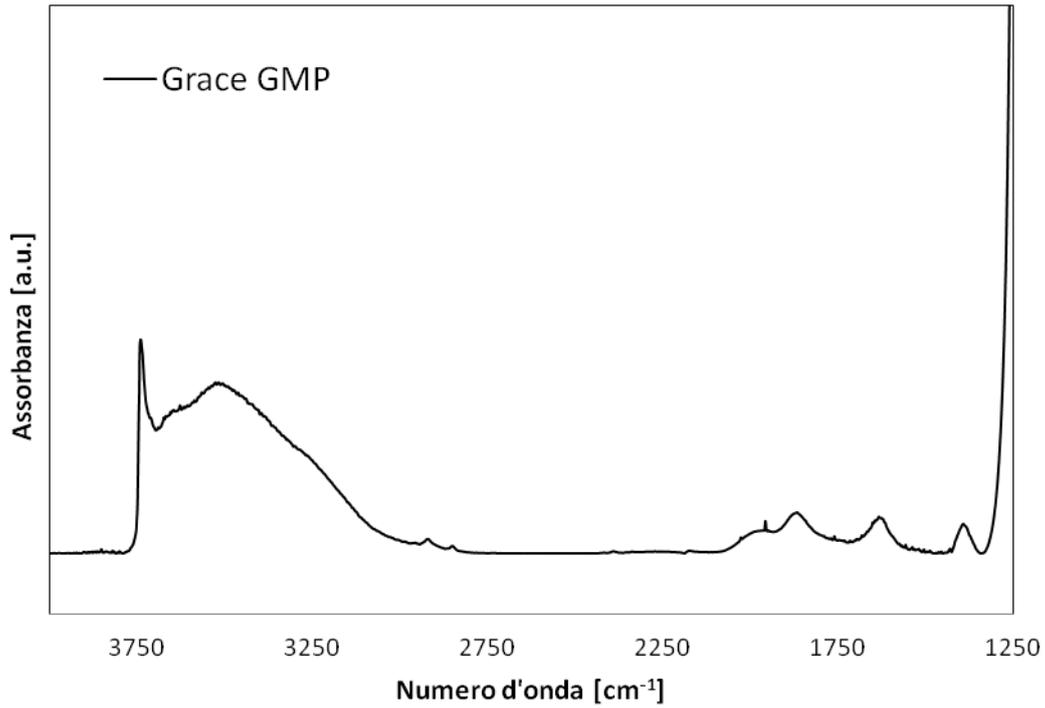


**Figura 4.4 - Analisi termogravimetrica del supporto commerciale Grace GMP**

Si osserva che al di sotto dei 100°C si verifica perdita di acqua molecolare fisisorbita, circa il 6% in peso del campione. Per temperature superiori la curva mostra un andamento meno ripido, imputabile alla perdita di silanoli, che si attesta intorno al 3% in peso.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

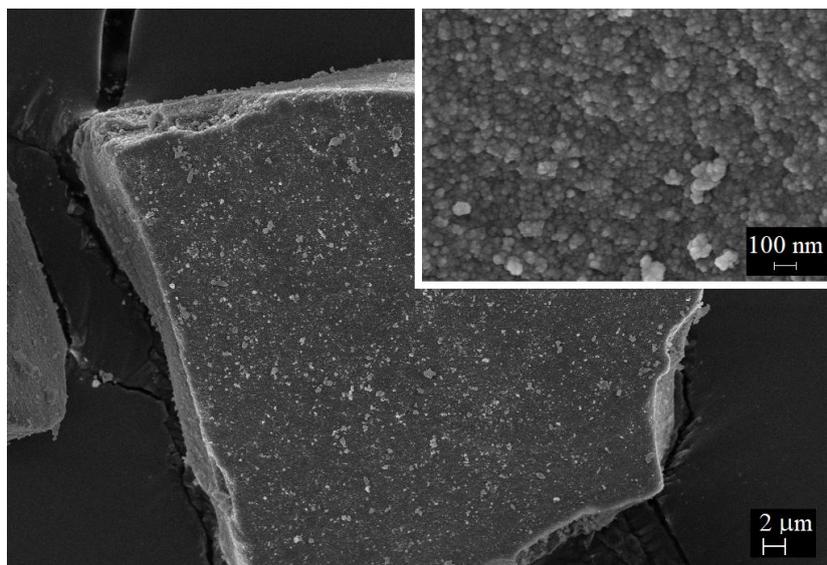
Il campione è stato sottoposto ad analisi spettroscopica infrarossa (FT-IR) di cui si riporta lo spettro in figura 4.5.



**Figura 4.5 - Spettro infrarosso del supporto commerciale Grace GMP**

Lo spettro infrarosso è chiaramente attribuibile ad una silice, difatti è presente un picco a  $3750\text{ cm}^{-1}$ , rappresentativo dei silanoli isolati e una larga banda a  $3500\text{ cm}^{-1}$  attribuibile ai silanoli interagenti.

- Microscopia elettronica a scansione



**Figura 4.6 - Immagini FESEM del supporto commerciale Grace GMP con ingrandimento**

In figura 4.6 viene riportata un'immagine di microscopia SEM della silice commerciale Grace GMP, la quale si presenta come agglomerati compatti di particelle della grandezza di qualche nanometro, tra le quali si formano le porosità.

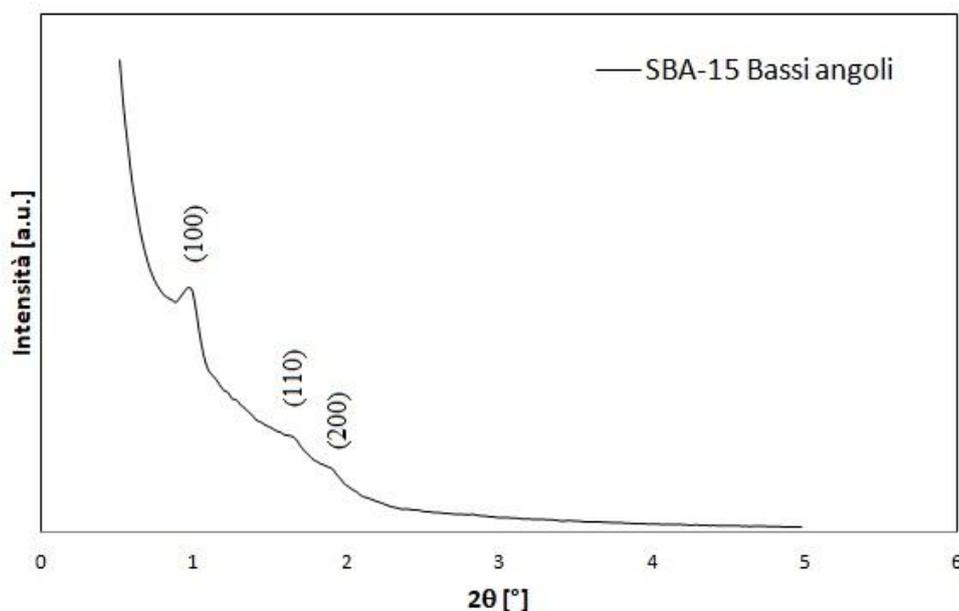
## 4.2 SBA-15

### 4.2.1 Caratterizzazione

La caratterizzazione del campione è stata eseguita con differenti tecniche: diffrattometria a raggi X, analisi di adsorbimento di azoto, analisi termogravimetrica, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier e microscopia elettronica a scansione.

- Diffrattometria a raggi X

Viene riportato, nella figura sottostante, lo spettro XRD del campione commerciale di silice SBA-15.



**Figura 4.7 - XRD pattern del supporto commerciale SBA-15**

Nella tabella sottostante vengono invece riportati gli indici di Miller dei piani e le relative posizioni angolari.

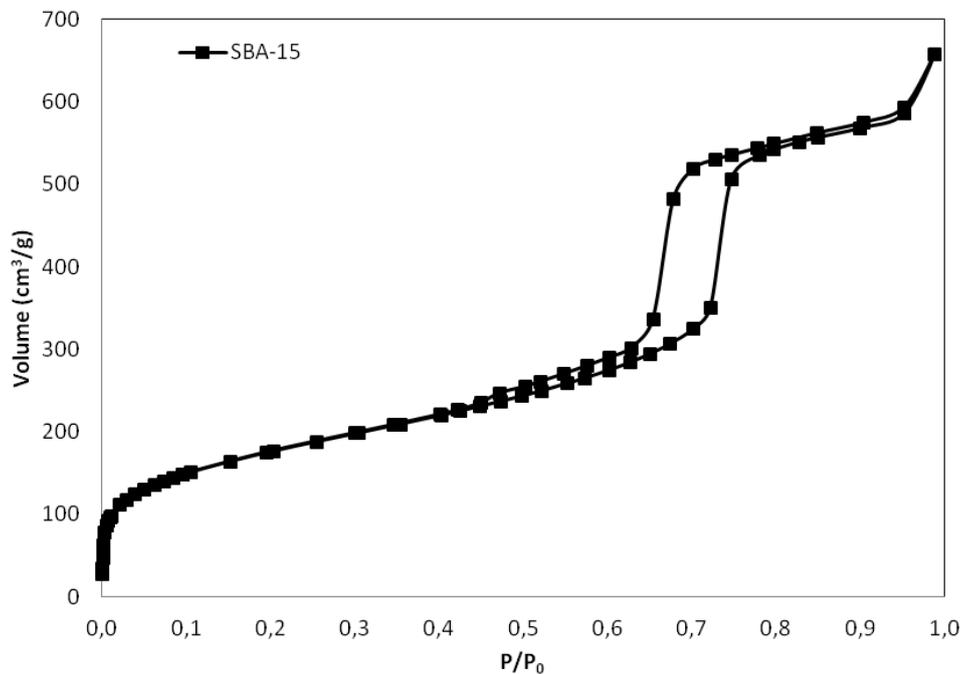
**Tabella 4.2**

Indice di Miller	Posizione angolare, $2\theta$
(100)	0,93°
(110)	1,61°
(200)	1,87°

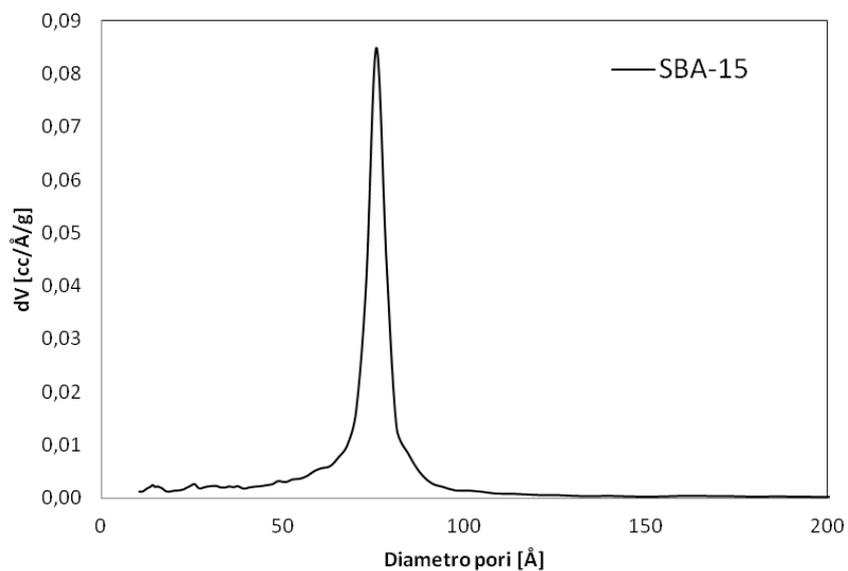
La diffrattometria a raggi X ha mostrato la presenza di 3 picchi, di cui due poco intensi. Un pattern di questo tipo è sicuramente imputabile alla mesostruttura ordinata di questa particolare silice a simmetria esagonale.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Nella figura sottostante viene riportata l'isoterma di adsorbimento di azoto a 77K e la relativa distribuzione porosimetrica.



**Figura 4.8 - Isoterme di adsorbimento della silice commerciale SBA-15**



**Figura 4.9 - PSD del supporto commerciale SBA-15**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale ( $m^2/g$ ), volume dei pori ( $cm^3/g$ ) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 4.12. I dati vengono riportati nella figura sottostante.

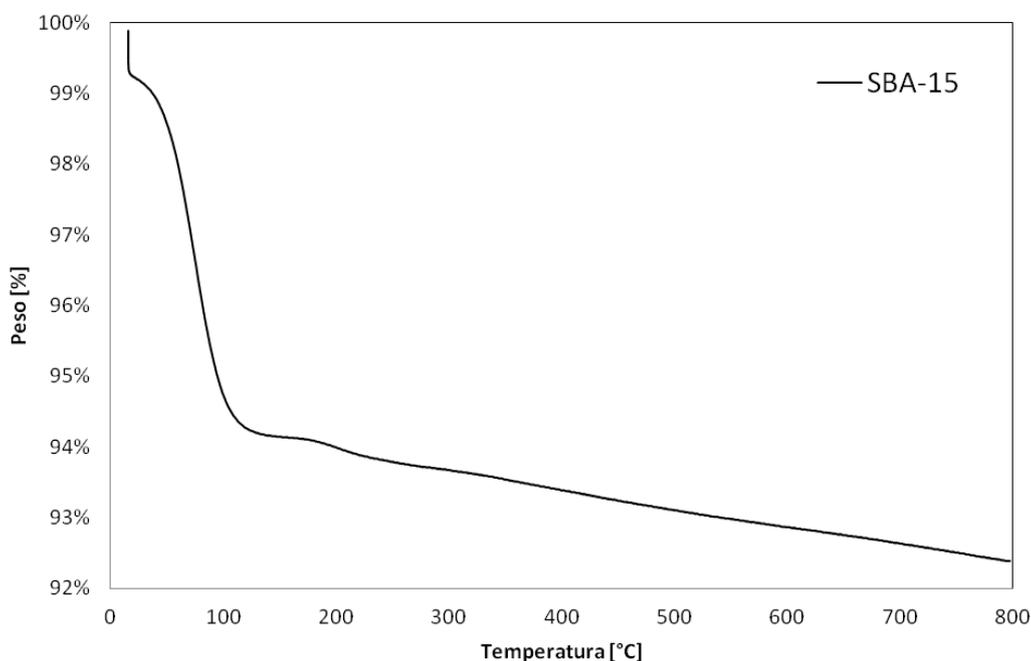
**Tabella 4.3 - Valori caratteristici del supporto commerciale SBA-15**

BET – SBA-15	Valori
<b>Surface area data</b>	
Multipoint BET	637 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>	
Total Pore volume	1,02 cc/g
<b>Pore size data</b>	
Average pore diameter	7,6 nm

L'isoterma di adsorbimento in figura 4.9 è una curva del IV tipo, dove è possibile osservare un cappio di isteresi di tipo H1 (attribuito ad una distribuzione di mesopori molto stretta) e rappresentativa di pori cilindrici, per valori di  $P/P_0$  compresi fra 0,4 e 0,65. La distribuzione porosimetrica, monomodale, presenta un picco netto nell'intorno dei 7,6 nm.

- Analisi termogravimetrica

Nella figura sottostante viene riportata la curva termogravimetrica del supporto commerciale SBA-15, a mesoposità ordinata.

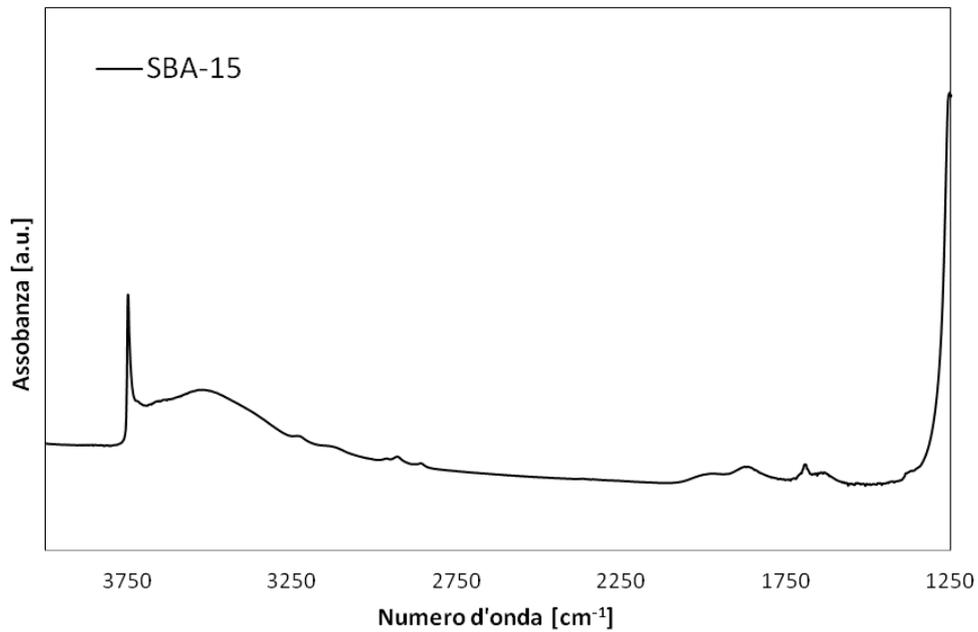


**Figura 4.10 - Analisi termogravimetrica del supporto commerciale SBA-15**

L'andamento della curva è simile a quello della silice Grace: circa 6% di acqua fisisorbita e 2% di silanoli, in basse quantità, che danno condensazione.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

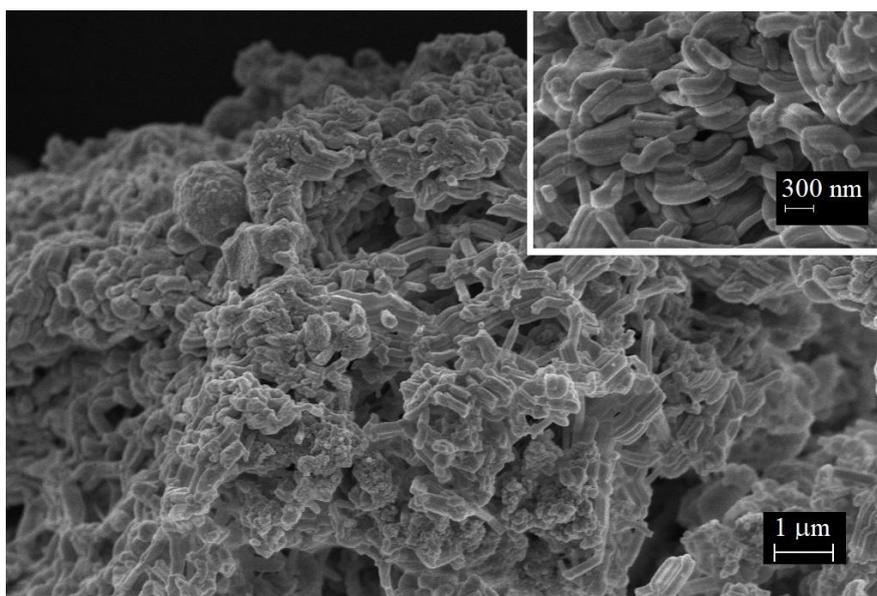
Il campione è stato sottoposto ad analisi spettroscopica infrarossa (FT-IR) di cui si riporta lo spettro.



**Figura 4.11 - Spettro infrarosso del supporto commerciale SBA-15**

Anche in questo caso lo spettro è tipico di una silice ma con un carattere meno idrofilico, giustificato dall'elevata assorbanza a 3750 cm<sup>-1</sup> dei silanoli isolati rispetto a quella degli interagenti.

- Microscopia elettronica a scansione



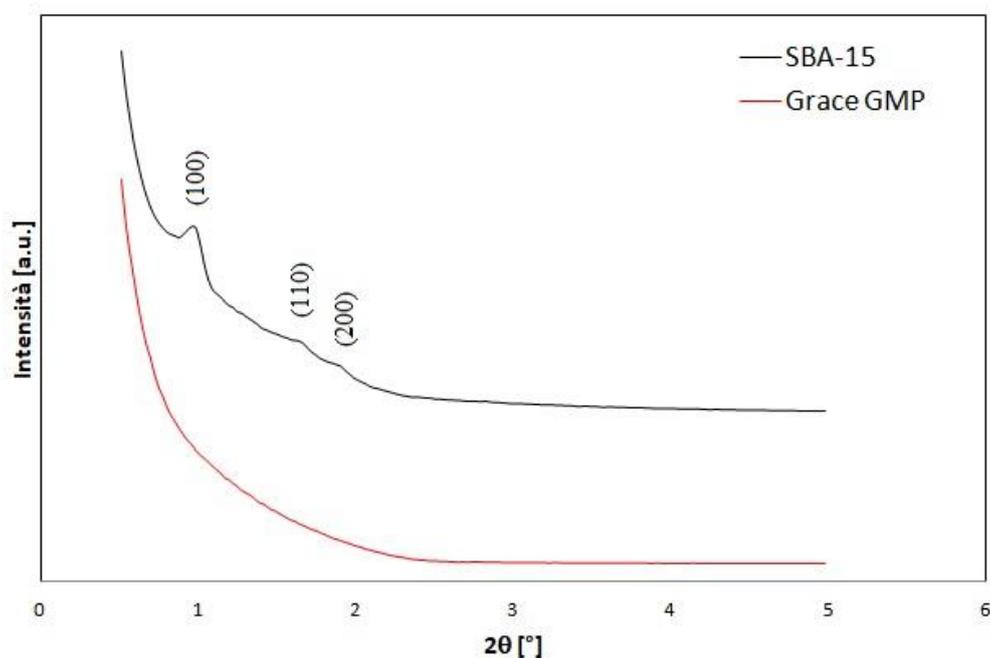
**Figura 4.12 - Immagine FESEM del supporto commerciale SBA-15 con ingrandimento**

La micrografia SEM evidenzia gruppi compatti e dotati di un semiordine della silice SBA-15 di particelle allungate di natura filamentosa della dimensione di circa 1  $\mu\text{m}$ , con zone piú eterogenee e disordinate. La porosità, contrariamente al caso della Grace GMP, sta all'interno di queste particelle cilindriche.

### 4.3 Confronto tra i supporti

Potrebbe essere utile, ai fini della comprensione delle differenze tra i supporti, mostrare le caratterizzazioni in parallelo negli stessi grafici.

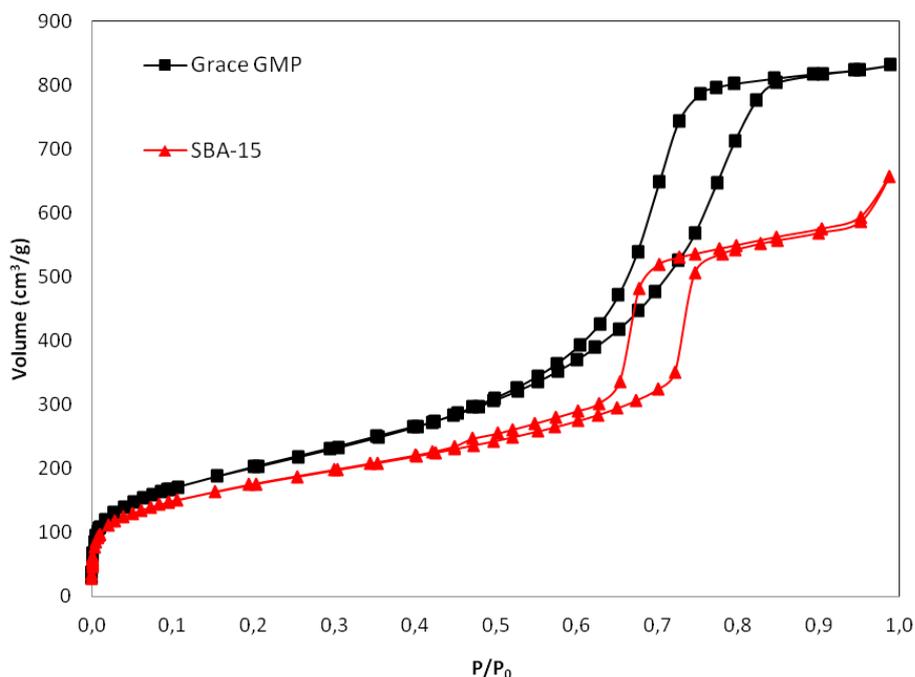
- Diffrazione a raggi X



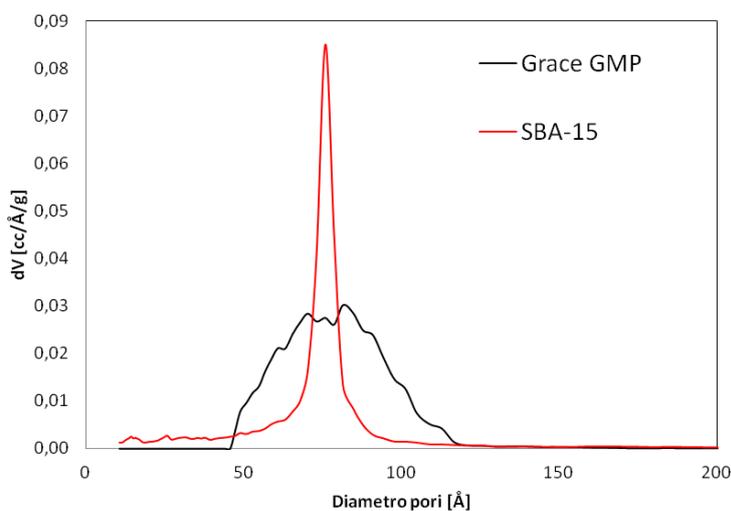
**Figura 4.13 - Confronto dei pattern XRD dei due supporti utilizzati**

Il confronto visivo fa intuire meglio come le due silici siano morfologicamente diverse: entrambe sono caratterizzate da una simmetria esagonale, ma l'SBA-15 ha una mesostruttura ordinata.

- Analisi di adsorbimento di azoto



**Figura 4.14 - Confronto tra isoterme di adsorbimento dei due supporti utilizzati**



**Figura 4.15 - Confronto delle PSD dei due supporti utilizzati**

Le isoterme di adsorbimento mostrano poche differenze che rispecchiano due diverse tipologie di silice: l'SBA-15 è caratterizzata da una famiglia di pori di forma cilindrica (basandoci sulla forma del cappio di isteresi) e una distribuzione porosimetrica molto netta, stretta e simmetrica, indice di una buona regolarità nella dimensione; la Grace GMP mostra invece una non regolarità nella forma dei pori e una PSD molto larga, il che rispecchia la casualità nella dimensione dei pori, determinata dallo spazio tra le particelle. D'altronde i materiali sono molto diversi: la silice Grace è composta da nanoparticelle assemblate che determinano una mesoporosità intraparticellare, disordinata e casuale, viceversa l'SBA-15 è

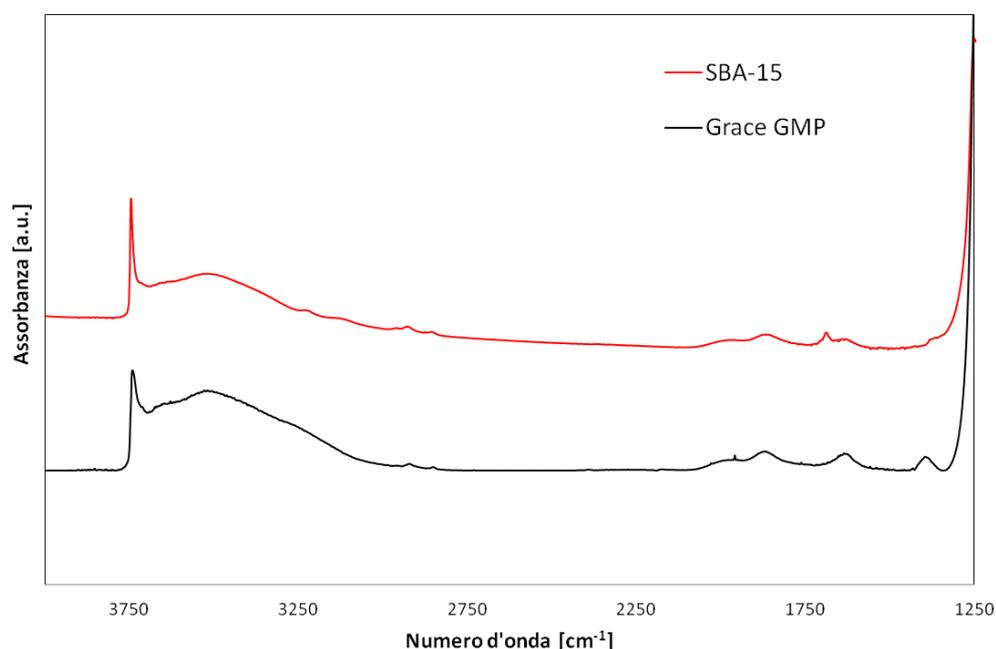
caratterizzata da una mesoporosità uniforme, controllata (grazie al template), ordinata e una distribuzione dei pori secondo una simmetria esagonale.

Nella tabella sottostante sono riassunte le caratteristiche di entrambi i supporti: la silice a mesoporosità controllata possiede un'area e un volume leggermente minori, a fronte però di un diametro medio identico. Quest'ultimo valore risulta essere un buon parametro di misura dell'adsorbimento di piroxicam.

**Tabella 4.4 - Dati caratteristici a confronto**

BET – Confronto materiali	Grace GMP	SBA-15
<b>Surface area data</b>		
Multipoint BET	732 m <sup>2</sup> /g	637 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>		
Total Pore volume	1,29 cc/g	1,02 cc/g
<b>Pore size data</b>		
Average pore diameter	7,6 nm	7,6 nm

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier



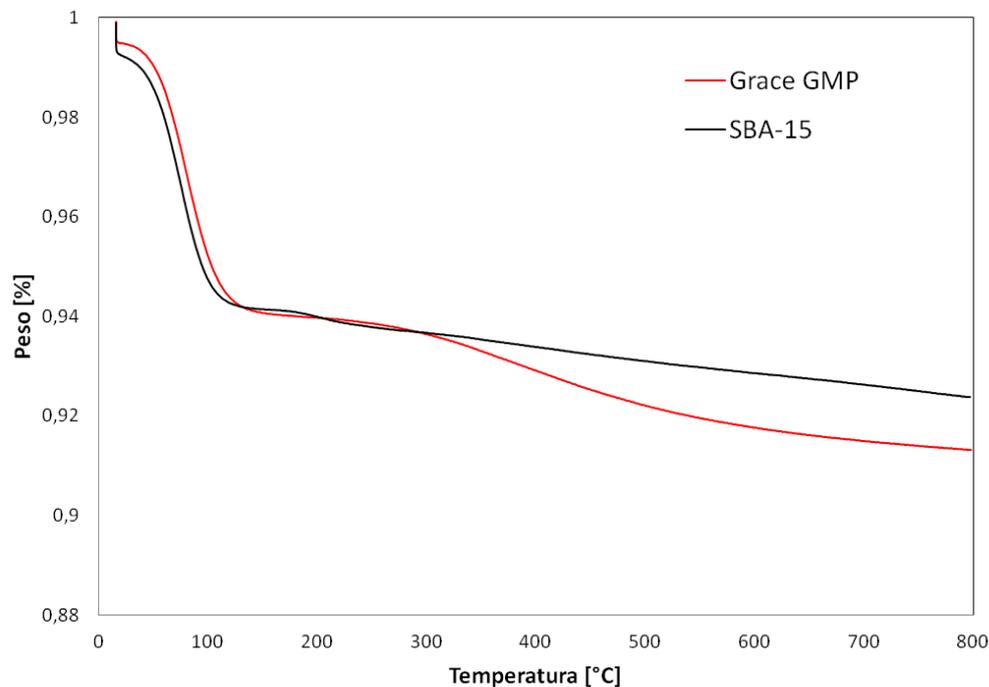
**Figura 4.16 - Confronto tra spettri infrarossi dei due supporti**

La curva relativa al degas pastiglia, a temperatura ambiente, mostra la popolazione relativa ai silanoli isolati e quelli interagenti sia maggiore nell'SBA-15. Sono presenti un maggior quantitativo di silanoli isolati relativamente a quest'ultimo materiale. L'intensità relativa della banda dovuta ai silanoli interagenti tramite legame H, rispetto a quella dovuta ai silanoli

isolati, è maggiore per il campione di silice commerciale Grace GMP che per l'SBA-15. Ci si aspetta quindi che quest'ultima sia leggermente più idrofilica, avendo un maggior quantitativo di silanoli interagenti. Questa differenza di comportamento può portare a delle variazioni di comportamento tra i due tipi di silice nei confronti del farmaco.

Riassumendo, la silice Grace risulta essere più ossidrilata e infatti, in riferimento all'analisi termogravimetrica, c'è una maggiore perdita di peso dovuta ai gruppi -OH, ne perde di più. Tutto ciò è coerente con la maggiore intensità della banda dei silanoli interagenti rispetto ai silanoli isolati dell'indagine spettroscopica, se confrontata all'SBA-15.

- Analisi termogravimetrica



**Figura 4.17 - Confronto tra le analisi termogravimetriche dei due supporti commerciali**

L'analisi termogravimetrica in figura 4.17 mostra le due silici tal quali a confronto. Questo tipo di misura permette di poter capire meglio le differenze tra le due silici utilizzate dal punto di vista chimico: è possibile capire come, ad esempio, i due materiali abbiano la stessa quantità di acqua molecolare fisisorbita (quindi non è così poi così evidente una differenza in termini di idrofilicità) ma diversa quantità di ossidrili (determinata dalla condensazione dei silanoli interagenti). L'evidenza di ciò sta nel fatto che la Grace ha una maggiore riduzione percentuale in peso rispetto all'SBA-15 al di sopra dei 300°C, indice di una differenza nella perdita di silanoli interagenti per reazione di condensazione. Risulta quindi confermata l'idea, coerentemente all'indagine spettroscopica infrarossa, di una minore idrofilicità da parte della silice a mesoporosità ordinata rispetto alla disordinata, proprio per la differenza di quantità di gruppi ossidrilici (siti idrofilici).

## 5 Impregnazione del Piroxicam

L'incorporazione del farmaco all'interno dei pori dei due campioni di silice è stata eseguita con i due processi classici descritti nel quarto capitolo, in particolare utilizzando etanolo come solvente e il processo in CO<sub>2</sub> supercritica.

In entrambi i casi le molecole di Piroxicam vengono adsorbite sulla superficie della silice grazie ad interazioni fisico-chimiche.

### 5.1 Piroxicam

Il piroxicam è un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (NSAID) della classe degli oxicam (derivato dell'acido enolico), il quale possiede proprietà antipiretiche, analgesiche e prevenzione del cancro al colon. È disponibile in diverse formulazioni farmaceutiche adatte a differenti vie di somministrazioni (orale, cutanea, oculare e parenterale). Esso ha una solubilità molto bassa in soluzioni acquose, quali ad esempio etanolo, alta invece in solventi quali dimetilsolfossido, il quale ha lo svantaggio di essere tossico.

La forma cristallina stabile di questo farmaco è quella cubica, stabile in condizioni supercritiche al di sotto degli 80°C, si presenta come una polvere bianca e presenta neutralità di carica. A seguito della sua amorfizzazione, vira al giallo a causa della presenza di molecole zwitterioniche [24]. A 120°C avviene la degradazione di questo farmaco, mentre a 201°C avviene la fusione della forma cristallina.

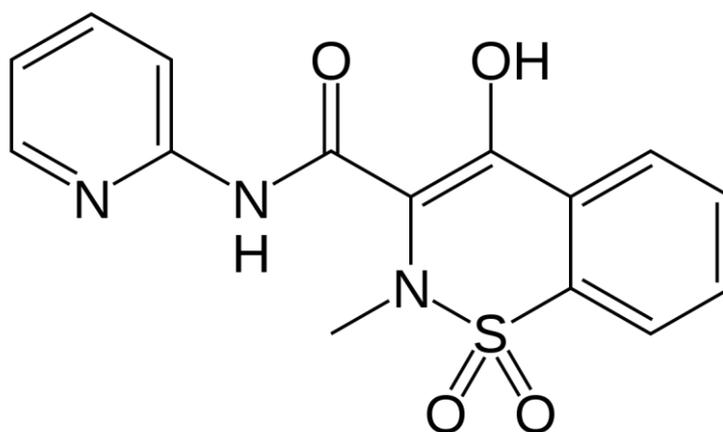
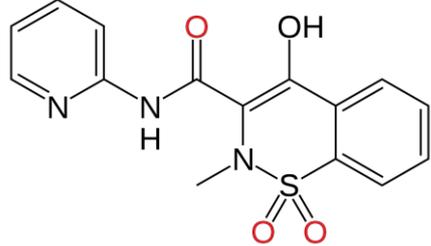
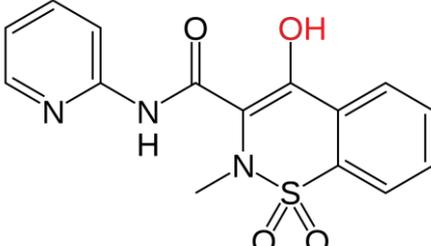
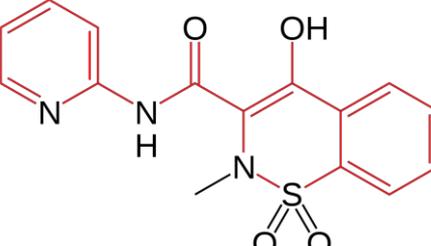


Figura 5.1 - Molecola di piroxicam

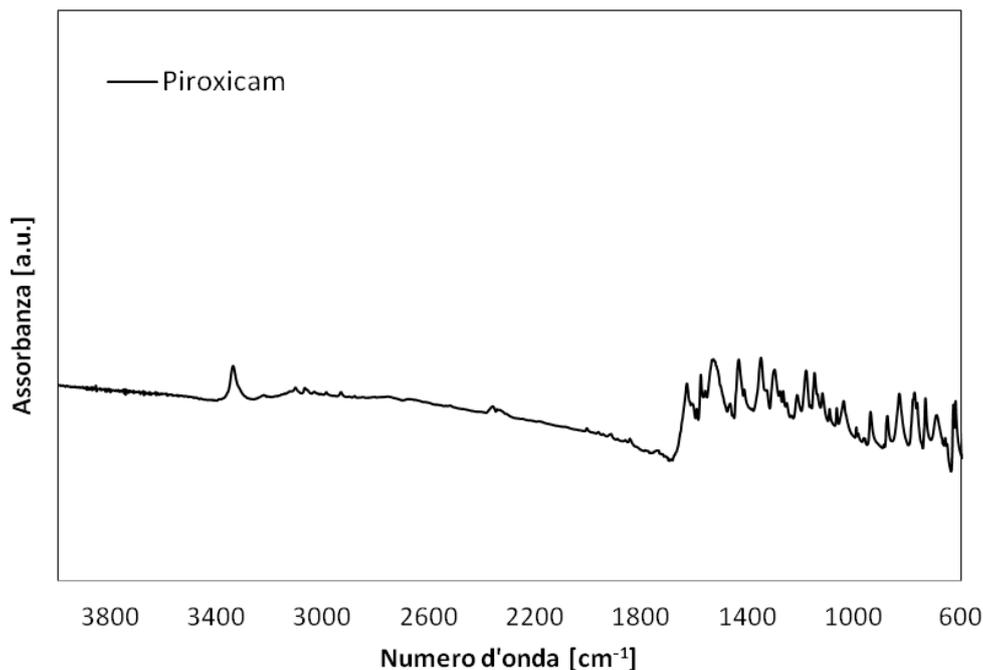
Riguardo al piroxicam, sono stati effettuati numerosi studi a causa della sua bassa solubilità in soluzioni acquose. Solventi quali dimetilsolfossido possiedono un'alta proprietà di disciogliere questo farmaco ma, chiaramente, non possono essere utilizzati in ambito biomedico in quanto tossici. Si è quindi cercato di aumentare la solubilità di questo particolare farmaco utilizzando  $\beta$ -ciclodestrine [24], polivinilpirrolidone (PVP) tramite l'utilizzo di CO<sub>2</sub> supercritica [25].

Ricollegandoci al presente lavoro, analizzando la molecola è possibile evidenziare diversi proton donor, i quali potrebbero giocare un ruolo importante nella formazione di un legame idrogeno col supporto:

**Tabella 5.1 - Individuazione dei diversi proton donor (d) e acceptor (a) della molecola di piroxicam**

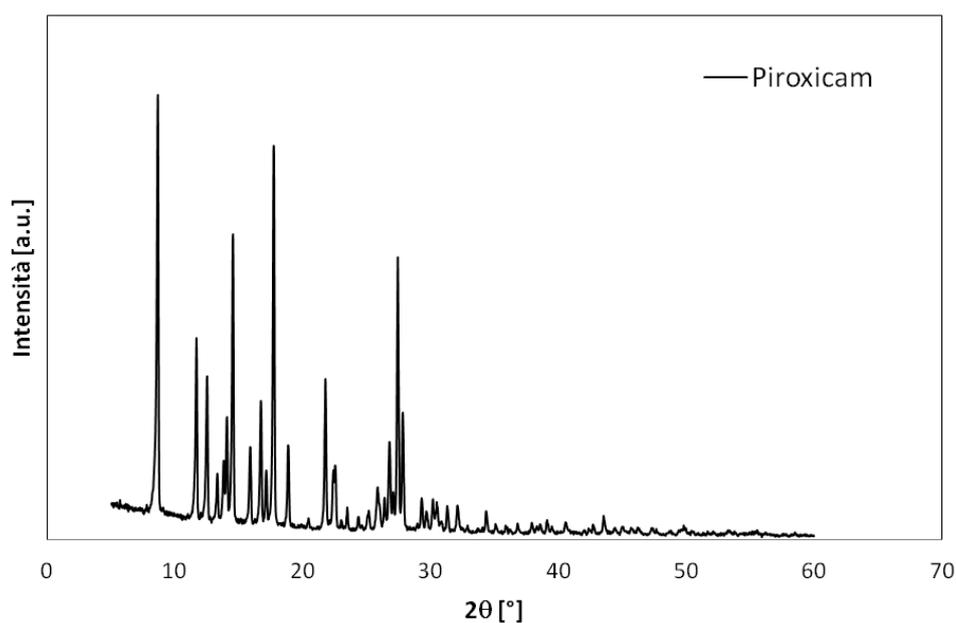
Atomi - Gruppi	Molecola
Ossigeni (a)	
Ossidrili (d)	
Anelli aromatici (a)	

Così come i materiali di base, anche questo è stato caratterizzato tramite spettroscopia infrarossa, diffrattometria e analisi termogravimetrica, al fine di una corretta analisi dell'interazione tra farmaco e materiale ed eventuali confronti.



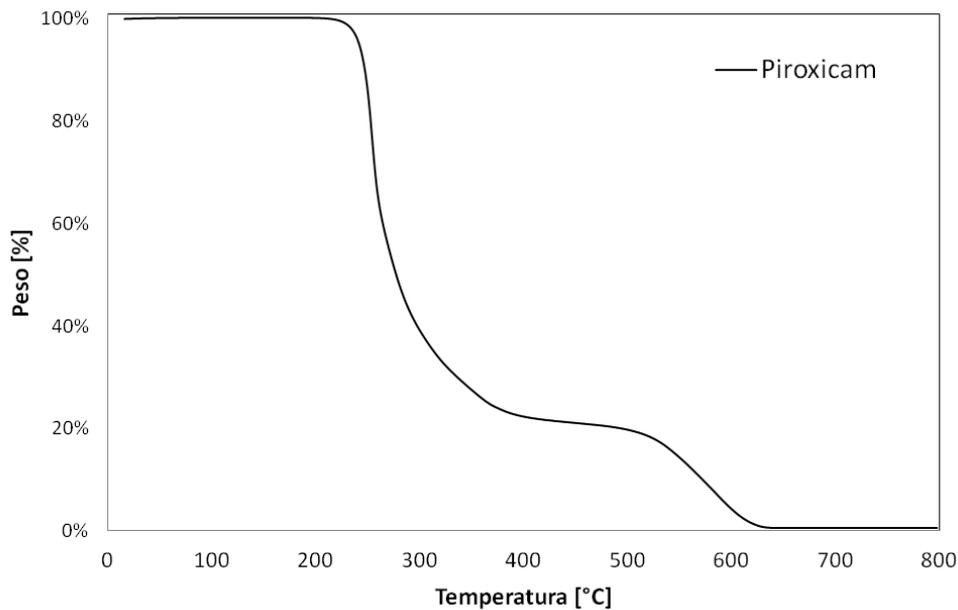
**Figura 5.2 - Spettro infrarosso del piroxicam in KBr**

Sono presenti numerose bande di assorbimento, soprattutto nell'intervallo  $1600 - 500 \text{ cm}^{-1}$ , e si può osservare una banda isolata  $3338 \text{ cm}^{-1}$  rappresentativa dello stretching del gruppo N-H della molecola di farmaco. Questo modo vibrazionale può essere preso come riferimento per l'avvenuta amorfizzazione sul supporto, in quanto esso è proprio della forma cristallina del piroxicam [25]. La sua scomparsa dallo spettro è quindi un'evidenza importante.



**Figura 5.3 - Spettro diffrattometrico del piroxicam**

Lo spettro di diffrazione a raggi X evidenzia la forma cristallina del piroxicam.

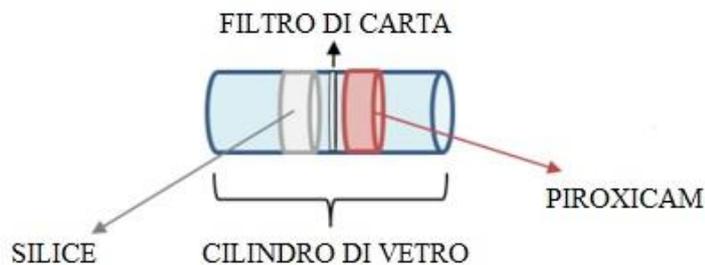


**Figura 5.4 - Analisi termogravimetrica del piroxicam**

L'analisi termogravimetrica ha evidenziato una perdita di massa fino all'80% tra la temperatura ambiente e i 400°C, dove avviene la decomposizione del farmaco, la quale è completa al termine della prova.

## **5.2 Incorporazione del Piroxicam con CO<sub>2</sub> supercritica**

Sono stati utilizzati, singolarmente, i due campioni di silice commerciale, Grace GMP e SBA-15, sotto forma di pastiglia da 100 mg. Un'altro "green" di farmaco da 100 mg in peso è stato inserito all'interno di un cilindretto di vetro all'interno del quale vengono inserite le due polveri compattate interposte da un filtro di carta dello stesso diametro del cilindro, attraverso il quale il piroxicam diffonde tramite i pori del filtro stesso. Alle estremità del cilindro è stata inserita della lana di polipropilene per evitare contaminazioni esterne e come strumento contenitivo per le polveri.



**Figura 5.5 - Schematizzazione dei cilindretti inseriti all'interno dell'apparato di impregnazione di CO<sub>2</sub> supercritica**

I cilindri di vetro vengono successivamente inseriti all'interno dell'impianto di CO<sub>2</sub> supercritica. Le condizioni operative sono pari a:

**Tabella 5.2 - Condizioni operative**

Pressione	Temperatura	Tempo
300 bar	120°C	12 ore

Temperature più alte potrebbero portare ad un processo degradativo del farmaco [24]. L'alto tempo di trattamento permette sia la dissoluzione che la diffusione del piroxicam all'interno del materiale. Una volta terminato il processo di *drug loading*, il sistema viene riportato alle condizioni di pressione e temperatura ambiente.

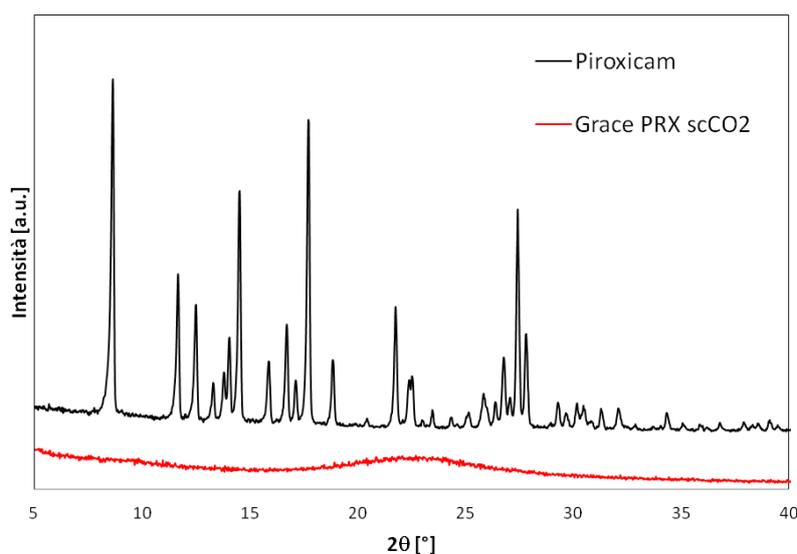
### 5.3 Caratterizzazione

Le tecniche di caratterizzazione utilizzate sono state la diffrattometria a raggi X, l'analisi di adsorbimento di azoto, l'analisi termogravimetrica e la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier. Tramite queste, è stato possibile valutare l'interazione tra il farmaco e il supporto, determinare l'occupazione dei pori, nonché il quantitativo di piroxicam e la sua eventuale amorfizzazione.

È stata effettuata anche un'analisi al microscopio SEM, la quale viene in aiuto per poter confermare quanto dedotto dalle tecniche sopracitate.

#### 5.3.1 Grace GMP

- Diffrattometria a raggi X

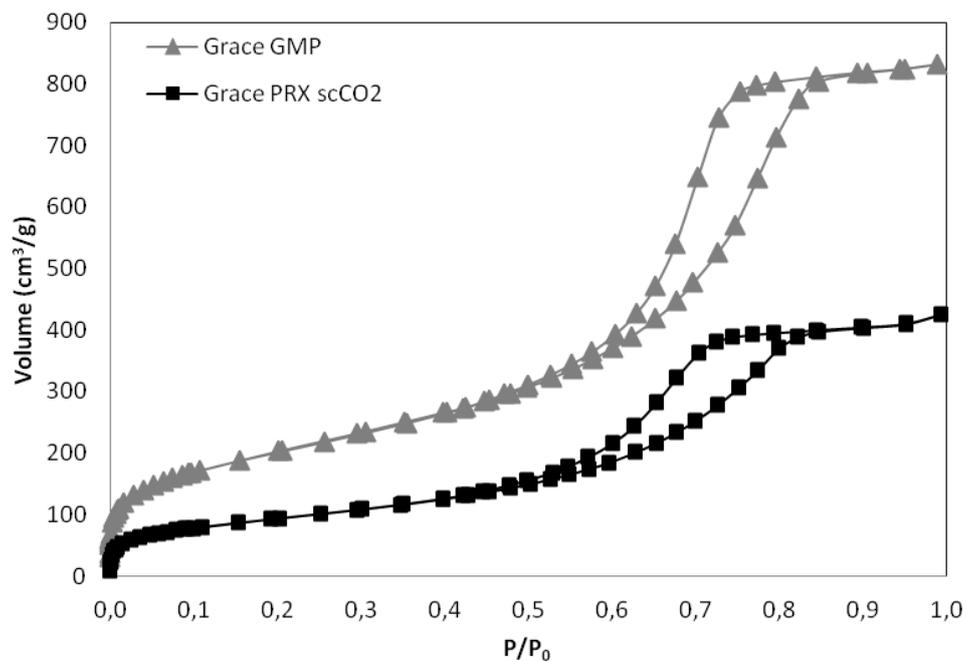


**Figura 5.6 - Confronto ad alti angoli tra gli spettri diffrattometrici tra farmaco e supporto caricato**

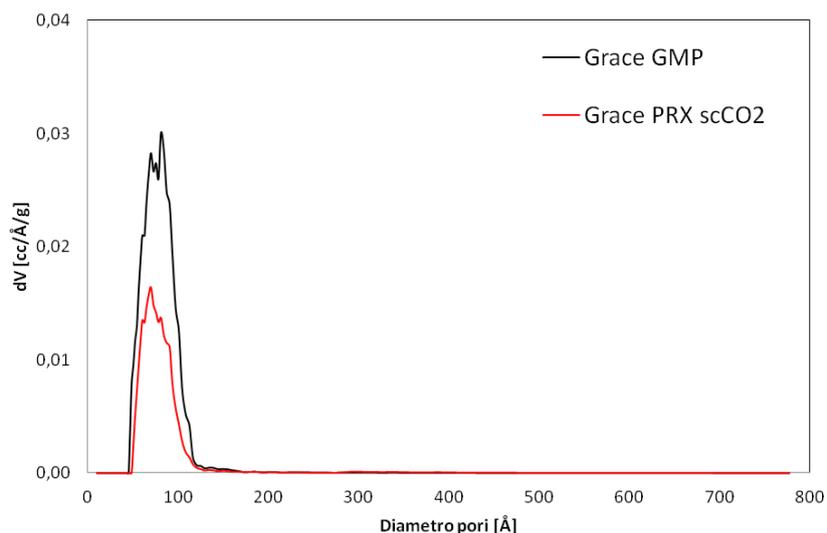
Per poter avere un quadro completo dell'incorporato viene riportato in figura 5.6 lo spettro di diffrazione a ad alti angoli della silice Grace GMP, al fine di valutare lo stato strutturale del piroxicam a seguito del *drug loading*. Le evidenze sperimentali confermano la scomparsa di picchi relativi alla presenza di piroxicam in fase cristallina, da ciò si può desumere che il farmaco incorporato si trovi in fase amorfa, come auspicabile. Tale condizione risulta essere ottimale, in quanto è possibile godere di una rapida solubilizzazione della molecola, in quanto essa sarà caratterizzata da un'energia libera di Gibbs più elevata, rispetto al farmaco in fase cristallina. Il sistema sarà quindi caratterizzato da una cinetica di rilascio più rapida, in quanto viene richiesta una minore forza spingente per la solubilizzazione del piroxicam.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Nelle figure sottostanti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e la distribuzione porosimetrica del materiale caricato tramite CO<sub>2</sub> supercritica. Per una più facile comprensione dei dati, entrambe vengono messa a confronto col materiale non caricato.



**Figura 5.7 - Confronto tra isoterme di adsorbimento del supporto tal quale e caricato tramite CO<sub>2</sub>**



**Figura 5.8 - Confronto fra distribuzioni porosimetriche del supporto vuoto e caricato in CO<sub>2</sub>**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale (m<sup>2</sup>/g), volume dei pori (cm<sup>3</sup>/g) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 5.8, come punto medio del picco a metà altezza.

I dati vengono riportati in tabella 5.3, confrontati sempre col materiale vuoto:

**Tabella 5.3 - Dati caratteristici a confronto**

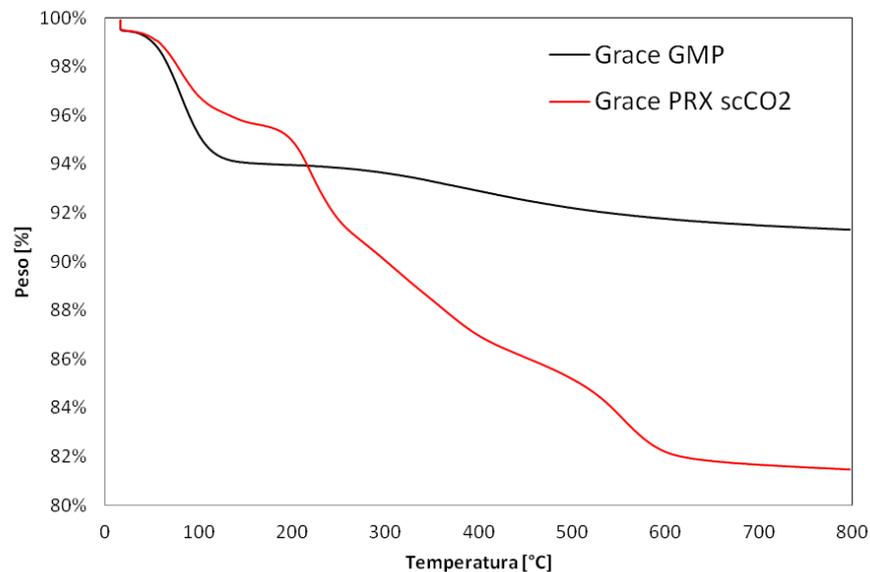
BET – Grace	Grace GMP	Grace PRX scCO <sub>2</sub>
<b>Surface area data</b>		
Multipoint BET	732 m <sup>2</sup> /g	341 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>		
Total Pore volume	1,29 cc/g	0,66 cc/g
<b>Pore size data</b>		
Average pore diameter	7,6 nm	7,0 nm

Dalle curve di adsorbimento in figura 5.7 si può notare una diminuzione del volume libero a causa della presenza del piroxicam. Non si osserva, però, una particolare riduzione della pendenza della curva o un cambiamento della forma del coppia di isteresi, tuttavia sembra essersi verificato un ricoprimento omogeneo da parte del farmaco. Inoltre, la curva relativa al materiale caricato rimane sempre del IV tipo.

Osservando i dati in tabella 5.3 si può facilmente osservare come i valori relativi all'area superficiale e al volume dei pori siano sensibilmente cambiati in seguito all'incorporazione del farmaco. In particolare, si può notare come sia l'area superficiale che il volume dei pori si siano praticamente dimezzati, indice di una buona incorporazione. Per quanto riguarda la diminuzione del diametro dei pori sembrerebbe ci sia stata un riempimento degli stessi da parte della molecola di piroxicam, tuttavia occorre riferirsi alla figura 5.8 e fare le dovute

precisazioni: osservando la distribuzione porosimetrica si può notare che non sia avvenuto uno shift verso valori di diametri più bassi e che quindi, in realtà, non sia avvenuto alcun riempimento delle porosità. Si può desumere quindi che le molecole di piroxicam abbiano occluso soltanto i pori più grandi. Ciò sarà confermato dall'analisi al microscopio SEM.

- Analisi termogravimetrica



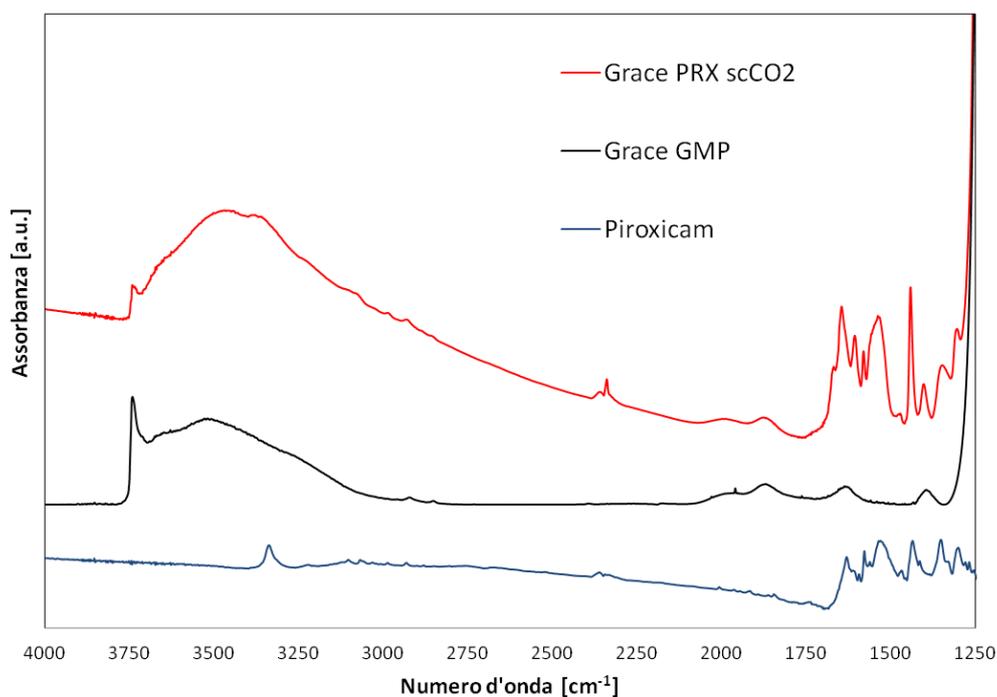
**Figura 5.9 - Confronto dell'analisi termogravimetrica tra supporto tal quale e caricato in CO<sub>2</sub> supercritica**

Come da figura 5.9, è possibile mettere in relazione la perdita di peso di una determinata specie chimica a ogni variazione di pendenza della curva. Al di sotto dei 150°C, per la curva rossa, si ha perdita di acqua molecolare adsorbita, la quale si attesta attorno al 4%. Questo contributo è minore rispetto a quanto avvenuto per il carrier, ed è coerente con l'occupazione dei siti da parte del piroxicam in luogo dell'acqua. A partire da circa 170°C la variazione di peso è attribuibile al piroxicam, il quale comincia a risentire dell'effetto della temperatura, toccando una velocità di perdita di massa considerevole nell'intorno dei 200°C, la quale si mantiene circa costante fino ai 500°C. Al di sopra di questa temperatura si osserva una successiva perdita dovuta, molto probabilmente, all'evaporazione dei prodotti di degradazione del piroxicam, fino al raggiungimento di un plateau nell'intorno dei 600°C fino alla fine della prova.

La quantità di farmaco stimata, tenendo conto del contributo dovuto alla perdita degli ossidrili (valore assunto costante, in quanto non c'è ragione di credere che siano cambiati), ammonta all'11,49% in peso sul campione.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Il seguente tipo di indagine è stato effettuato al fine di poter stimare qualitativamente l'interazione fra il farmaco e il supporto. In figura 5.10 è presente lo spettro infrarosso della silice Grace caricata tramite CO<sub>2</sub> supercritica.



**Figura 5.10 - Confronto tra spettri del supporto tal quale, caricato e farmaco**

Come prima osservazione si deve far presente l'assenza della banda relativa allo stretching dell'N-H (rappresentativo del piroxicam in forma cristallina) sullo spettro del supporto caricato. Ciò è indice di avvenuta amorfizzazione del farmaco. Nel range di numero d'onda compreso tra i 1700 cm<sup>-1</sup> e i 500 cm<sup>-1</sup> sono invece presenti diverse bande di assorbimento del piroxicam in KBr, le quali si sono rispecchiate con elevate intensità anche nel materiale caricato. La spettroscopia IR rivela, quindi, la presenza di un'elevata quantità di farmaco incorporato sulla silice, data l'elevata presenza di modi vibrazionali del farmaco nella curva relativa alla Grace caricata, presenti tra i 1690 cm<sup>-1</sup> e 1270 cm<sup>-1</sup>.

Contrariamente a quanto avviene nel caso del materiale vuoto, nel materiale caricato in CO<sub>2</sub> supercritica si ha un maggiore quantitativo di silanoli interagenti rispetto agli isolati. Ciò rispecchia l'interazione del piroxicam con la silice attraverso la formazione di un legame idrogeno tra il farmaco e la superficie della Grace, tramite i suoi gruppi Si-OH.

Ad ulteriore conferma di una forte interazione tra il piroxicam e la silice si può considerare il fenomeno di risonanza di Fermi: questo tipo di evidenza si manifesta nel momento in cui si ha l'accoppiamento tra una vibrazione fondamentale e una vibrazione di *overtone*. Con quest'ultima si intende una banda che si presenta nel momento in cui una molecola subisce una transizione dallo stato elementare a quello eccitato a causa dell'assorbimento energetico che porta ad un cambio di stato vibrazionale. I livelli energetici in questione sono quantizzati e descritti tramite equazione di Schrödinger.

La risonanza di Fermi richiede che le due vibrazioni abbiano frequenza simile e, più dettagliatamente, questo fenomeno porta considerare due modi dello stesso oscillatore che cadono alla stessa frequenza: un modo fondamentale dei legami H e un'armonica di un modo fondamentale. Poiché si verifica una sovrapposizione di due modi fondamentali della stessa molecola alla stessa frequenza, si ha uno splitting dei livelli energetici (come fossero presenti due livelli che cadono alla stessa energia) anziché la loro addizione, quindi una somma delle intensità delle bande. Ciò si traduce nella risonanza tra due modi dello stesso oscillatore, con formazione di una piccola ansa nello spettro (simili a due bande adiacenti) chiamata finestra di Evans.

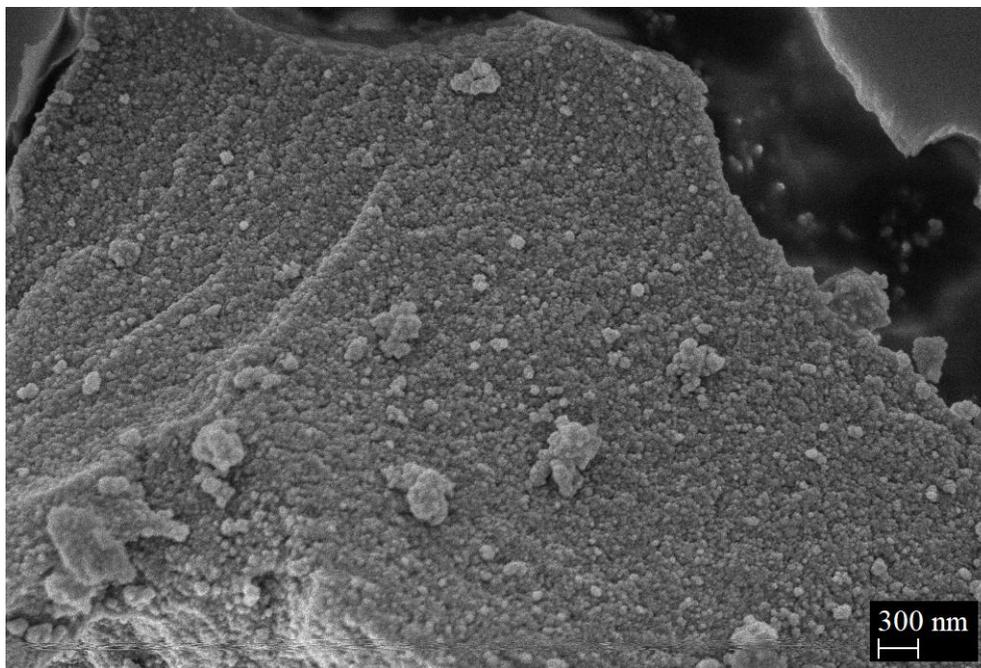
Allorché si verifica questo fenomeno si deve andare a cercare, a circa metà della frequenza in corrispondenza dell'ansetta, una banda intensa come conferma del fenomeno, in modo tale da poter affermare che le due armoniche appartengano allo stesso oscillatore. Nel caso in esame, la finestra di Evans si trova a circa  $3393\text{ cm}^{-1}$ , mentre a  $1732\text{ cm}^{-1}$  è visibile un leggero picco relativo al farmaco, molto adiacente ai modi vibrazionali intensi. Inoltre, l'ansetta si trova in corrispondenza della larga banda dei silanoli interagenti, ovvero rappresentativa del legame idrogeno. Ciò è un'ulteriore prova di interazione ed è coerente al fatto che il legame H stia coinvolgendo il farmaco.

A dimostrazione di ciò si può considerare la presenza di diversi proton donor all'interno della molecola di piroxicam, ovvero formatori di legami idrogeno, quali -OH, gli ossigeni e tutti gli anelli aromatici. Lo stesso gruppo ossidrilico può donare protoni al silanolo della silice, che si comporta da accettore.

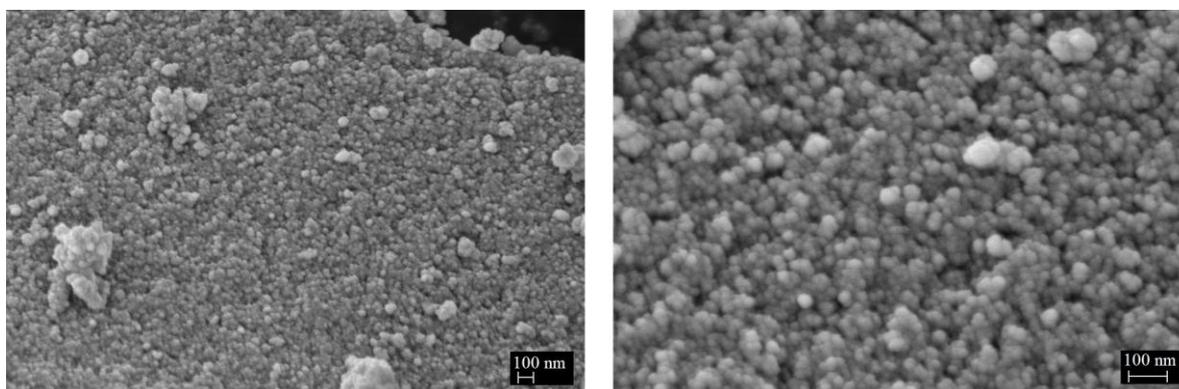
Interessante notare inoltre come lo spettro sia privo di inquinamenti, difatti non sono presenti modi vibrazionali derivanti da legami C-H saturi. Questa è un'ulteriore conferma che l'incorporazione del farmaco tramite fluido supercritico sia qualitativamente migliore rispetto alle altre tecniche tradizionali di drug loading che saranno discusse nei capitoli successivi.

- Microscopia elettronica a scansione

Al fine di valutare lo stato morfologico del supporto a seguito dell'incorporazione del farmaco sono state effettuate delle analisi al microscopio SEM.

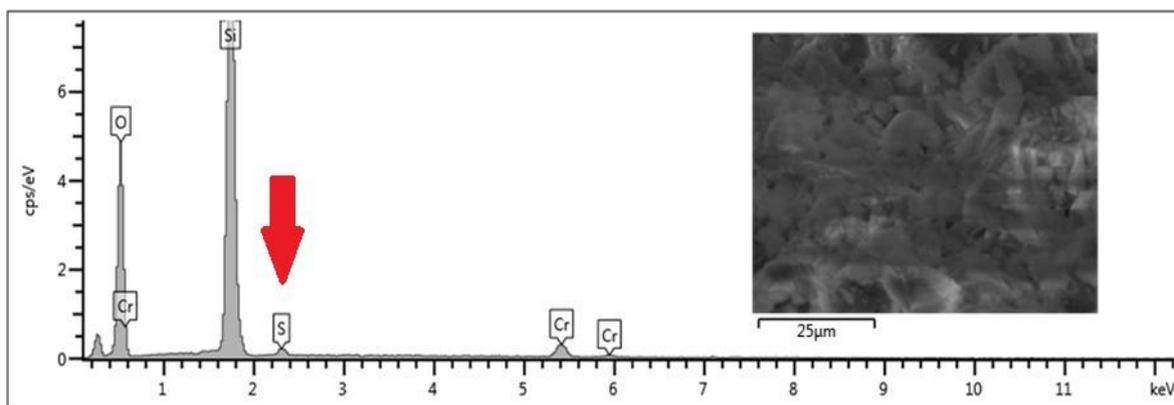


**Figura 5.11 - Immagine FESEM del supporto commerciale Grace GMP dopo trattamento in CO<sub>2</sub> supercritica**



**Figura 5.12 - Supporti Grace trattati in CO<sub>2</sub> supercritica a diversi ingrandimenti**

Le immagini SEM hanno evidenziato il mantenimento della struttura della silice e l'avvenuto adsorbimento del farmaco tra le porosità. Sono tuttavia presenti alcuni aggregati di farmaco di dimensione variabile (circa 300-400 nm) sulla superficie della Grace, ben visibili in figura 5.11 a ingrandimento 50kX. Ciò sembra essere coerente con le caratterizzazioni precedenti, considerata la percentuale di piroxicam incorporato (da TGA) e l'assenza di shift nella distribuzione porosimetrica (BET).



**Figura 5.13 - Spettro EDS della silice Grace caricata in CO<sub>2</sub> supercritica**

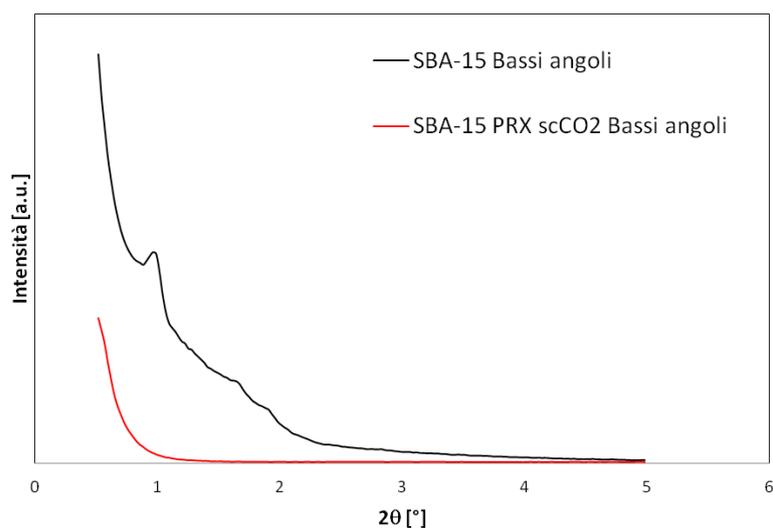
Ad ulteriore conferma della presenza del farmaco sul supporto, con lo stesso macchinario è stata effettuata un'analisi spettroscopica a dispersione di energia (EDS), scegliendo come parametro di riferimento un atomo sufficientemente grande, ovvero lo zolfo, in quanto la molecola possiede tale atomo.

**Tabella 5.4 - Percentuali relative dei vari elementi**

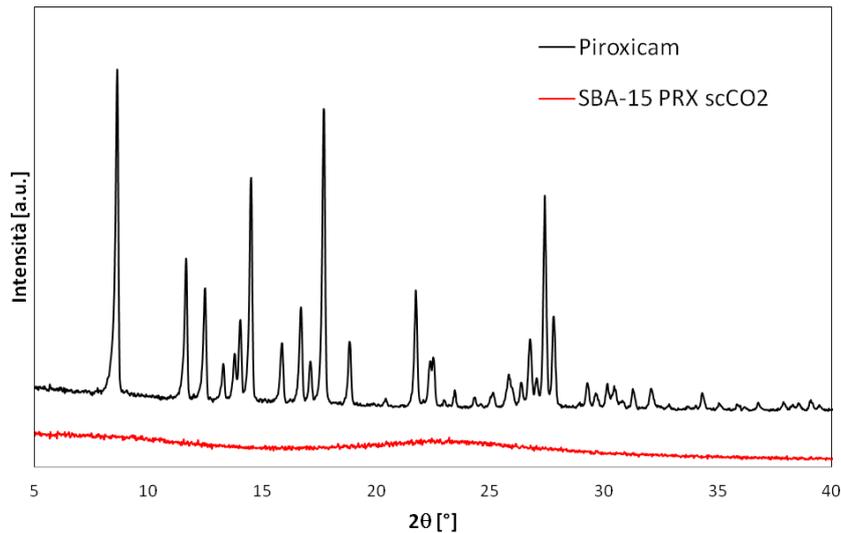
Elemento	Peso %
O	53.21
Si	45.72
S	1.07
Totale	100.00

### 5.3.2 SBA-15

- Diffrazione a raggi X



**Figura 5.14 - Confronto tra spettri XRD a bassi angoli del supporto tal quale e caricato**



**Figura 5.15 - Pattern di diffrazione del supporto SBA-15 caricato in CO<sub>2</sub> supercritica**

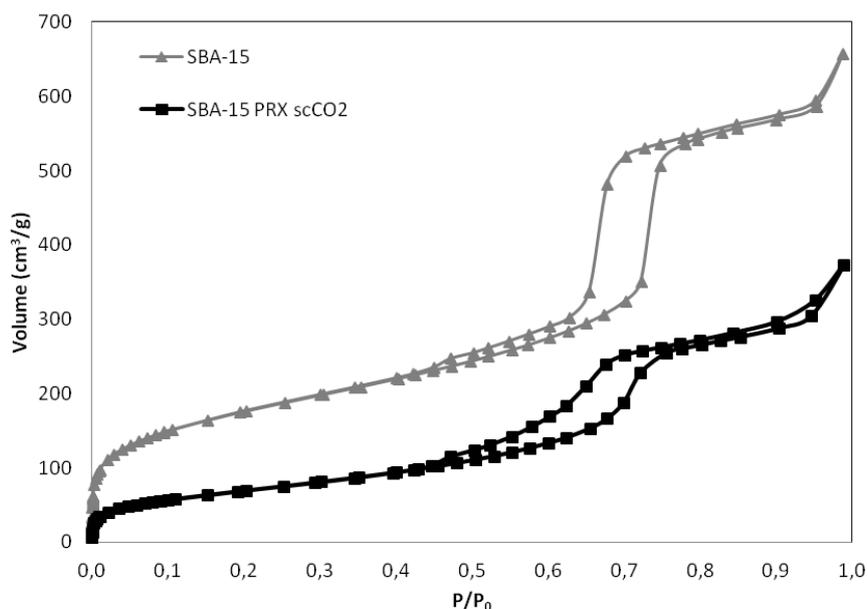
Anche in questo caso, viene riportato lo spettro di diffrazione a bassi angoli e ad alti angoli dello stesso materiale, al fine di una descrizione più dettagliata.

Di estremo interesse è il grafico riportato in figura 5.14, dove viene mostrato lo spettro a bassi angoli della silice SBA-15 incorporata tramite CO<sub>2</sub> supercritica. Da analisi diffrattometrica emerge la totale assenza di picchi nel sistema caricato di piroxicam. L'evidenza sperimentale sembrerebbe quella di un collasso totale della struttura, il che però non sembra essere confermato dalle immagini di microscopia elettronica. Un'interpretazione alternativa potrebbe essere quella di un riempimento dei pori in misura considerevole, con scomparsa dei riflessi, indice di grande quantità di farmaco incorporato e amorfizzato che fa variare i picchi di diffrazione, oppure la mancanza dell'ordine dei pori.

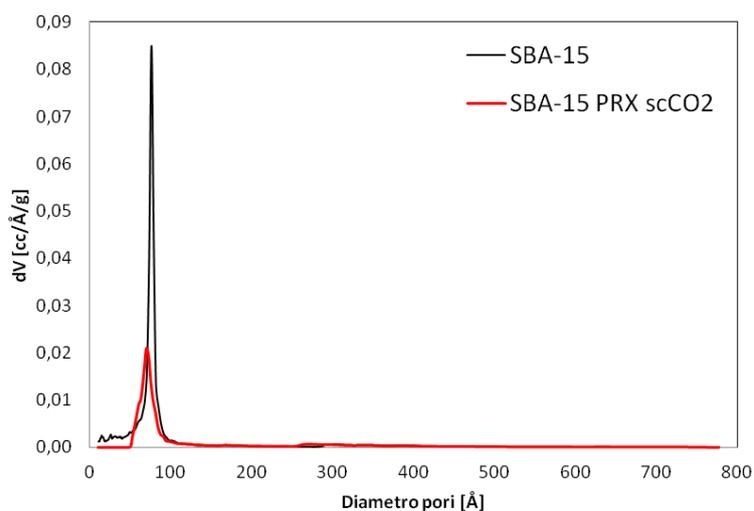
Riguardo gli alti angoli, in figura 5.15, anche in questo caso le evidenze sperimentali confermano la scomparsa di picchi relativi alla presenza di piroxicam in fase cristallina, con conseguente stato amorfo del farmaco. Viene ancora una volta garantita una rapida cinetica di rilascio a causa della minore forza spingente richiesta per la solubilizzazione.

- Analisi di adsorbimento di azoto

Nelle figure sottostanti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e la distribuzione porosimetrica del materiale caricato tramite CO<sub>2</sub> supercritica. Per una più facile comprensione dei dati, entrambe vengono messa a confronto col materiale non caricato.



**Figura 5.16 - Confronto tra isoterme di adsorbimento: SBA-15 tal quale e trattata in scCO<sub>2</sub>**



**Figura 5.17 - Distribuzioni porosimetriche del supporto tal quale e impregnato in scCO<sub>2</sub>**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale ( $m^2/g$ ), volume dei pori ( $cm^3/g$ ) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 5.17.

I dati vengono riportati in tabella 5.5, confrontati sempre col materiale vuoto:

**Tabella 5.5 - Valori caratteristici dell'SBA-15 a confronto**

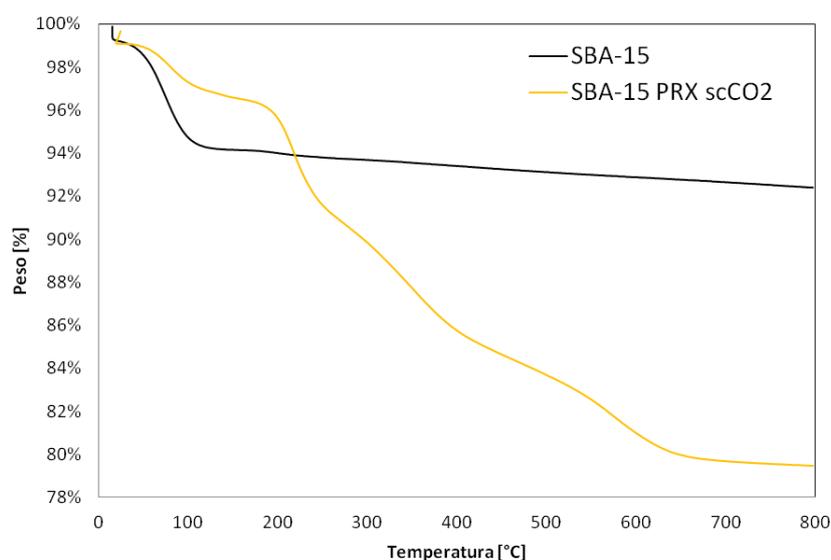
BET – SBA-15	SBA-15	SBA-15 PRX scCO <sub>2</sub>
<b>Surface area data</b>		
Multipoint BET	637 m <sup>2</sup> /g	253 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>		
Total Pore volume	1,02 cc/g	0,58 cc/g
<b>Pore size data</b>		
Average pore diameter	7,6 nm	7,0 nm

Anche in questo caso, come da figura 5.16, si può notare una diminuzione del volume libero a causa della presenza del piroxicam. La curva è sempre del IV tipo e non si osserva una particolare riduzione della pendenza. Tuttavia è evidente una notevole variazione della forma del coppia di isteresi del materiale caricato, indice di un elevato adsorbimento e una possibile variazione della mesostruttura in seguito al trattamento con CO<sub>2</sub> supercritica, evidenza riscontrata anche nell'analisi diffrattometrica. Dai dati in possesso sembra essersi verificato un ricoprimento omogeneo da parte del farmaco, a causa della forte riduzione dei tre parametri descritti in tabella 5.5.

Contrariamente a quanto accaduto nel caso della silice Grace, da distribuzione porosimetrica è visibile uno shift della distribuzione verso valori inferiori a quelli del materiale vuoto, rappresentativo di un parziale ed effettivo riempimento dei pori, ma anche di una loro occlusione. La riduzione è in una misura di 0,6 nm.

Riassumendo, da tabella 5.5 è possibile osservare come siano diminuiti tutti i valori a seguito dell'incorporazione. Ciò si verifica se le molecole si distribuiscono all'interno dei pori formando uno strato eterogeneo ma pur sempre molecolare.

- Analisi termogravimetrica



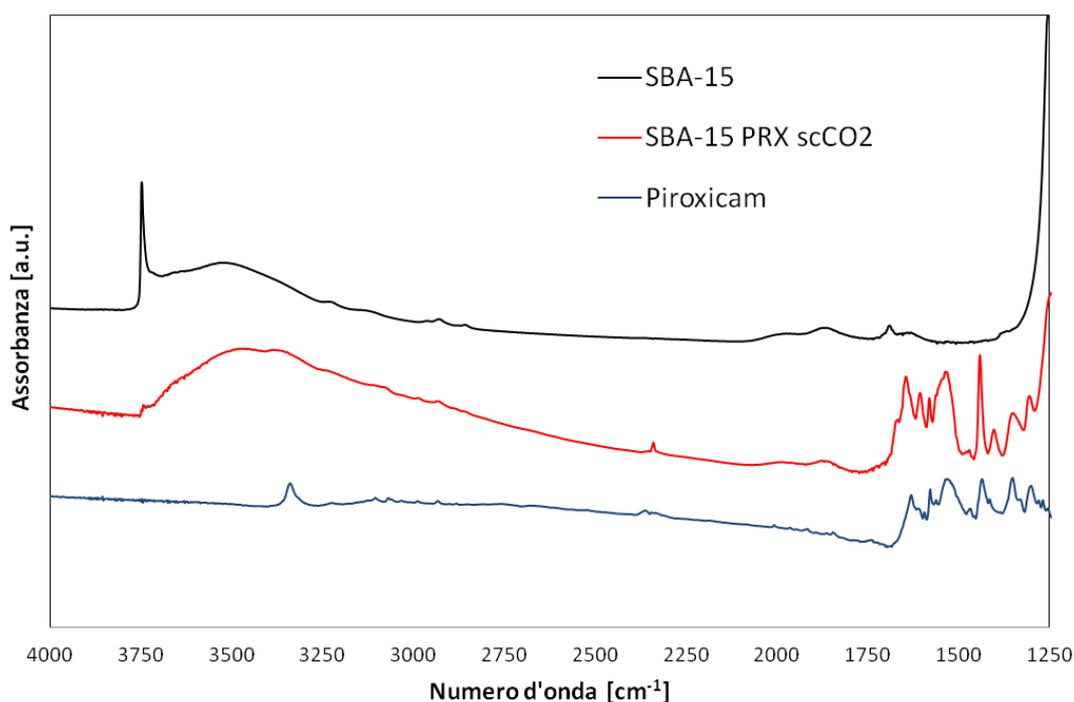
**Figura 5.18 - Analisi termogravimetrica - Confronto fra SBA-15 non trattata e post trattamento**

Come da figura 5.18, è possibile mettere in relazione la perdita di peso di una determinata specie chimica a ogni variazione di pendenza della curva. Al di sotto dei 150°C si ha perdita di acqua molecolare adsorbita, la quale si attesta attorno al 3%, coerentemente con l'idea che il sistema sia un po' meno idrofilico rispetto alla Grace. Il pattern è del tutto simile a quello del caso precedente: a partire da circa 170°C la variazione di peso è attribuibile al piroxicam, con una velocità di perdita di massa considerevole nell'intorno dei 200°C e circa costante fino ai 500°C, con successive perdite analoghe al caso della Grace al di sopra di questa temperatura. Al di sopra dei 600°C è presente un plateau fino agli 800°C, ovvero il termine della prova. In questo caso esso ha inizio a temperature maggiori rispetto al caso del carrier a mesoporosità non ordinata, probabilmente a causa di un maggior quantitativo di molecola attiva incorporata. Difatti, in questo caso si verifica una perdita di massa di piroxicam superiore e stimata al 15,34% in peso sul campione.

Il maggiore quantitativo di farmaco incorporato può essere messo in relazione con una minore idrofilicità dell'SBA-15, rispetto alla sua concorrente: l'idrofilicità porta a una peggiore interazione con il piroxicam, quindi ad un minore quantitativo impregnato.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 5.19 è presente lo spettro infrarosso della silice SBA-15 caricata tramite CO<sub>2</sub> supercritica.



**Figura 5 - Confronto degli spettri infrarossi del farmaco, supporto pre e post trattamento in scCO<sub>2</sub>**

Come avvenuto nel caso della silice Grace, si può osservare l'assenza dello stretching dell'NH, quindi l'avvenuta amorfizzazione del farmaco e si può notare la presenza delle bande di

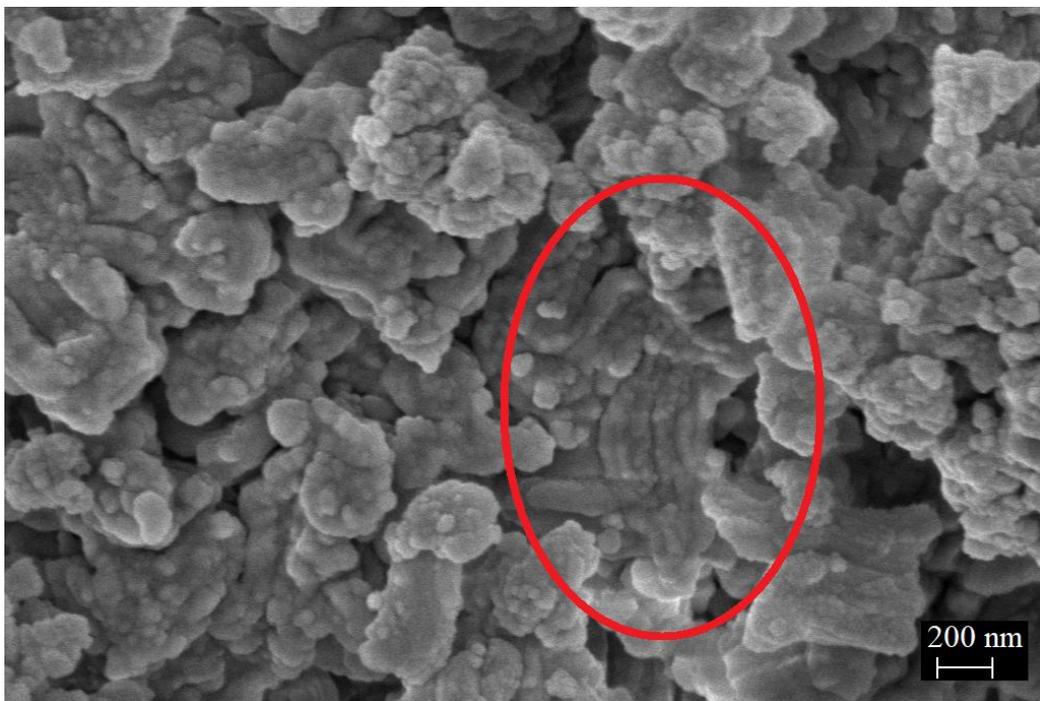
assorbimento del piroxicam riflesse nel materiale caricato tramite CO<sub>2</sub> supercritica. Se vengono confrontati i due spettri dei materiali caricati si può facilmente notare come le bande di assorbimento nell'intorno dei 1500 cm<sup>-1</sup>, correlate al farmaco incorporato, siano più intense nel caso della silice SBA-15, indice di un'elevata quantità di piroxicam presente nel sistema. In più, la zona dei silanoli isolati e interagenti, nel caso della silice a mesoporosità ordinata, abbia subito una profonda modificazione rispetto al materiale vuoto: inizialmente viene mostrata una elevata quantità di silanoli isolati rispetto agli interagenti ma, in seguito all'impregnazione, si verifica un ribaltamento. Quest'evidenza sperimentale è indice di un'elevata interazione tra il farmaco e la superficie della silice e ciò mette ancora una volta in risalto la minore idrofilicità di questo supporto. Ulteriori confronti a riguardo verranno approfonditi nel capitolo 6.

Anche in questo caso, la curva rossa relativa al materiale caricato tramite CO<sub>2</sub> supercritica mostra una finestra di Evans in corrispondenza di circa 3410 cm<sup>-1</sup>, il che riflette ancora una volta l'alta interazione tra piroxicam e carrier, considerando tutte le conseguenze descritte nel paragrafo relativo allo spettro infrarosso della Grace quali, ad esempio, formazione di legame H con i proton donor del farmaco.

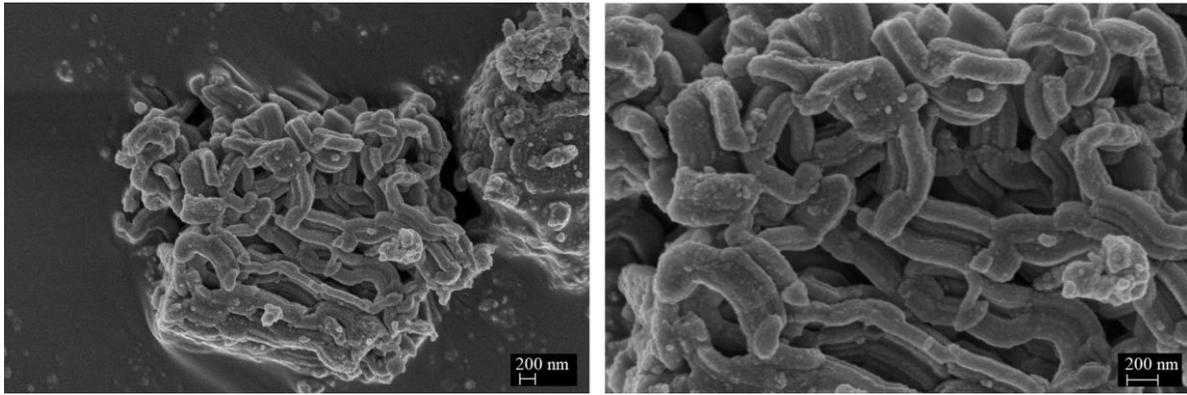
Lo spettro in figura 5.19 si presenta nuovamente privo di inquinamenti, confermando che l'incorporazione del farmaco tramite fluido supercritico sia un metodo green.

- Microscopia elettronica a scansione

Al fine di valutare lo stato morfologico del supporto a seguito dell'incorporazione del farmaco sono state effettuate delle analisi al microscopio SEM.



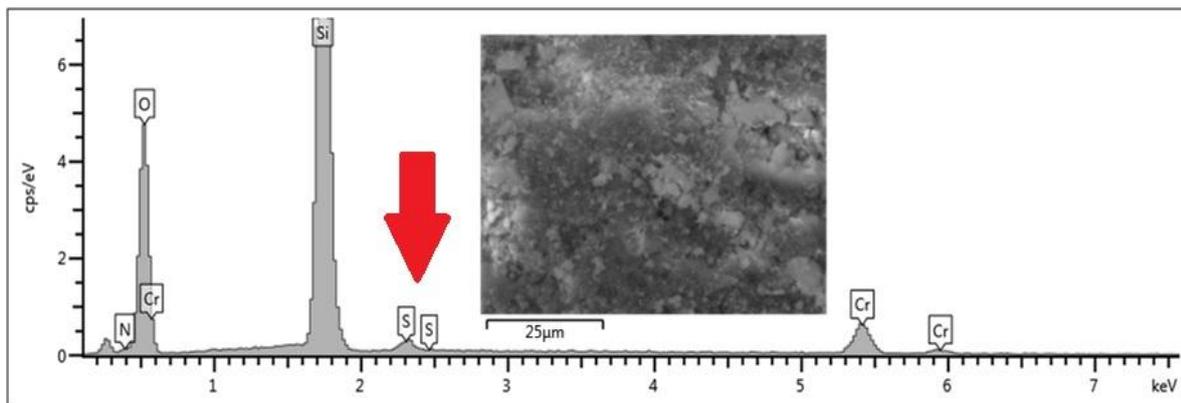
**Figura 5.20 - Immagine FESEM dell'SBA-15 post trattamento in scCO<sub>2</sub>**



**Figura 5.21 - FESEM: SBA-15 post scCO<sub>2</sub>. A destra un ingrandimento**

Queste immagini risultano di grande importanza, in quanto confermano che il trattamento non abbia in realtà modificato la mesostruttura della silice, come ipotizzato da analisi diffrattometrica a raggi X. La figura 5.20, infatti, evidenzia una zona cerchiata nella quale è presente la struttura filamentosa della silice SBA-15 che si mantiene inalterata a seguito del *drug loading*. Tuttavia si evidenziano zone nelle quali il carrier si ritrova ricoperto dal piroxicam, il che potrebbe dare una spiegazione alla scomparsa dei riflessi nell'analisi XRD condotta su questa tipologia di campione.

Anche in questo caso è stata effettuata un'analisi EDS per confermare la presenza del farmaco sul carrier.



**Figura 5.22 - Spettroscopia EDS del supporto SBA-15 impregnato tramite scCO<sub>2</sub>**

Da quest'analisi emerge la presenza di una sufficiente quantità di farmaco, superiore al caso della Grace trattata tramite CO<sub>2</sub> supercritica, a fronte del fatto che sia stata rilevata la presenza di azoto, atomo piccolo che normalmente non riesce ad arrivare al detector se non in alte quantità.

**Tabella 5.6 - Elementi presenti sul supporto SBA-15 impregnato tramite scCO<sub>2</sub>**

Elemento	Atomica %
N	2.28
O	62.80
Si	34.10
S	0.81
Totale	100.00

## 5.4 Adsorbimento da etanolo

Come detto precedentemente, l'incorporazione del piroxicam è stata ottenuta anche mediante due tecniche classiche.

L'adsorbimento del farmaco viene effettuato mediante contatto con una soluzione di etanolo, a temperatura ambiente, all'interno di un recipiente e sotto continua agitazione magnetica per 48h. La metodologia di impregnazione è stata spiegata nel paragrafo 4.3.

Per poter recuperare la silice sul fondo del pallone è stata eseguita una filtrazione, la quale rende oltretutto possibile la separazione del surnatante dal materiale. È proprio grazie a questo che viene determinata, tramite analisi di spettroscopia UV-VIS, la quantità di farmaco incorporata nel carrier. Conoscendo le quantità di silice utilizzata, di etanolo e di piroxicam, si può facilmente capire come la quantità di quest'ultimo che impregna il supporto sia funzione della concentrazione di farmaco all'interno del surnatante.

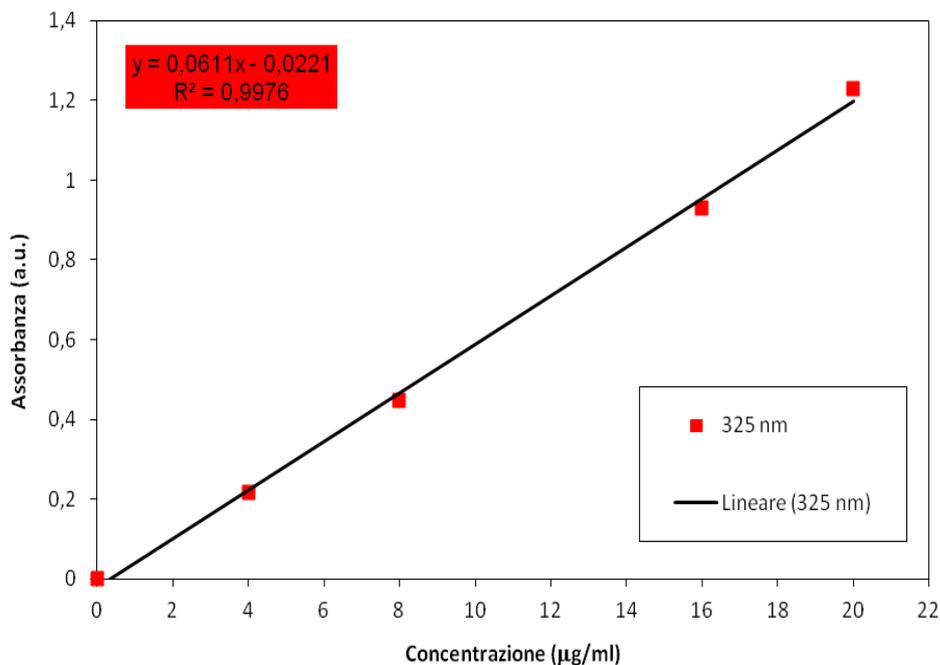
Al fine di poter calcolare le quantità in gioco è stata costruita una retta di taratura, in modo tale da poter mettere in relazione il valore dell'assorbimento UV-VIS con delle soluzioni a concentrazione nota.

Essendo inizialmente i valori di assorbanza troppo elevati, quindi non elaborabili, è stata effettuata una diluizione 1:100, il che ha permesso di valutare al meglio la quantità di farmaco residua all'interno della soluzione. La retta è stata costruita partendo da una soluzione madre di piroxicam in etanolo con concentrazione di 1 mg/ml e successivamente diluita per ottenere delle soluzioni figlie, i cui valori di concentrazione sono riassunti nella tabella seguente:

**Tabella 5.7 - Concentrazioni delle soluzioni utilizzate per l'ottenimento della retta di taratura**

<b>Soluzione</b>	<b>Concentrazione</b>
Soluzione MADRE	1 mg/ml
Soluzione 1	20 µg/ml
Soluzione 2	16 µg/ml
Soluzione 3	8 µg/ml
Soluzione 4	4 µg/ml

Misurando poi l'assorbanza di ciascuna soluzione figlia si è potuto costruire la corrispondente retta di taratura.

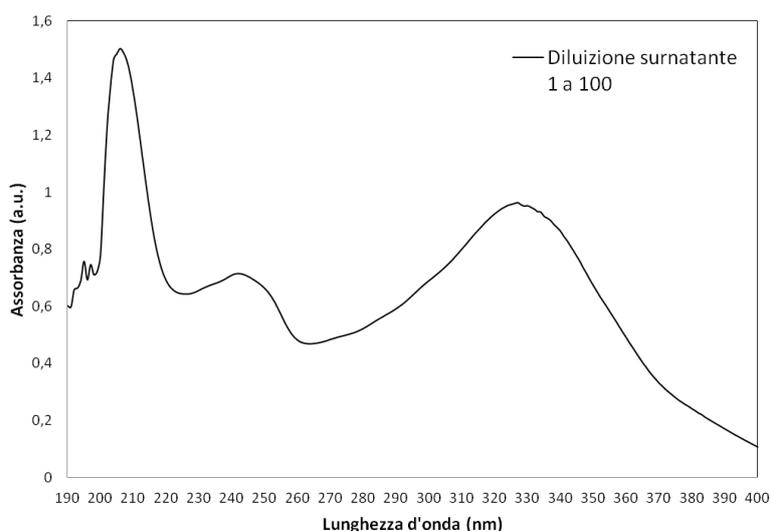


**Figura 5.236 - Retta di taratura del piroxicam in etanolo**

In questo modo è stato possibile ricavare la quantità di farmaco presente nel surnatante tramite i valori di assorbanza alla lunghezza d'onda di  $\lambda=325$  nm, utilizzando la retta ottenuta di equazione:

$$y = 0,611x - 0,0221$$

dove y è il valore di assorbanza a quella determinata lunghezza d'onda e il valore incognito della concentrazione, x, viene ricavato tramite formula inversa.



**Figura 5.24 - Spettro UV-VIS del surnatante diluito. Il valore di assorbanza corrisponde al massimo in corrispondenza dei 325 nm**

L'utilizzo di questa procedura permette di stimare la quantità di farmaco adsorbito sulla silice. Viene in aiuto l'*encapsulation efficiency (EE%)*, che esprime la quantità incorporata nel materiale in relazione a quella inserita in soluzione, usando la formula:

$$Encapsulation\ efficiency\ (\%) = \frac{W_{feed} - W_{free}}{W_{feed}} \cdot 100$$

dove:

- $W_{feed}$  è la quantità di farmaco inserita in soluzione;
- $W_{free}$  è la quantità di farmaco rimasta nel surnatante, valore calcolato tramite retta di taratura;

I dati relativi a quest'elaborato, per la sola tecnica di adsorbimento da etanolo, si trovano in tabella 5.8:

**Tabella 5.8 - Valori numerici dei due supporti impregnati tramite adsorbimento da soluzione**

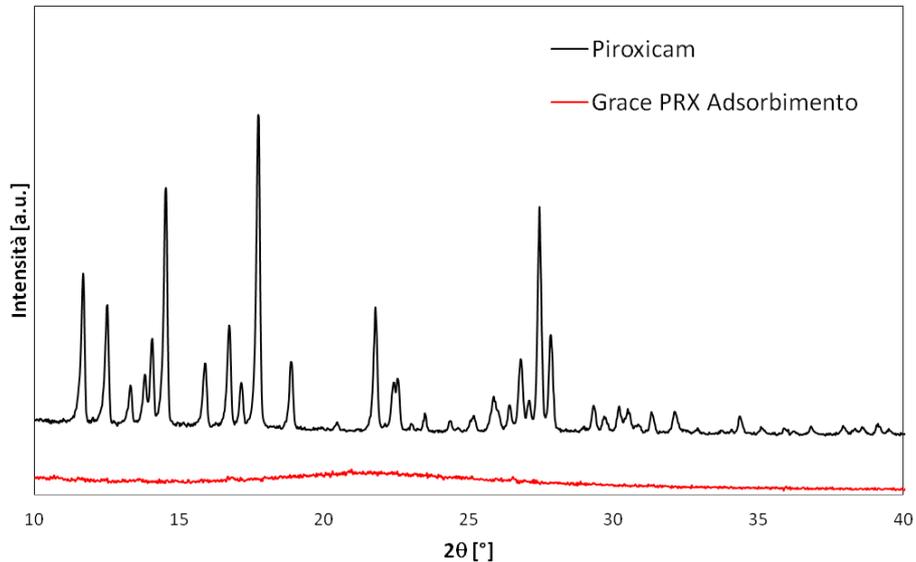
	<b>Encapsulation efficiency</b>
<b>Grace GMP</b>	20,86 %
<b>SBA-15</b>	63,57 %

Essendo partiti dalle medesime quantità in peso di carrier, farmaco ed etanolo, questi dati evidenziano che l'SBA-15 ha una maggiore affinità per il farmaco sulla superficie del carrier, rispetto alla silice Grace e che l'equilibrio  $Piroxicam_{soluzione} + SiO_2 = Piroxicam_{adsorbito}$  sia più spostato verso destra nel caso del supporto a mesoporosità ordinata.

## 5.4.1 Caratterizzazione

### 5.4.1.1 Grace GMP

- Diffrazione a raggi X

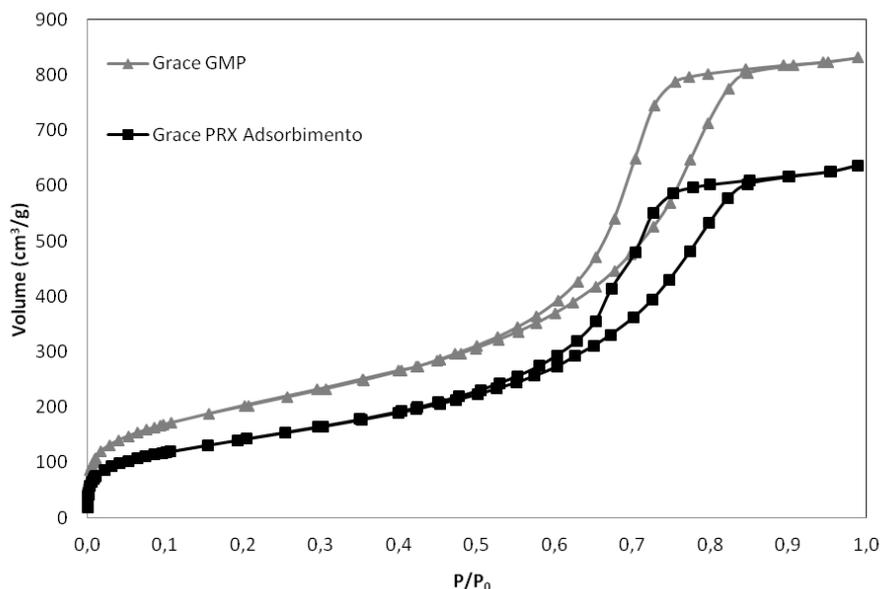


**Figura 5.25 - Pattern di diffrazione della silice Grace impregnata tramite adsorbimento da etanolo**

Nella figura 5.25 viene riportato il diffrattogramma ad alti angoli per la silice Grace GMP incorporata tramite adsorbimento da soluzione. Dal grafico è evidente come, anche utilizzando una tecnica classica, il farmaco raggiunga uno stato non cristallino, garantendo ancora una volta il rapido rilascio.

- Analisi di adsorbimento di azoto

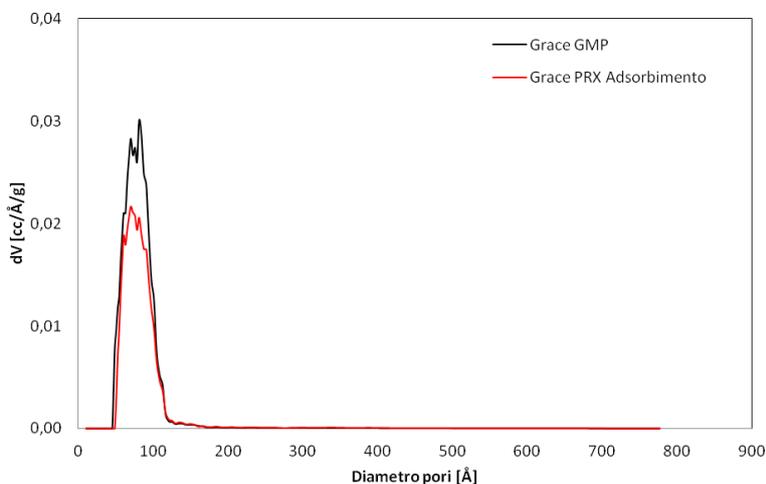
Nelle figure sottostanti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e la distribuzione porosimetrica del materiale caricato tramite adsorbimento da etanolo. Per una più facile comprensione dei dati, entrambe vengono messa a confronto col materiale non caricato.



**Figura 7 - Confronto fra isoterme di adsorbimento: Grace tal quale e impregnata in adsorbimento da etanolo**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale ( $\text{m}^2/\text{g}$ ), volume dei pori ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 5.27.

I dati vengono riportati in tabella 5.9, in confronto col materiale vuoto.



**Figura 8 - Confronto fra distribuzioni porosimetriche**

Secondo figura 5.26, la curva nera relativa al materiale caricato può essere vista come quasi una traslazione della curva di adsorbimento del materiale vuoto. Le due curve sono pressoché identiche nella forma, sono entrambe del IV tipo e soprattutto, sono uguali nella forma del coppia di isteresi. Da ciò si può già desumere che la quantità di farmaco incorporata sia veramente modesta.

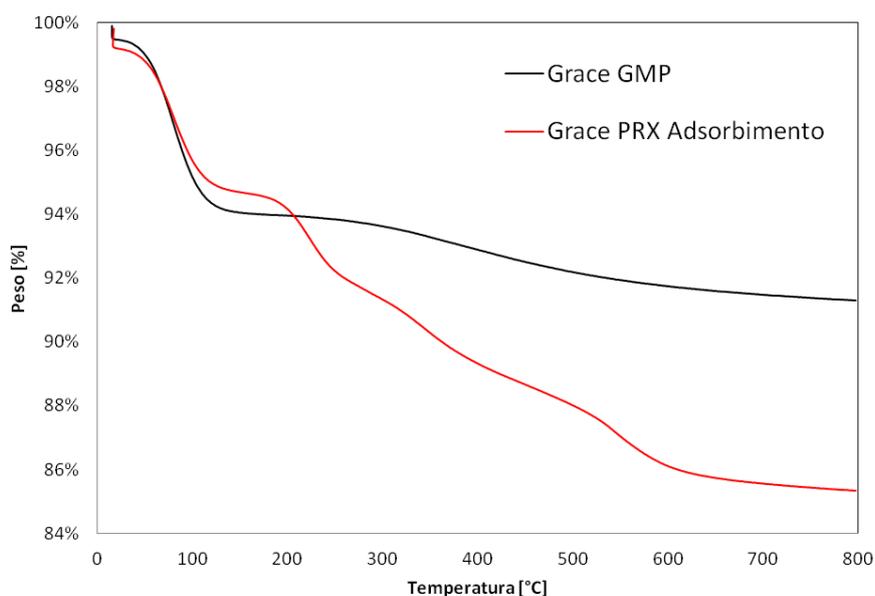
**Tabella 5.9 - Valori caratteristici a confronto**

BET – Grace	Grace GMP	Grace adsorbimento PRX
<b>Surface area data</b>		
Multipoint BET	732 m <sup>2</sup> /g	516 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>		
Total Pore volume	1,29 cc/g	0,99 cc/g
<b>Pore size data</b>		
Average pore diameter	7,6 nm	7,0 nm

La variazione in termini numerici non è molto elevata, ma comunque sufficiente per poter affermare che è presente qualche segno di adsorbimento. Tra tutti i valori, la riduzione maggiore è relativa all'area superficiale, ma riguardo al volume c'è stato un cambiamento quasi trascurabile, indice di una parziale occupazione da parte della molecola del farmaco. Riguardo il diametro dei pori, secondo analisi DFT sembrerebbe esserci un parziale riempimento, ipotesi non confermata però dalla distribuzione porosimetrica a causa dell'assenza di shift della curva. Anche in questo caso si ha una occlusione delle mesoporosità più grandi.

La bassa quantità di farmaco incorporato potrebbe essere messa in relazione all'utilizzo di etanolo come solvente che, in qualche modo, potrebbe ostacolare l'ingresso del piroxicam all'interno dei pori. Tuttavia, già nel caso dell'incorporazione tramite CO<sub>2</sub> supercritica, è stata già osservata la mancanza di uno shift della distribuzione.

- Analisi termogravimetrica



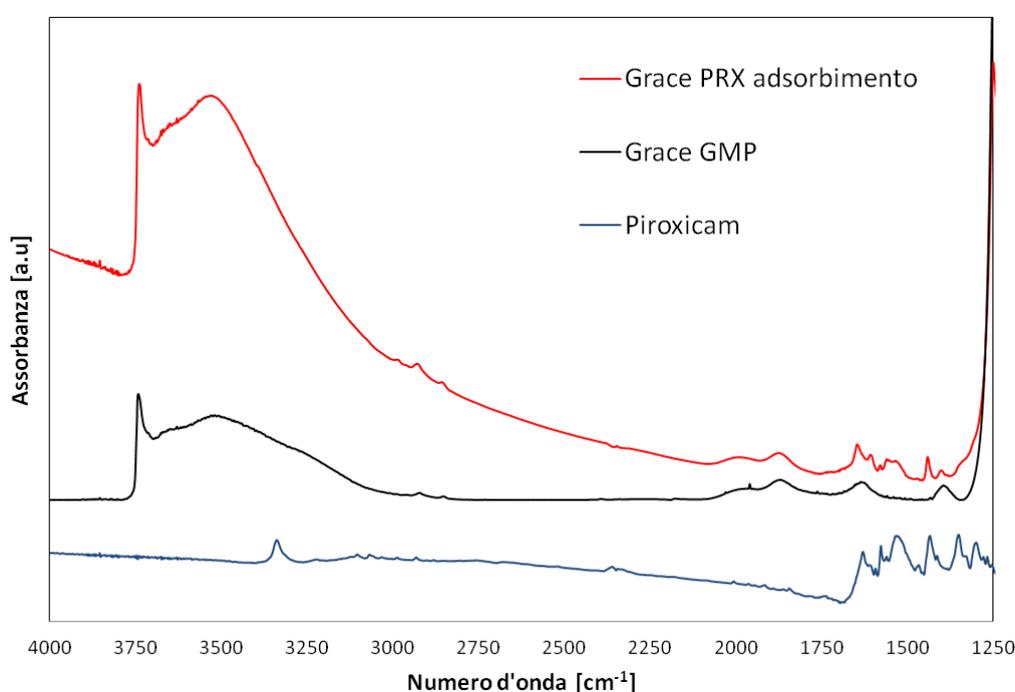
**Figura 9 - Analisi termogravimetrica. Confronto pre e post trattamento**

In figura 5.28 è possibile osservare la curva relativa all'analisi termogravimetrica della silice Grace impregnata tramite adsorbimento da etanolo. Si ha una perdita iniziale del 5%, attribuibile ad acqua molecolare, ma anche ad un eventuale residuo di solvente, al di sotto dei 150°C.

La curva rossa ha una leggera differenza rispetto al materiale vuoto, dovuto probabilmente alla presenza del farmaco in quantità basse. La successiva perdita di peso al di sopra dei 170°C di circa 9% è attribuibile al farmaco, considerando l'eventuale perdita di acqua a causa della condensazione dei silanoli. La curva raggiunge un plateau per temperature inferiori ai 600°C dopo una leggera pendenza. Quest'ultima può essere presa in considerazione come indice della quantità di farmaco incorporata, a livello di confronto, analizzato nel capitolo 8.

La quantità di farmaco stimata tramite questa analisi è del 6,60% in peso del materiale.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier



**Figura 5.29 - Confronto fra spettri IR: supporto pre e post trattamento e piroxicam in KBr**

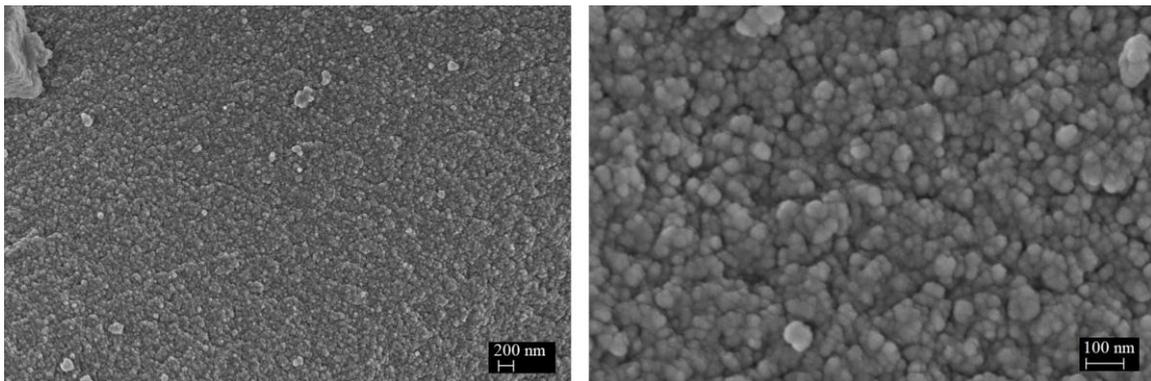
In figura 5.29 viene riportato lo spettro infrarosso relativo alla silice Grace incorporata tramite metodo tradizionale di adsorbimento da etanolo. Come atteso, la curva relativa all'incorporato mostra delle bande, nell'intorno dei 1500  $\text{cm}^{-1}$ , riconducibili chiaramente al farmaco. Scompare la banda relativa allo stretching del gruppo NH, quindi si desume lo stato amorfo del farmaco. È interessante notare come l'intensità relativa dei silanoli isolati rispetto agli interagenti non sia variato di molto rispetto al materiale vuoto, indice di una modesta quantità di legami idrogeno coinvolti tra la superficie della Grace e il piroxicam.

Considerando la bassa intensità di assorbimento ad alti numeri d'onda, la piccola variazione del rapporto relativo fra silanoli e la mancanza di una risonanza di Fermi, come accaduto per

l'incorporazione tramite fluido supercritico, si può già evidenziare come anche la spettroscopia infrarossa abbia evidenziato una scarsa quantità di piroxicam impregnato sulla Grace e, soprattutto, una bassa interazione tra farmaco e supporto. Ulteriori confronti in merito verranno trattati nell'ottavo capitolo.

- Microscopia elettronica a scansione

Nelle figure sottostanti sono presenti le immagini relative al supporto Grace GMP impregnato tramite adsorbimento da etanolo.

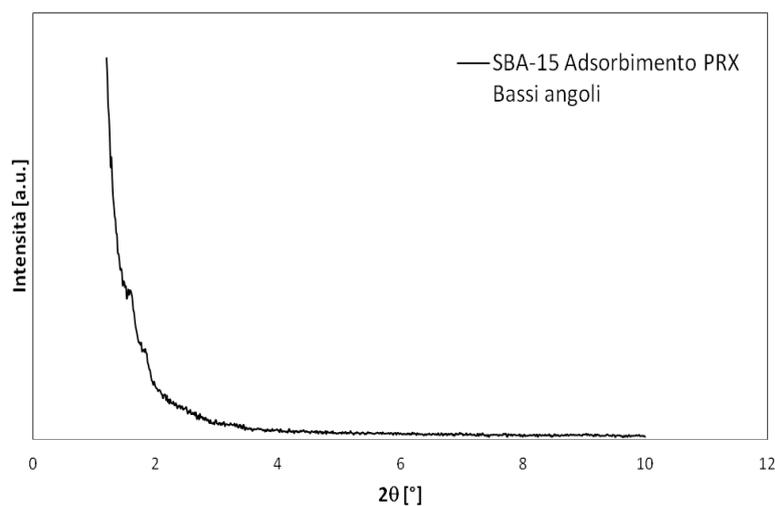


**Figura 10 - Immagini FESEM della silice Grace GMP post loading. Due diversi ingrandimenti.**

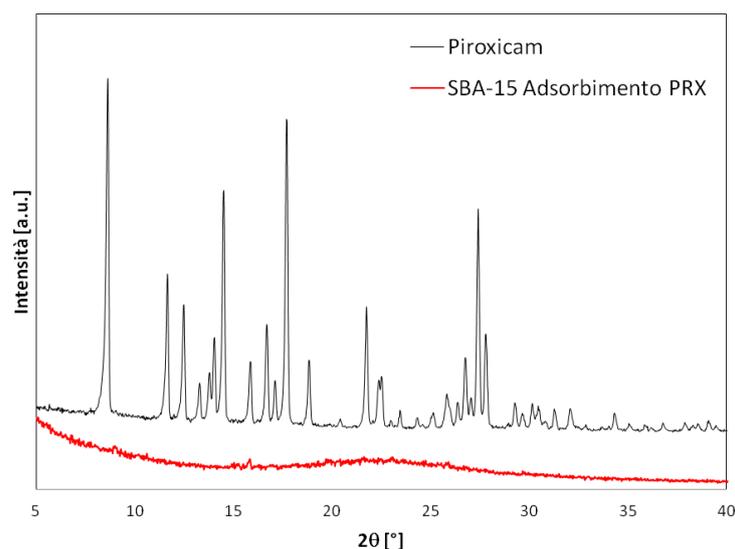
Dall'analisi non sono emerse particolari differenze tra il materiale tal quale e il carrier incorporato di piroxicam.

#### 5.4.1.2 SBA-15

- Diffrazione a raggi X



**Figura 11 - Pattern di diffrazione a bassi angoli della silice SBA-15 post impregnazione**



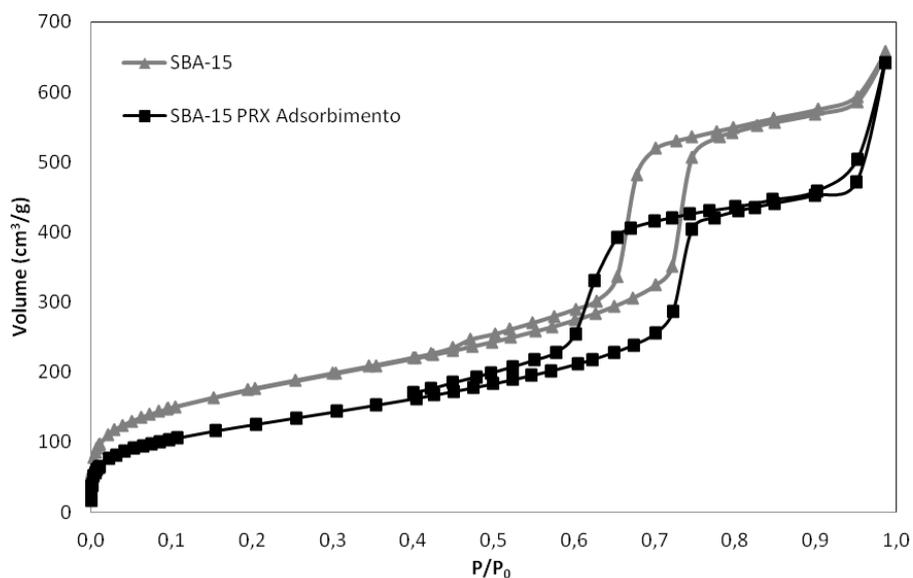
**Figura 12 - Confronto spettri XRD ad alti angoli**

Nelle due figure sovrastanti vengono mostrati i diffrattogrammi ad alti e bassi angoli per la silice SBA-15 incorporata tramite adsorbimento da soluzione. In figura 5.31 è possibile notare come i riflessi relativi al materiale tal quale si siano mantenuti anche nella silice incorporata. Tali picchi risultano un po' nascosti e leggermente meno visibili, si stanno andando a perdere i riflessi, a causa della presenza del piroxicam. Tale evidenza può essere interpretata come un ricoprimento parziale da parte del farmaco, il quale si presenta in quantità non sufficienti per far scomparire del tutto i picchi correlati al carrier. A tal proposito si può aggiungere che l'adsorbimento da soluzione non abbia modificato la struttura morfologica della silice.

In figura 5.32 è invece riportato un confronto tra il farmaco in fase cristallina e il supporto impregnato di farmaco. L'assenza di picchi porta alla conclusione che il piroxicam abbia raggiunto la fase amorfa, causa presenza di un alone diffuso tra valori di  $2\theta$  compresi tra i  $15^\circ$  e i  $30^\circ$ .

- Analisi di adsorbimento di azoto

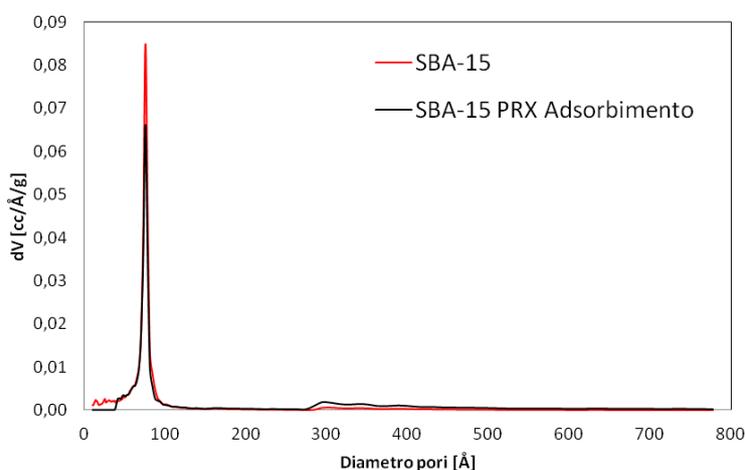
Nelle figure sottostanti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e la distribuzione porosimetrica del materiale caricato tramite adsorbimento da etanolo. Per una più facile comprensione dei dati, entrambe vengono messa a confronto col materiale non caricato.



**Figura 13 - Isotherme di adsorbimento a confronto: tal quale e post impregnazione**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale ( $m^2/g$ ), volume dei pori ( $cm^3/g$ ) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 5.34.

I dati vengono riportati in tabella 5.10, in confronto col materiale vuoto.



**Figura 5.34 - PSD della silice SBA-15 pre e post loading. Confronto.**

Le curve relative all'analisi BET in figura 5.33 mostrano una differenza minima tra i due materiali testati. In particolare la curva relativa all'impregnato si mantiene del IV tipo, non si osserva alcuna variazione della pendenza e la forma si è mantenuta uguale, sia per il materiale vuoto che per quello caricato. Ciò porta ad affermare che la porosità è rimasta dello stesso tipo.

Dall'analisi emerge però un dato molto interessante: oltre al solito shift della curva verso valori di volume libero inferiori, si può notare come il coppia di isteresi abbia subito un allargamento, andando a ricoprire un intervallo di valori del rapporto  $P/P_0$  più ampio. La presente dilatazione induce a pensare che si sia verificato un fenomeno di *swelling* delle particelle allungate dell'SBA-15, ovvero un rigonfiamento delle stesse.

Sempre in riferimento alla curva nera in figura 5.33, oltre valori delle ascisse pari a 0,9 si osserva una non corretta sovrapposizione delle curve di adsorbimento e desorbimento, quasi a formare un piccolo coppia secondario. Quest'ultimo può essere interpretato come presenza di porosità interparticellare, derivante probabilmente dal metodo di incorporazione: le particelle di silice, stando in una soluzione sotto agitazione, potrebbero aver subito un fenomeno di cambio di stato di aggregazione delle stesse.

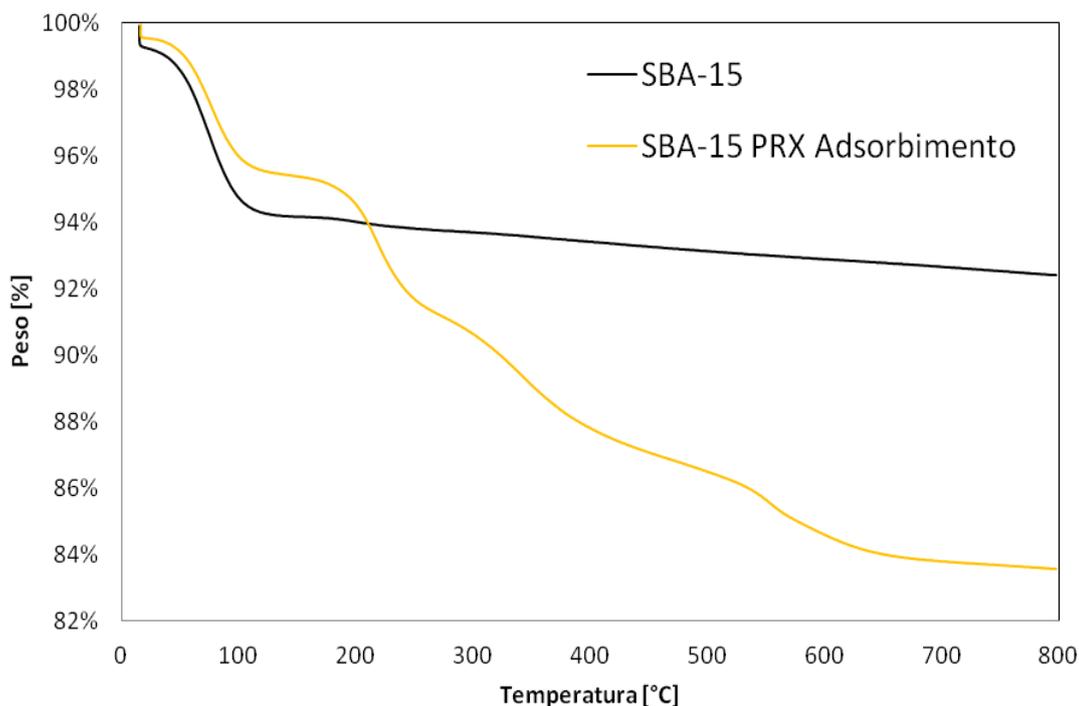
Quanto alla distribuzione porosimetrica in figura 5.34, essa mostra la coincidenza delle due curve relative al materiale vuoto e al materiale caricato, contrariamente a quanto avvenuto per l'incorporazione tramite  $CO_2$  supercritica. Tuttavia la PSD smentisce il presunto swelling dedotto dall'analisi delle curve di adsorbimento, in quanto non è presente un'evidenza di tale fenomeno, quale un'allargamento della distribuzione.

**Tabella 5.10- Valori caratteristici a confronto**

BET – SBA-15	SBA-15	SBA-15 Adsorbimento PRX
<b>Surface area data</b>		
Multipoint BET	637 m <sup>2</sup> /g	455 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>		
Total Pore volume	1,02 cc/g	0,99 cc/g
<b>Pore size data</b>		
Average pore diameter	7,6 nm	7,6 nm

In tabella 5.10 sono presenti i dati forniti dall'analisi BET. In questo particolare caso, i valori relativi all'area superficiale hanno subito una diminuzione, se pur non così eclatante. Il volume dei pori può essere considerato identico, in seguito ad arrotondamenti, mentre quelli relativi al diametro dei pori si sono mantenuti costanti. Considerando tutte le evidenze sperimentali, l'interpretazione dei dati porta ad affermare la presenza di un'occlusione dei pori dell'SBA-15.

- Analisi termogravimetrica



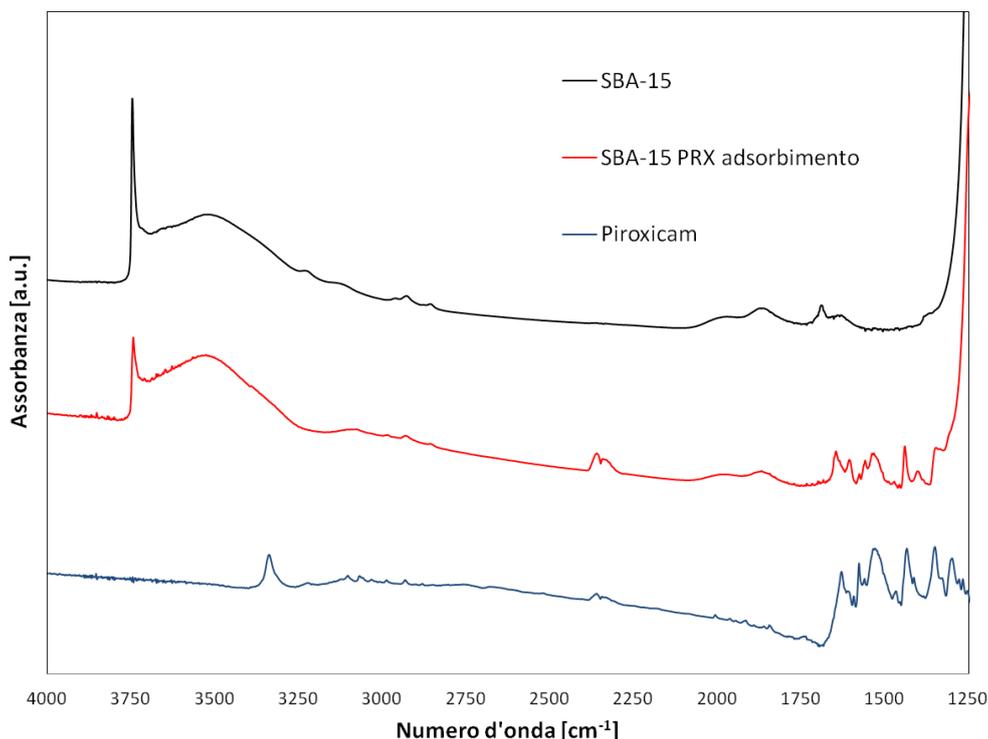
**Figura 14 - Confronto tra curve termogravimetriche: supporto tal quale e impregnato**

In figura 5.35 è possibile osservare la curva relativa all'analisi termogravimetrica della silice a mesoporosità ordinata, impregnata tramite adsorbimento da etanolo. Si può affermare come sia presente circa la stessa quantità di H<sub>2</sub>O molecolare nei due materiali: la quantità persa al di sotto dei 100°C da parte del supporto è paragonabile all'iniziale decremento di peso del 5% da parte dell'incorporato. Tale perdita è da attribuire non solo all'acqua molecolare, ma anche ad un eventuale residuo di solvente, al di sotto dei 150°C.

Diversamente da quanto avvenuto per la silice Grace, la curva correlata al supporto caricato ha più differenze rispetto al materiale tal quale, probabilmente a causa della maggiore idrofilia della silice SBA-15 la quale, proprio per questo motivo, trattiene una maggiore quantità di farmaco. Quest'ultimo fa variare la pendenza della curva per un intervallo compreso tra 170°C e 550°C, temperatura oltre la quale si raggiunge un plateau fino alla fine della prova.

La quantità di farmaco stimata tramite questa analisi è del 10,08% in peso del materiale.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier



**Figura 15 - Spettri IR a confronto: farmaco, supporto e impregnato**

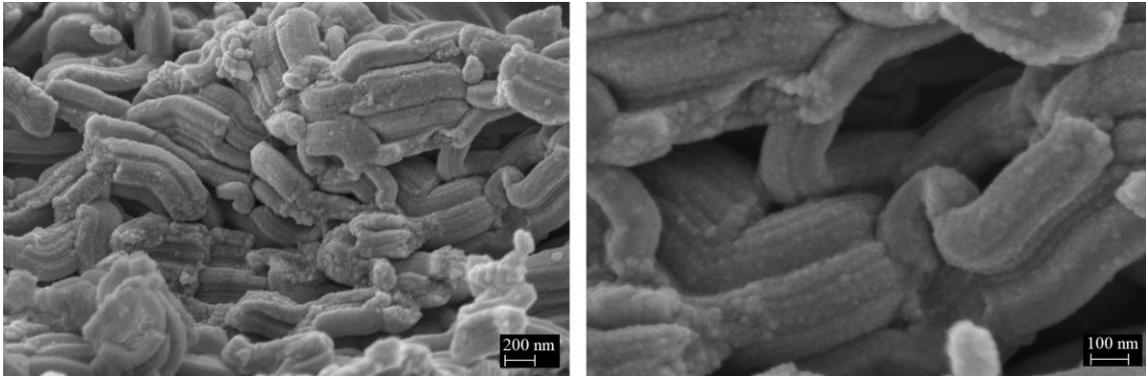
In figura 5.36 viene riportato lo spettro infrarosso relativo alla silice SBA-15 incorporata tramite metodo tradizionale di adsorbimento da etanolo.

Come auspicabile, le armoniche relative al farmaco sono presenti anche sul materiale caricato, mentre è invece assente lo stretching del gruppo NH, in quanto il farmaco si trova allo stato amorfo. Osservando lo spettro IR è interessante notare come l'adsorbimento del piroxicam abbia variato il rapporto relativo tra silanoli isolati e interagenti: il quoziente correlato al materiale vuoto risulta essere di gran lunga maggiore rispetto a quello in presenza di farmaco. L'interpretazione di ciò può essere effettuata pensando che gli ossidrili isolati abbiano interagito col farmaco (in riferimento alla molecola, ci sono molti accettori di legame idrogeno quali tutti gli ossigeni, il gruppo OH, tutti gli anelli benzenici). Gli Si-OH, non più visibili come silanoli liberi, risultano essere impegnati in qualche modo tramite legame idrogeno. L'identificazione dei gruppi coinvolti non è chiarissima, in quanto non sono presenti nuove bande relative alla formazione di un legame H col farmaco. Inoltre, la mancanza di una finestra di Evans mette in evidenza lo scarso legame tra farmaco e supporto. Si potrebbe ipotizzare che ci sia una certa quantità di etanolo residuo il quale, durante l'incorporazione, sia andato in competizione con l'adsorbimento del farmaco stesso.

Quello che sicuramente traspare dall'indagine spettroscopica è che siano presenti meno silanoli isolati rispetto agli interagenti, tramite legame idrogeno, in presenza del farmaco piuttosto che in sua assenza.

- Microscopia elettronica a scansione

Le immagini relative al piroxicam incorporato sulla SBA-15 tramite adsorbimento da etanolo sono riportate nelle figure sottostanti.



**Figura 16 - Immagini FESEM della silice SBA-15 post adsorbimento da etanolo. Due diversi ingrandimenti**

Contrariamente al caso del loading tramite CO<sub>2</sub> supercritica, quasi la totalità della struttura silicea non risulta essere ricoperta completamente di farmaco. In più la struttura sembra aver mantenuto le sue dimensioni, smentendo quello che sembrava essere uno swelling delle particelle del supporto.

### **5.5 Incipient wetness *impregnation***

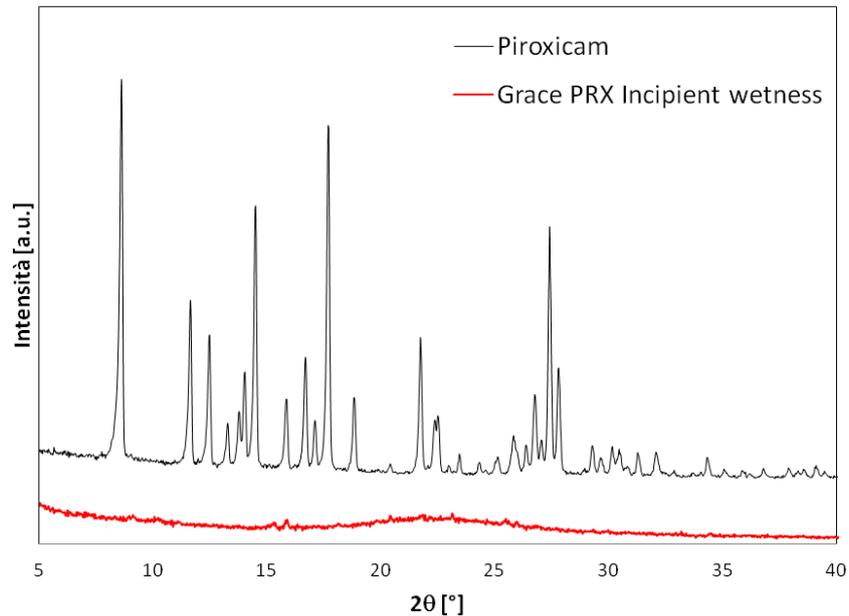
Come da paragrafo 4.2, l'incorporazione del farmaco tramite questa tecnica risulta essere più lunga in termini di tempo rispetto alle altre, soprattutto se fatta manualmente, in quanto si deve attendere l'evaporazione del solvente per effettuare una nuova impregnazione.

Questa volta non è presente un surnatante da analizzare, per cui la quantità di farmaco verrà stimata tramite analisi termogravimetrica, e non più tramite i valori teorici di *encapsulation efficiency* e *loading capacity* nel paragrafo 5.4.

## 5.5.1 Caratterizzazione

### 5.5.1.1 Grace GMP

- Diffrazione a raggi X

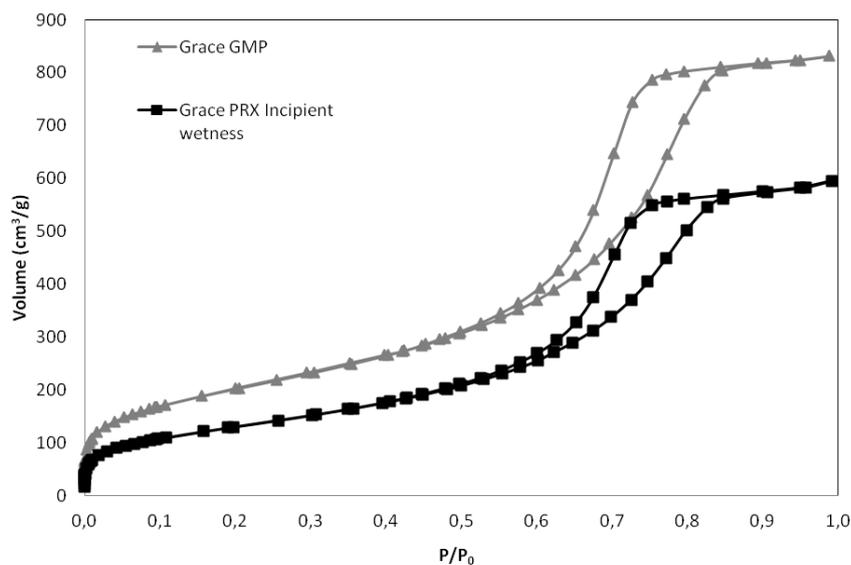


**Figura 17 - Confronto pattern XRD ad alti angoli tra farmaco e Grace GMP post incipient wetness impregnation**

Nelle due figure sovrastanti vengono mostrati i diffrattogrammi ad alti e bassi angoli per la silice Grace GMP incorporata tramite il tradizionale metodo *incipient wetness*. Dall'analisi XRD emerge come la tecnica non abbia variato la struttura morfologica della silice usata come supporto e che, anche tramite questo metodo, sia stata raggiunta l'amorfizzazione del farmaco, desumibile dalla presenza dell'alone diffuso nell'intervallo di  $2\theta$  pari a  $15^\circ$ - $30^\circ$ .

- Analisi di adsorbimento di azoto

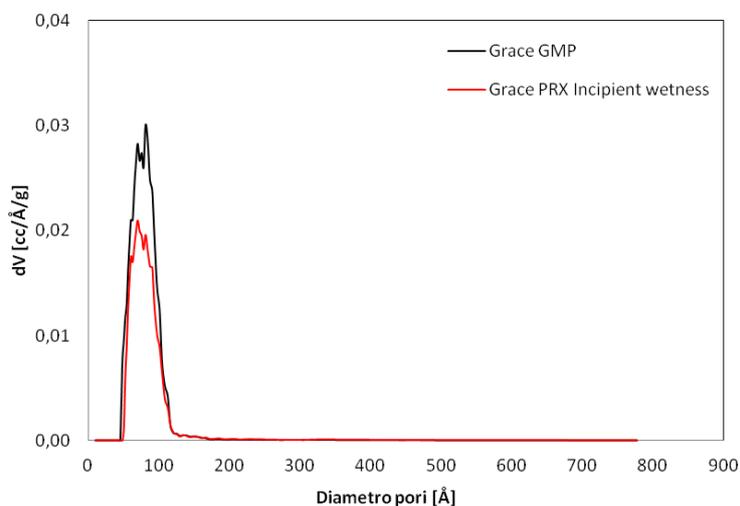
Nelle figure sottostanti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e la distribuzione porosimetrica della silice a mesoporosità non ordinata, caricata tramite *incipient wetness*. Per una più facile comprensione dei dati, entrambe vengono messa a confronto col materiale non caricato.



**Figura 18 - Confronto tra isoterme di adsorbimento**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale ( $m^2/g$ ), volume dei pori ( $cm^3/g$ ) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 5.39.

I dati vengono riportati in tabella 5.11, in confronto col materiale vuoto.



**Figura 19 - Confronto tra PSD pre e post impregnazione**

Se si osservano le curve di adsorbimento riportate in figura 5.39 si può desumere come la variazione tra materiale tal quale e quello caricato sia minima. Le due curve sono quasi identiche nella forma ed entrambe del IV tipo, è inoltre presente una leggera variazione dell'area, ma non nella forma, del cappio di isteresi.

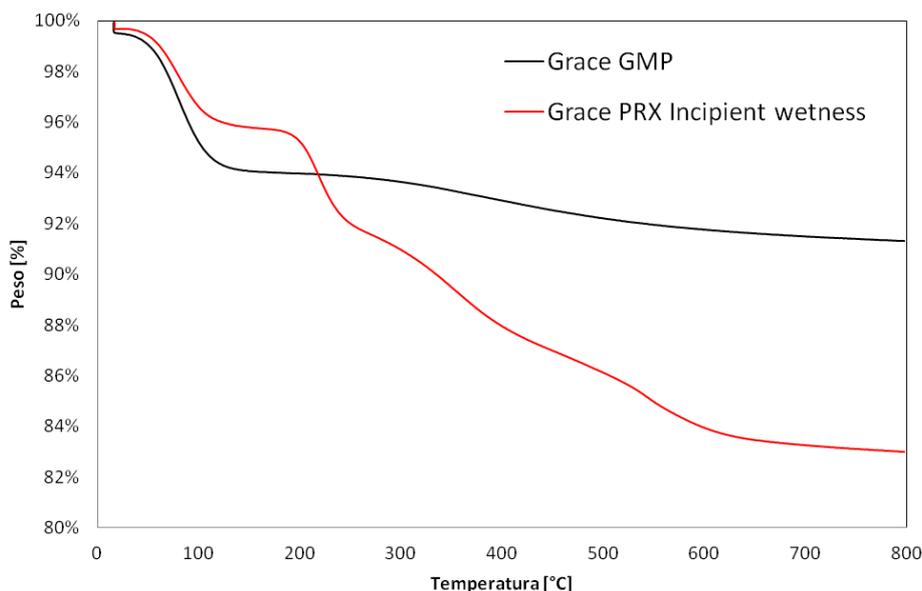
Le informazioni ricavabili dalla distribuzione porosimetrica sono quelle di assenza di modificazioni riguardo le dimensioni, causa mancanza di shift relativo tra le due curve. Esse piuttosto tendono a coincidere, con una diversa percentuale relativa di pori più grandi e pori più piccoli. La figura 5.40 sembra ancora una volta suggerire un'occlusione dei pori più grandi, pur mantenendo attivi i pori più piccoli e, a quanto sembra, inaccessibili al farmaco.

**Tabella 5.11 - Dati caratteristici a confronto in seguito al drug loading**

BET – Grace	Grace GMP	Grace PRX Incipient wetness
<b>Surface area data</b>		
Multipoint BET	732 m <sup>2</sup> /g	474 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>		
Total Pore volume	1,29 cc/g	0,92 cc/g
<b>Pore size data</b>		
Average pore diameter	7,6 nm	7,0 nm

La riduzione dei valori in tabella 5.11, a livello numerico, è maggiore per l'area superficiale, la quale mostra una riduzione di circa 35% rispetto al valore iniziale, mentre il volume dei pori si è ridotto di quasi un terzo. Non sono dei risultati ottimali ma bastano per giustificare una certa quantità di farmaco adsorbito.

- Analisi termogravimetrica



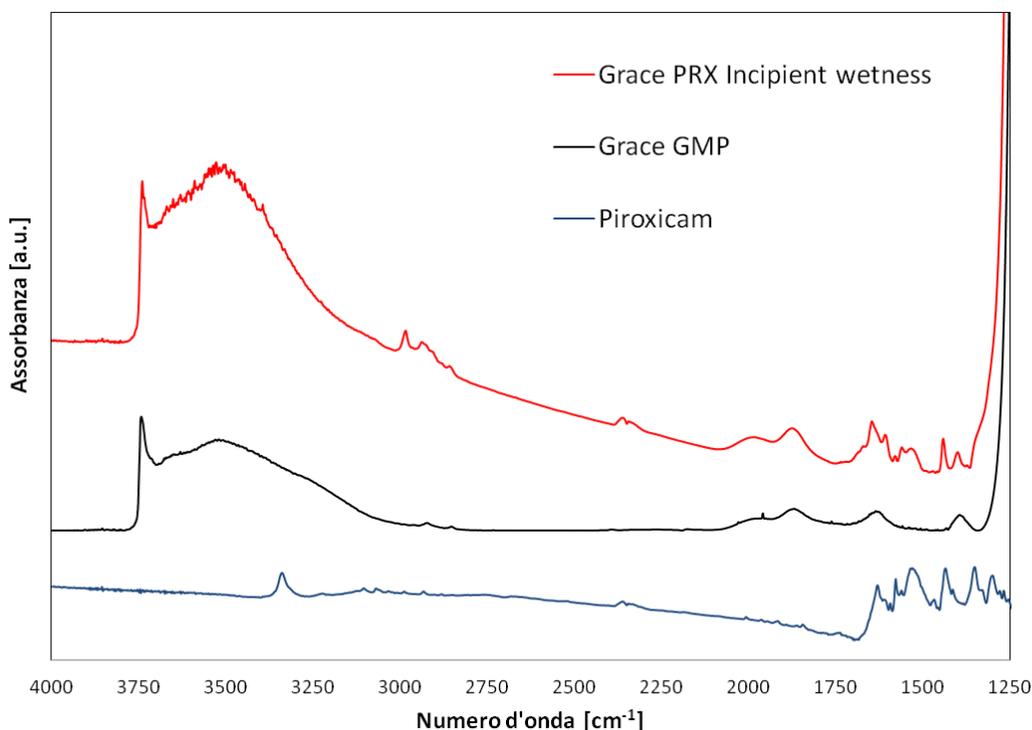
**Figura 5.41 - Confronto tra analisi termogravimetriche**

In figura 5.41 è possibile osservare la curva relativa all'analisi termogravimetrica della silice Grace impregnata tramite *incipient wetness*. Rispetto all'adsorbimento da soluzione, in questo caso la perdita di peso iniziale risulta essere leggermente minore, attestandosi ad un valore del 4%. Dato che il range di temperatura in esame è al di sotto dei 100°C, questa piccola differenza potrebbe dipendere da due fattori:

- Nella silice a mesoporosità non ordinata è presente una minore quantitativo di H<sub>2</sub>O molecolare, in luogo di una maggiore quantità di farmaco incorporata;
- Il tipo di metodo utilizzato varia la misura del residuo di solvente. L'*incipient wetness*, diversamente dall'adsorbimento, prevede che l'etanolo utilizzato evapori del tutto prima della successiva impregnazione. Essendoci una minore quantità in gioco è più facile che ci sia meno solvente residuo, poiché evaporato di volta in volta, rispetto ad un possibile interposizione dello stesso con il principio attivo, ovvero il farmaco (il quale difatti risulta essere presente in quantità maggiori).

La percentuale in peso persa dall'inizio della prova è di circa 18%, imputabili al solvente, ai silanoli del supporto e al farmaco. Quest'ultimo è stato stimato, tramite questa prova, al 10,06%

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

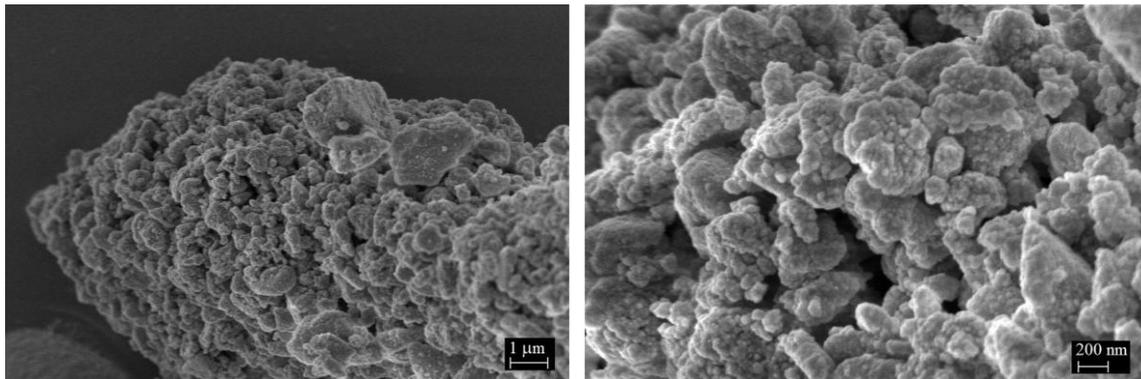


**Figura 5.42 - Spettri IR a confronto: piroxicam, supporto tal quale e caricato tramite incipient wetness impregnation**

In figura 5.42 viene riportato lo spettro infrarosso relativo alla silice Grace incorporata tramite *incipient wetness*.

La curva relativa all'incorporato mostra delle bande riconducibili al farmaco, assenza di stretching del gruppo NH e un rapporto relativo delle intensità rappresentative dei due tipi di silanoli quasi invariato rispetto al materiale tal quale, più spostato verso gli interagenti. Si sono quindi formati dei legami idrogeno tra Grace GMP e piroxicam in quantità sufficiente da dare segni di impregnazione.

- Microscopia elettronica a scansione

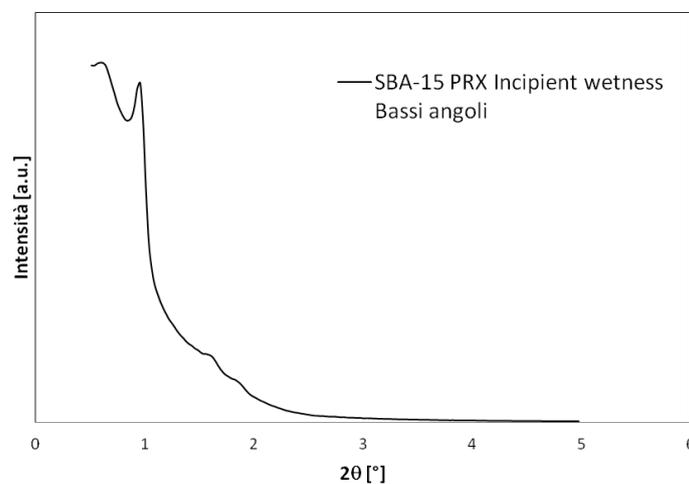


**Figura 5.43 - Immagini FESEM della Grace GMP post incipient wetness impregnation. Due diversi ingrandimenti**

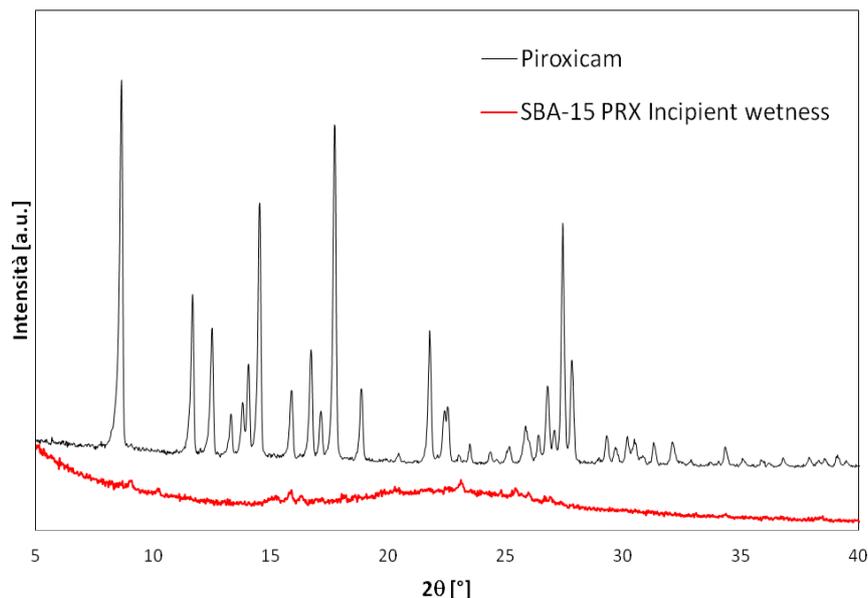
La struttura sembra aver mantenuto le sue caratteristiche morfologiche, paragonabili al materiale tal quale.

### 5.5.1.2 SBA-15

- Diffrazione a raggi X



**Figura 20**



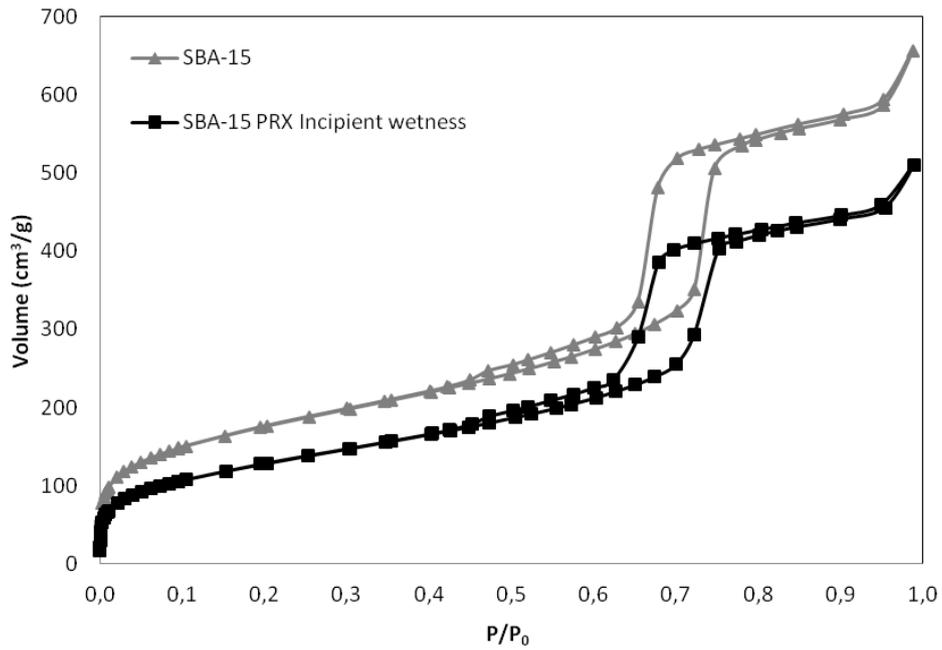
**Figura 21 - Confronto fra spettri XRD ad alti angoli**

Nelle due figure sovrastanti vengono raffigurati i diffrattogrammi ad alti e bassi angoli per la silice SBA-15 incorporata tramite *incipient wetness*. Dall'analisi emerge che il pattern di diffrazione a bassi angoli in presenza del farmaco possiede dei riflessi intensi propri del supporto. Normalmente le intensità sono minori in presenza di farmaco all'interno delle porosità, in quanto varia lo scattering della superficie. In questo caso, però, questa diversità sembra assolutamente casuale ed è possibile affermare che le intensità non abbiano alcun significato particolare. La presenza di questi picchi, comunque, può essere attribuita alla poca presenza di farmaco incorporato tramite *incipient wetness*, il quale non ha modificato la struttura sottostante della silice.

Il confronto tra farmaco e supporto impregnato in figura 5.45 evidenzia l'assenza di picchi di riflessione che portano alla definizione di una fase amorfa del piroxicam incorporato, il quale non produce picchi netti per nessun angolo.

- Analisi di adsorbimento di azoto

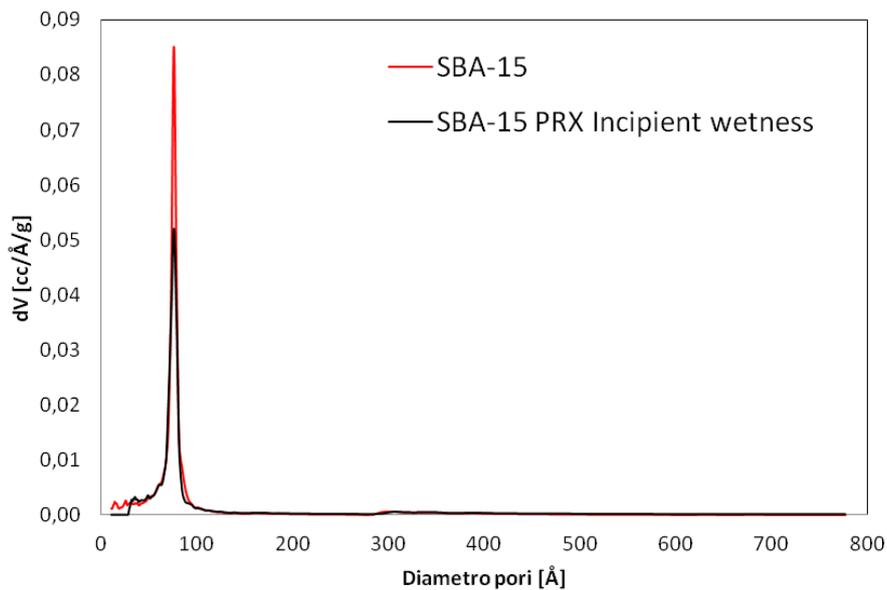
Nelle figure sottostanti vengono riportate le isoterme di adsorbimento e la distribuzione porosimetrica del materiale caricato tramite *incipient wetness*. Per una più facile comprensione dei dati, entrambe vengono messa a confronto col materiale non caricato.



**Figura 22 - Confronto tra isoterme di adsorbimento: supporto tal quale e trattato**

Tramite modello DFT sono stati ricavati i valori di area superficiale ( $m^2/g$ ), volume dei pori ( $cm^3/g$ ) e diametro medio degli stessi (nm), quest'ultimo è stato estrapolato dalla distribuzione porosimetrica visibile in figura 5.47.

I dati vengono riportati in tabella 5.12, in confronto col materiale vuoto.



**Figura 5.47 - PSD del supporto trattato tramite incipient wetness confrontato al tal quale**

Le curve in figura 5.46 non mostrano grandi differenze in seguito all'incorporazione del piroxicam: è del IV tipo, con stessa pendenza e forma del cappio di isteresi. Si osserva solo una traslazione dell'isoterma verso valori di volume libero inferiori.

Riguardo la distribuzione porosimetrica in figura 5.47, anche questa tecnica non ha indotto variazioni dimensionali.

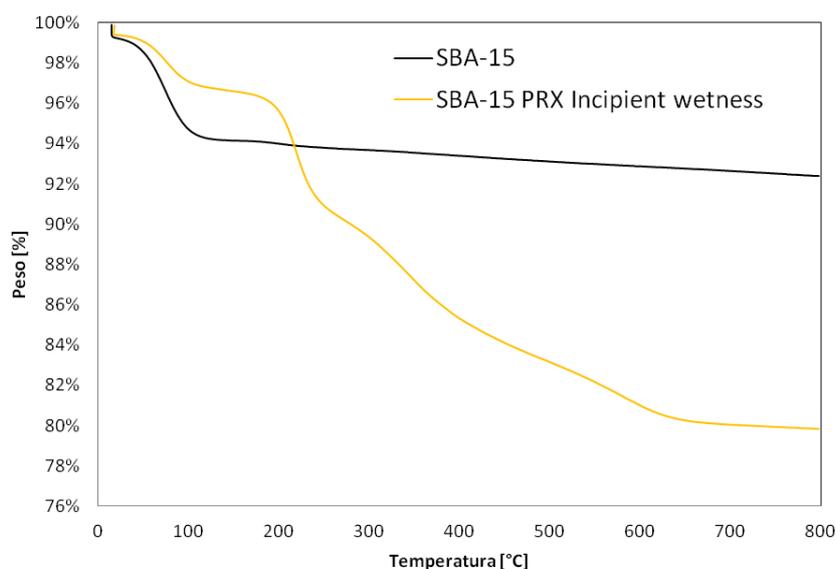
**Tabella 5.12 - Valori caratteristici a confronto**

BET – SBA-15	SBA-15	SBA-15 PRX Incipient wetness
<b>Surface area data</b>		
Multipoint BET	637 m <sup>2</sup> /g	470 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>		
Total Pore volume	1,02 cc/g	0,79 cc/g
<b>Pore size data</b>		
Average pore diameter	7,6 nm	7,6 nm

In tabella 5.12 sono presenti i dati forniti dall'analisi BET. Come avvenuto per tutte i materiali incorporati è avvenuta una riduzione dell'area superficiale e del volume totale dei pori. Quest'ultimo può essere correlato ad un'occlusione dei pori più grandi che, anche se in numero basso, danno una riduzione più netta del volume.

Rispetto alla tecnica precedente si può tuttavia osservare una maggiore diminuzione dei parametri. Tuttavia anche in questo caso, con qualche arrotondamento, la dimensione dei pori è rimasta pressoché identica.

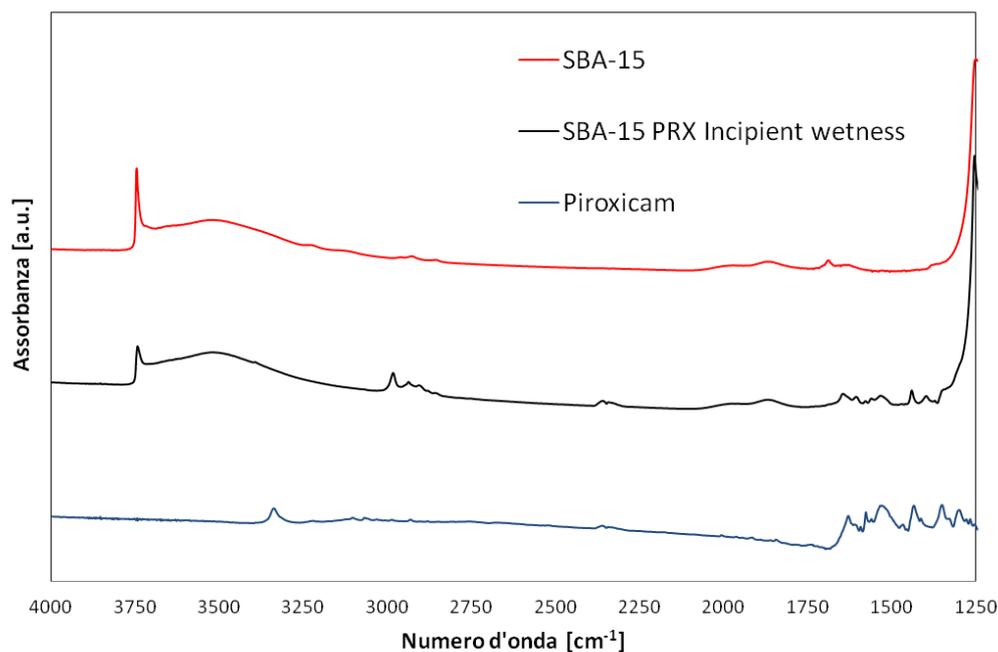
- Analisi termogravimetrica



**Figura 23 - Confronto TGA: SBA-15 tal quale e post incipient wetness impregnation**

In figura 5.48 è possibile osservare la curva relativa all'analisi termogravimetrica della silice a mesoporosità ordinata, impregnata tramite *incipient wetness*. La quantità di acqua contenuta nel supporto ammonta a circa 3%, coerentemente alla maggiore quantità di farmaco presente. Ricordando il pattern di tutte le altre termogravimetrie descritte in quest'elaborato, riguardo ad esempio alle variazioni di pendenza correlate alle diverse specie chimiche, la quantità di farmaco stimata tramite questa analisi è del 15,01% in peso del materiale.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier



**Figura 24 - Confronto IR: piroxicam, SBA-15 tal quale e post incipient wetness impregnation**

In figura 5.49 viene riportato lo spettro infrarosso relativo alla silice SBA-15 incorporata tramite *incipient wetness*.

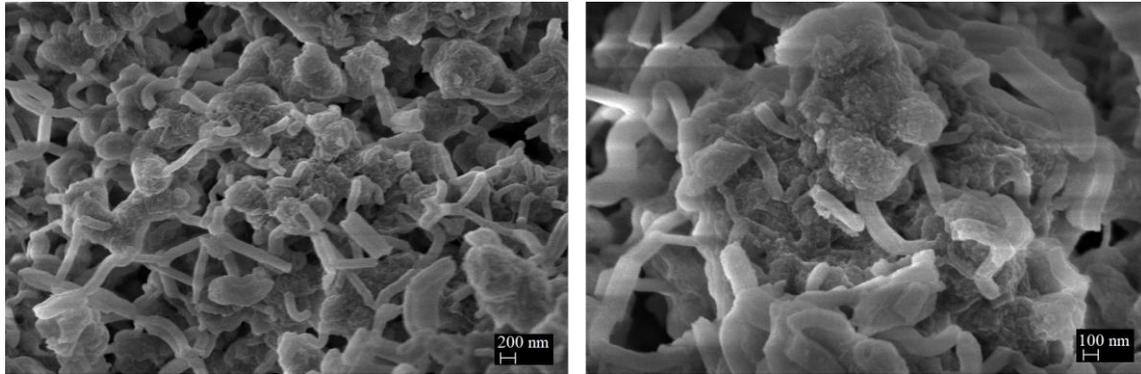
Anche in questo caso sul materiale caricato sono presenti le armoniche relative al farmaco e si conferma, nuovamente, la variazione del rapporto relativo in intensità dei silanoli interagenti/isolati, il quale è aumentato in presenza di farmaco, indice di legame idrogeno tra piroxicam e gli ossidrili della silice.

La curva nera relativa alla silice caricata mostra, in corrispondenza di circa  $3000\text{ cm}^{-1}$  dei modi vibrazionali relativi, molto probabilmente, a qualche residuo di solvente. In particolare, si osservano delle armoniche riconducibili a gruppi metilici,  $-\text{CH}_3$ , ad intensità più alte e gruppi metilenici,  $-\text{CH}_2$ , adiacenti ai precedenti. L'etanolo, come è noto, possiede una catena corta contenente entrambi i suddetti gruppi ma, considerando che il coefficiente di estinzione molare del gruppo metilico è più alto di quello del gruppo  $-\text{CH}_2$  si verifica che, avendo lo stesso numero di gruppi, i modi relativi al gruppo  $-\text{CH}_3$  sono più intensi. Questo è il tipico spettro di un alchile a catena corta, probabilmente riconducibile al solvente (ad esempio un gruppo etile  $\text{CH}_3\text{CH}_2-$ ). Ciò confermerebbe l'ipotesi dei residui di solvente di impregnazione

presenti sulla polvere ma, tuttavia, nello spettro manca l'evidenza di gruppi -OH dell'etanolo, il quale dovrebbe dare del legame idrogeno.

Si deve comunque considerare anche l'ipotesi di un inquinamento casuale del campione, quali ad esempio strumentazioni non perfettamente pulite.

- Microscopia elettronica a scansione



**Figura 25 - Immagini FESEM dell'SBA-15 post incipient wetness impregnation. Due diversi ingrandimenti**

Totalmente di un'altra tipologia è la morfologia del supporto SBA-15 caricato tramite *incipient wetness*. Esso risulta essere molto eterogeneo e sono presenti zone dove sembra che le molecole di farmaco si siano aggregate e siano state intrappolate in quella che sembra essere una matassa di filamenti di silice.

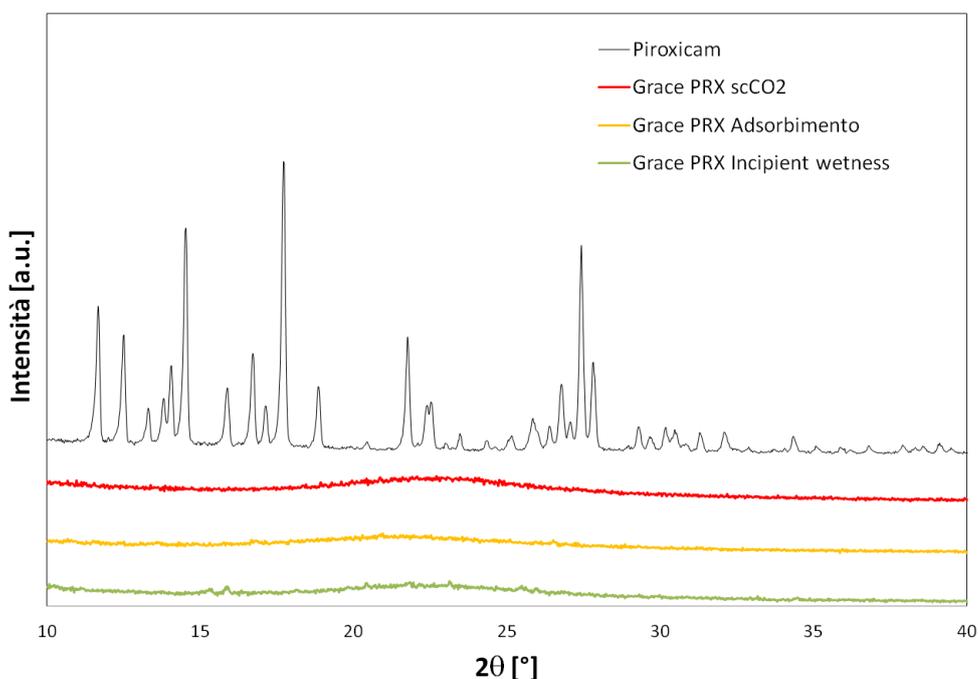
## 6 Confronti

In questo capitolo verranno mostrate le caratterizzazioni dei supporti impregnati, suddivise per tecniche, comparando tutti i tre metodi di *drug loading* utilizzati durante l'attività di laboratorio. Questa sezione può essere considerata come una summa antecedente le conclusioni finali, al fine di avere un facile riscontro visivo dei dati ottenuti in modo chiaro e completo.

### 6.1 Grace GMP

- Diffrazione a raggi X

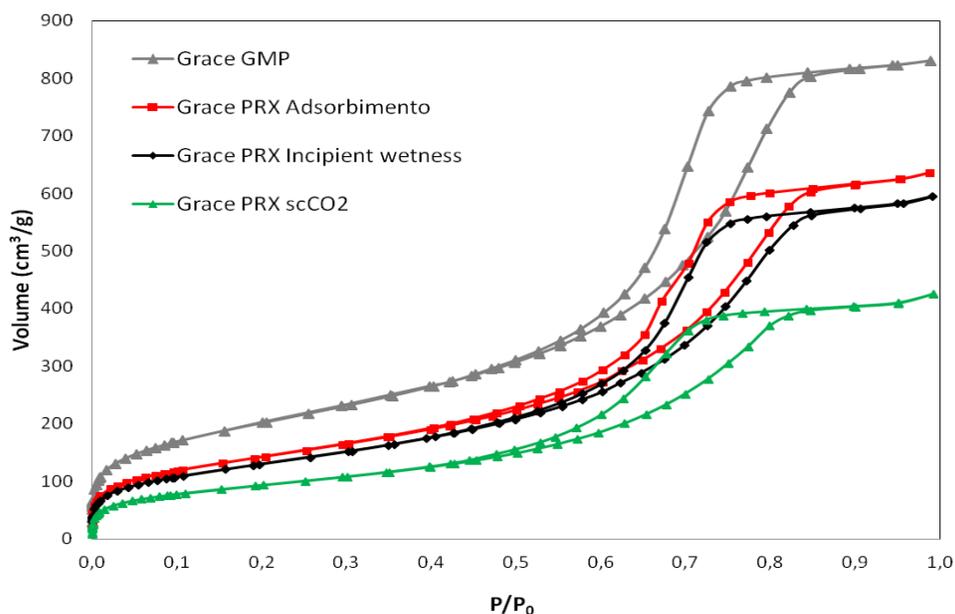
Di seguito vengono riportati gli spettri ad alti angoli della silice Grace caricata suddivisa per tecniche di incorporazione. Il farmaco, in seguito all'impregnazione, risulta aver raggiunto l'amorfezza all'interno del supporto, indipendentemente dalla tecnica utilizzata.



**Figura 6.1 - Confronto spettri diffrattometrici ad alti angoli della silice Grace GMP. Tutte le tecniche utilizzate**

- Analisi di adsorbimento di azoto

Nella figura sottostante vengono riportate le curve relative all'analisi BET, suddivise per tecniche di incorporazione.

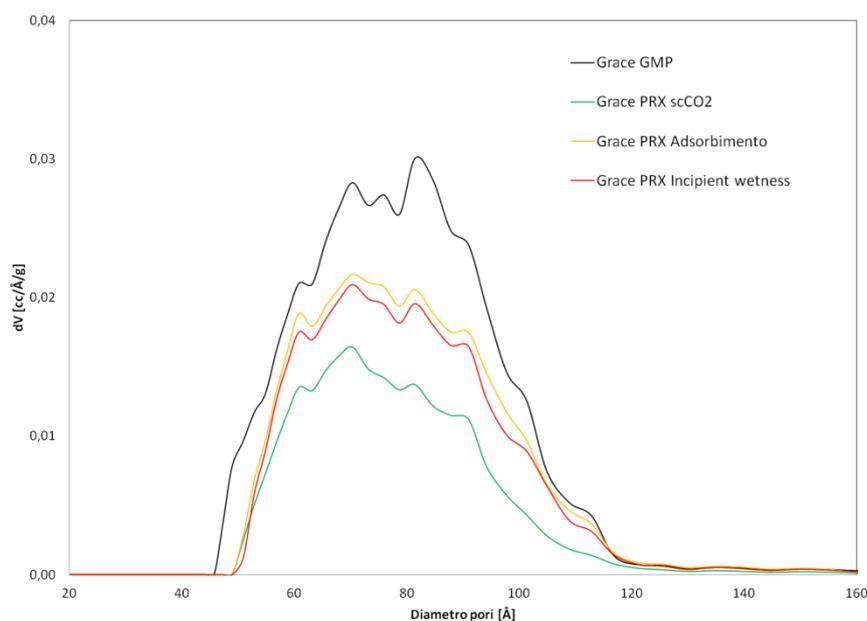


**Figura 26 - Confronto tra isoterme di adsorbimento della Grace GMP - Tutti i trattamenti di impregnazione**

Si può notare come nessuna delle tecniche utilizzate vari di molto la forma dell'isoterma relativa al materiale tal quale, né è presente una significativa variazione della pendenza. Una piccola variazione del coppia di isteresi è osservabile per il supporto caricato tramite utilizzo di CO<sub>2</sub> supercritica, probabilmente correlata alla maggior quantità di farmaco incorporato.

Da questo confronto emerge un dato molto importante, in quanto è presente un trend di riduzione del volume in funzione della quantità di etanolo utilizzato: i *loading* tradizionali di adsorbimento da soluzione e *incipient wetness* prevedono l'utilizzo degli stessi composti chimici, ma differiscono in quantità e soprattutto tipologia di "somministrazione" ed eliminazione del solvente. Tali discrepanze, seppur minime, sono sufficienti da comportare una lieve differenza nelle curve rappresentanti le due tecniche sopracitate in figura 6.2.

Se si osserva adesso il dato relativo all'incorporazione tramite supercritico, quindi a contenuto di etanolo nullo, si osserva un distacco netto dai valori del materiale tal quale. Si può quindi affermare che l'utilizzo dell'alcol ai fini dell'incorporazione del farmaco risulti essere in qualche modo un ostacolo nell'incorporazione del piroxicam, il quale riesce ad occupare i pori della silice in maniera più efficace qualora non si trova in competizione con un solvente, quindi tramite utilizzo di CO<sub>2</sub>.



**Figura 6.3 - PSD del supporto Grace GMP post trattamenti**

In figura 6.3 è presente un confronto tra le distribuzioni porosimetriche. Anche qui è possibile osservare una similarità di dati tra i metodi tradizionali e un distacco da parte dell'utilizzo del supercritico. La forma frastagliata delle curve si mantiene molto simile per tutte le tecniche di *drug loading* utilizzate. Si può altresì affermare che l'utilizzo di quest'ultima tecnica sia più efficace nel riempimento dei pori più grandi, confermando ancora una volta che l'etanolo risulti essere in competizione con l'adsorbimento del piroxicam.

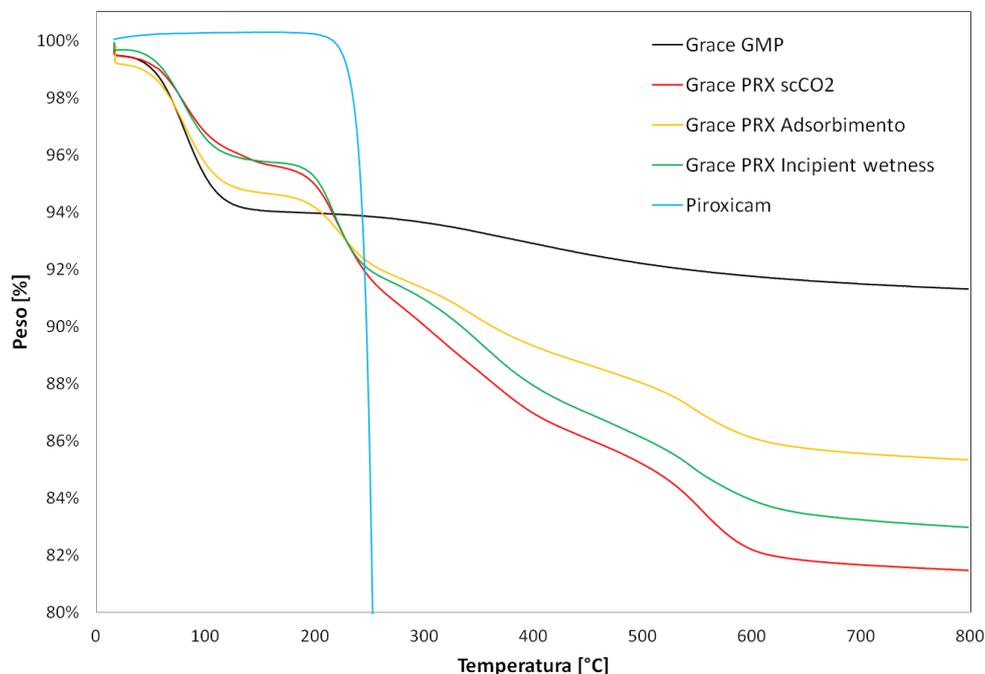
In tabella 6.1 si può trovare un riepilogo dei valori ricavati tramite analisi BET, suddivisi per tecniche. Anche questa tabella è in accordo con la teoria di etanolo utilizzato. Si ricordi che la riduzione di diametro medio dei pori è in realtà fittizia.

**Tabella 6 - Tabella riassuntiva Grace GMP post trattamenti**

BET - Grace	Tal quale	Adsorbimento da soluzione (EtOH)	Incipient wetness impregnation	scCO <sub>2</sub>
<b>Surface area data</b>				
Multipoint BET	732 m <sup>2</sup> /g	516 m <sup>2</sup> /g	474 m <sup>2</sup> /g	341 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>				
Total Pore volume	1,29 cc/g	0,99 cc/g	0,92 cc/g	0,66 cc/g
<b>Pore size data</b>				
Average pore diameter	7,6 nm	7,0 nm	7,0 nm	7,0 nm

- Analisi termogravimetrica

Il confronto tra le curve termogravimetriche, in figura 6.4, risulta di estrema importanza, semplicità e chiarezza, ai fini del confronto fra tecniche di incorporazione:



**Figura 6.4 - Confronti fra TGA relative al supporto Grace GMP post trattamenti più piroxicam**

Osservando le curve per valori di temperatura inferiori ai 200°C si può notare come una maggiore percentuale di piroxicam caricato sul supporto comporti una minore perdita di acqua iniziale, ovvero la quantità di quest'ultima sul materiale. Ciò è coerente con l'incorporazione del farmaco, il quale rende più idrofobico il carrier, ed è indice di occupazione dei siti superficiali della silice da parte delle molecole di piroxicam.

Altra informazione ricavabile dalla figura 6.4 è la seguente: tutte le curve passano per un punto di flesso al di sotto dei 200°C (laddove inizia la perdita di farmaco), al di là del quale è presente un'inversione delle posizioni. La curva azzurra rappresentante il piroxicam non passa dal suddetto punto, bensì si ha totale perdita di principio attivo per temperature superiori, ovvero 250°C. Nonostante questo possa passare come dato contrastante, in realtà è un ulteriore utile mezzo per confermare l'avvenuta amorfizzazione: il fascio di curve si incontra a temperature inferiori a quella di evaporazione del piroxicam proprio per via della sua natura non cristallina, di conseguenza è necessaria un'energia termica inferiore per la sua eliminazione dal supporto.

In tutte le curve, nell'intorno dei 600°C, si osserva il raggiungimento di un plateau a seguito di una perdita di peso relativa agli incombusti del farmaco. La pendenza di quest'ultimo tratto, nonché la sua altezza, è funzione della quantità di piroxicam incorporato.

A conclusione viene inserita la tabella 6.2 che riassume i valori percentuali di farmaco impregnato nel supporto, stimate tramite analisi termogravimetrica:

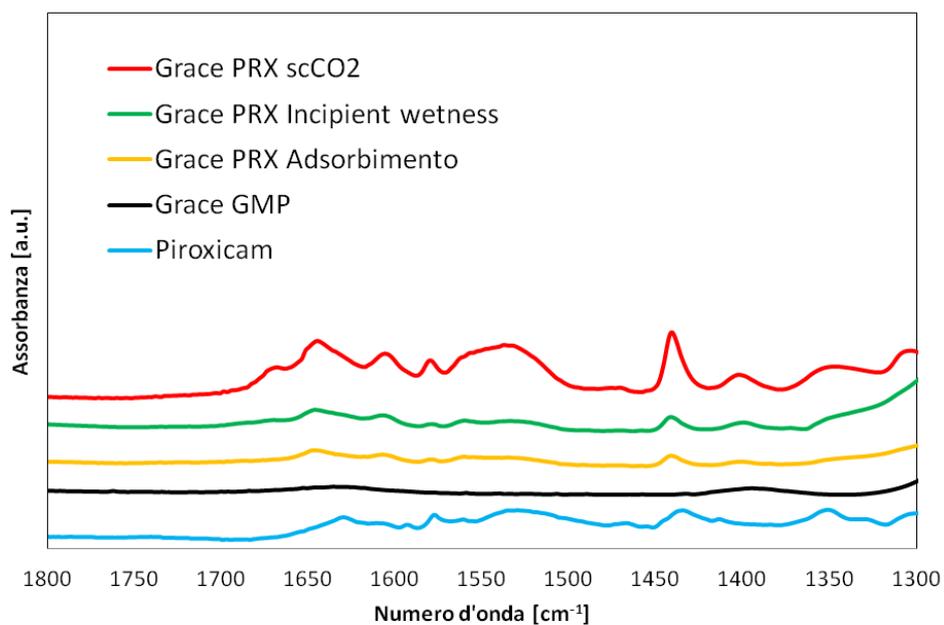
**Tabella 6.2 - Valori caratteristici post impregnazione del supporto Grace GMP**

Grace GMP	Quantità farmaco
Adsorbimento da soluzione	6,60%
Incipient wetness impregnation	10,06%
scCO <sub>2</sub>	11,49%

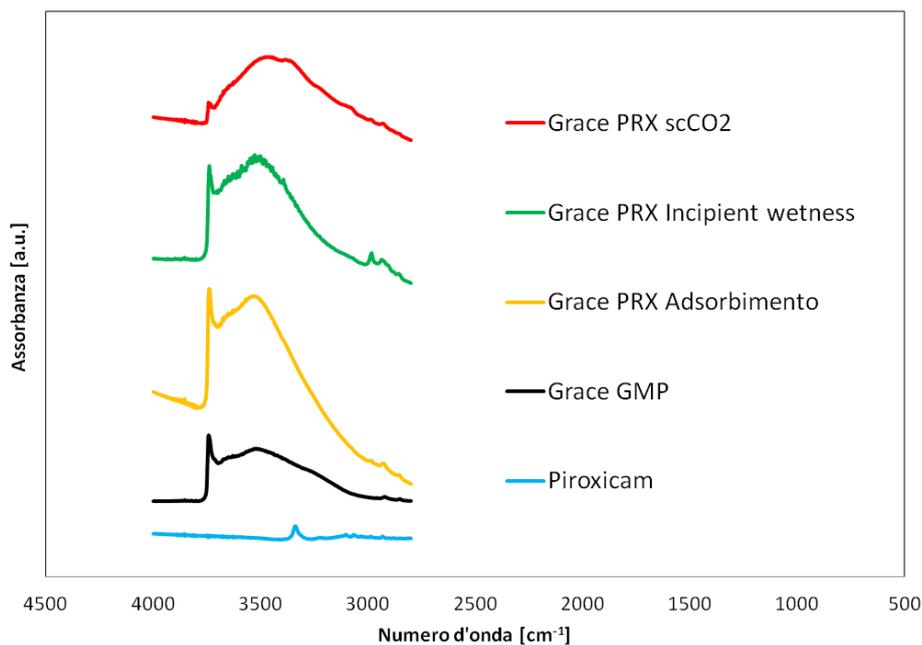
- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 6.5 e 6.6 sono riportati gli spettri IR relativi alle tecniche di *drug loading* utilizzate. Per evitare la sovrapposizione degli spettri, le curve vengono riportate nelle due zone di interesse pratico, ovvero:

- zona delle bande del farmaco, tra i 1800 cm<sup>-1</sup> e i 1300 cm<sup>-1</sup>;
- zona dei silanoli isolati e interagenti, tra i 4000 cm<sup>-1</sup> e i 2800 cm<sup>-1</sup>.



**Figura 27 - Confronti tra spettri IR - Intervallo 1800-1300 cm<sup>-1</sup>**



**Figura 28 - Confronti tra spettri IR - Intervallo 4000-2800  $\text{cm}^{-1}$**

Gli spettri in figura 6.5 e 6.6 sono riportati in ordine crescente di quantità di farmaco, da valori di assorbanza inferiori a quelli superiori. Le bande a bassi valori di numero d'onda mostrano un aumento di intensità, soprattutto quella relativa al *drug loading* tramite  $\text{CO}_2$  supercritica.

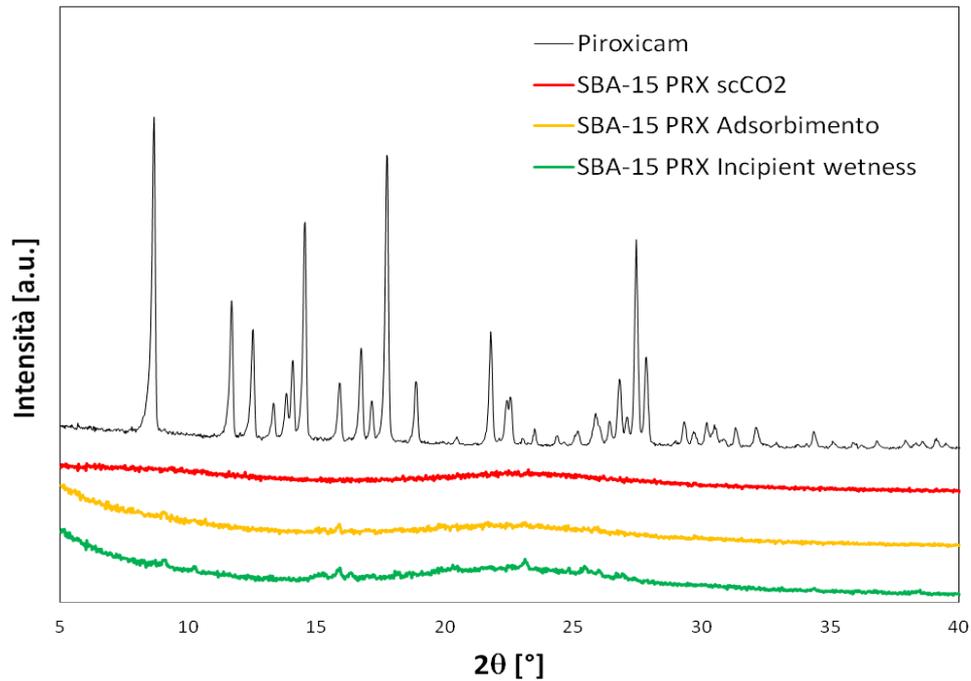
Riguardo gli alti numeri d'onda si può notare come l'aumento della quantità di piroxicam incorporata aumenti la banda dei silanoli impegnati nel legame idrogeno col farmaco, fino al presentarsi della finestra di Evans nella curva rossa.

## 6.2 SBA-15

- Diffrazione a raggi X

Di seguito vengono riportati gli spettri ad alti angoli della silice SBA-15 caricata suddivisa per tecniche di incorporazione.

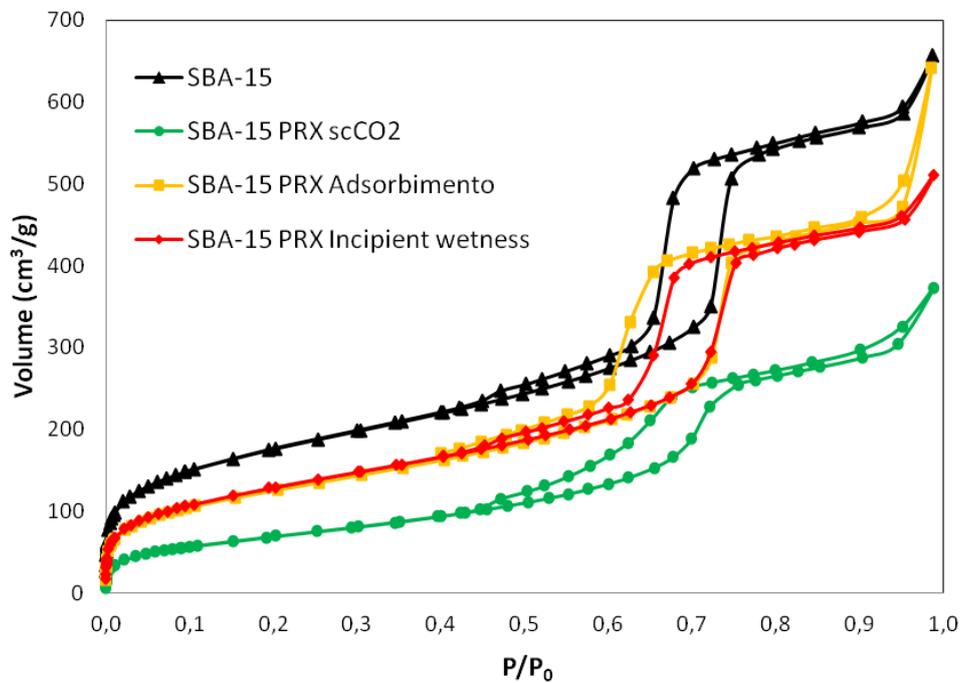
Anche in questo caso il piroxicam ha raggiunto lo stato amorfo in tutte le tecniche utilizzate.



**Figura 6.7 - Confronto fra spettri diffrattometrici - SBA-15 post trattamenti**

- Analisi di adsorbimento di azoto

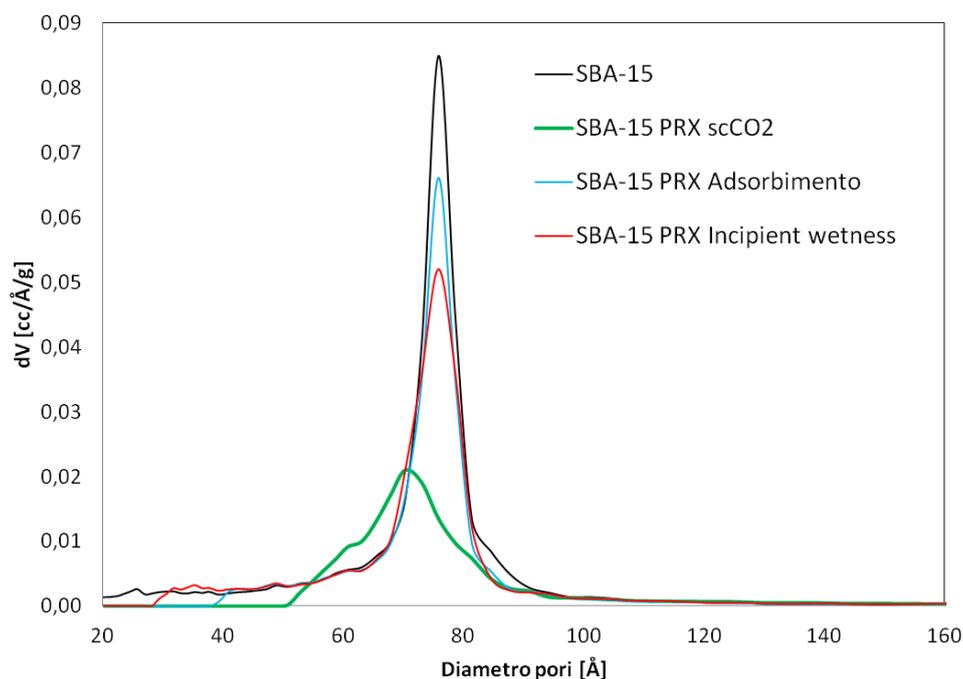
Nella figura sottostante vengono riportate le curve relative all'analisi BET, suddivise per tecniche di incorporazione.



**Figura 6.8 - Confronto tra isoterme di adsorbimento relative al supporto SBA-15 trattato con le 3 tecniche**

I trattamenti di drug loading classico hanno di poco variato il volume libero del supporto. Si osserva, nel caso dell'adsorbimento da soluzione, uno shift del ramo relativo al desorbimento di azoto verso valori di pressione relativa più bassi, rispetto all'*incipient wetness impregnation*. Solitamente, i valori del rapporto  $P/P_0$  elevati sono correlati al riempimento dei micropori più grandi. Essendoci stato un ritardo nel desorbimento si può ipotizzare che l'etanolo sia permeato nei pori dell'SBA-15, facendola rigonfiare.

L'utilizzo della  $CO_2$  supercritica ha, invece, fatto variare di molto il coppia di isteresi, sicuramente in relazione all'elevata quantità di farmaco e assenza di solvente. A proposito di quest'ultimo si evidenzia, in funzione della sua quantità, il trend verificatosi nel caso della Grace GMP, con distacco netto della curva verde rispetto al materiale tal quale (curva nera).



**Figura 29 - Distribuzioni porosimetriche dell'SBA-15 a diversi trattamenti**

Le distribuzioni porosimetriche in figura 6.9 è di tipo monomodale e mostra una modifica nel numero e nel volume dei pori per le tecniche tradizionali, mantenendo tuttavia le dimensioni. Va fatta un'importante osservazione, possibile grazie alla presenza di porosità uniformi, (quindi il fenomeno osservato è molto chiaro): se dapprima era presente una sola famiglia di pori, l'utilizzo della  $CO_2$  supercritica comporta una distribuzione delle molecole più omogenea all'interno di questi, rispetto alle tecniche tradizionali. In particolare se si considera che tramite *incipient wetness impregnation* si siano incorporate le stesse quantità di piroxicam, secondo dato di analisi termogravimetrica. Nonostante una differenza minima, la distribuzione porosimetrica verde e rossa sono sensibilmente diverse: quella relativa al trattamento con fluido supercritico è indicativa dell'omogeneità delle molecole all'interno dei pori, mentre l'altra tecnica ha determinato un'occlusione. Interessante notare come l'incorporazione tramite  $scCO_2$  ha fatto variare la posizione del massimo della curva e ciò può

sicuramente essere un indice reale del riempimento dei pori. Questo dato è coerente con la spettroscopia infrarossa che evidenzia un maggiore coinvolgimento dei silanoli isolati nel caso dell'incorporazione con CO<sub>2</sub> supercritica, rispetto al caso dell'utilizzo di etanolo.

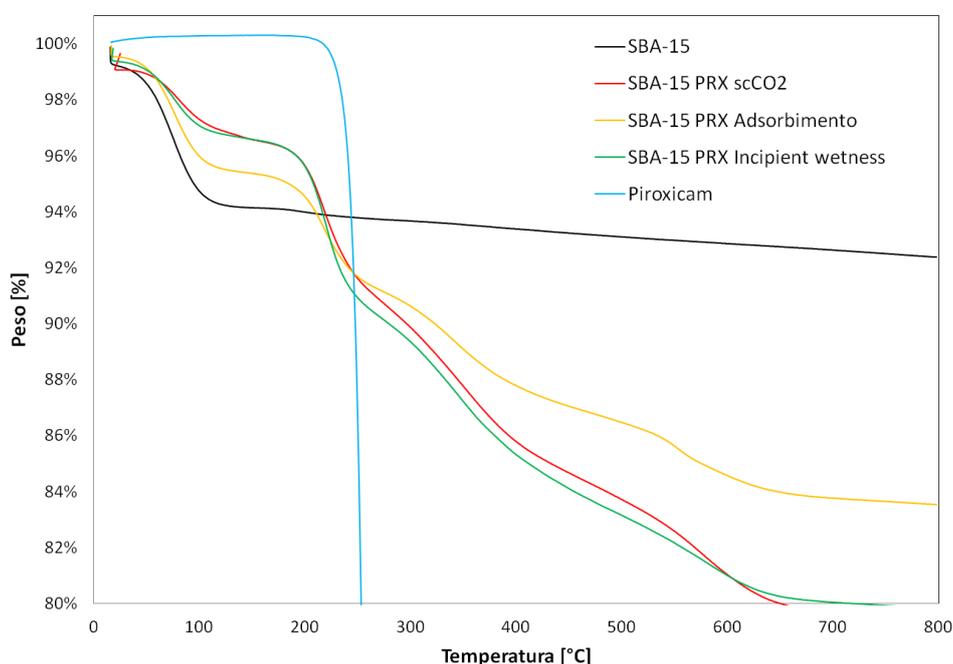
In tabella 6.3 si può trovare un riepilogo dei valori ricavati tramite analisi BET, suddivisi per tecniche.

**Tabella 6.3 - Valori caratteristici a confronto**

BET – SBA-15	Tal quale	Adsorbimento da soluzione (EtOH)	Incipient wetness impregnation	scCO <sub>2</sub>
<b>Surface area data</b>				
Multipoint BET	637 m <sup>2</sup> /g	455 m <sup>2</sup> /g	470 m <sup>2</sup> /g	253 m <sup>2</sup> /g
<b>Pore volume data</b>				
Total Pore volume	1,02 cc/g	0,99 cc/g	0,79 cc/g	0,58 cc/g
<b>Pore size data</b>				
Average pore diameter	7,6 nm	7,6 nm	7,6 nm	7,0 nm

- Analisi termogravimetrica

In figura 6.10 viene riportato il confronto tra le curve termogravimetriche:



**Figura 6.10 - Confronto curve termogravimetriche del supporto SBA-15 relative alle diverse tecniche**

Nel caso in esame, le curve sono più distanziate rispetto alla TGA della Grace GMP, soprattutto l'incorporazione tramite fluido supercritico.

Come nel caso precedente (Grace GMP), per valori di temperatura inferiori ai 200°C, una maggiore percentuale di piroxicam caricato sul supporto comporta un minore adsorbimento di acqua, coerentemente alla quantità di farmaco incorporato.

Anche qui è presente il punto di flesso, con le stesse conseguenze osservate nel paragrafo 6.1.

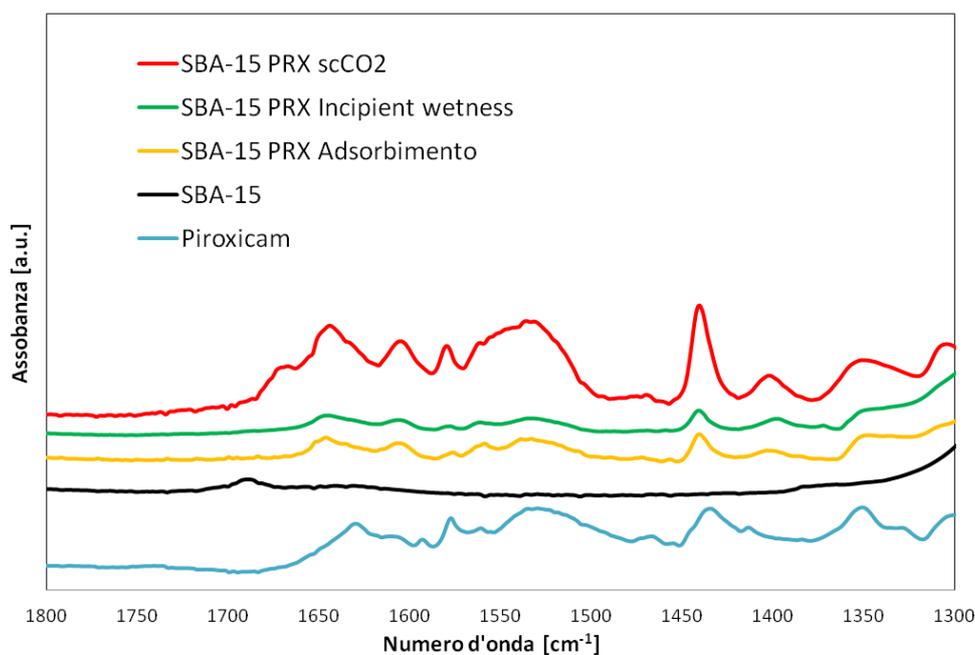
A conclusione viene inserita la tabella 6.4 che riassume i valori percentuali di farmaco impregnato nel supporto, stimate tramite analisi termogravimetrica:

**Tabella 6.4 - Valori caratteristici a confronto**

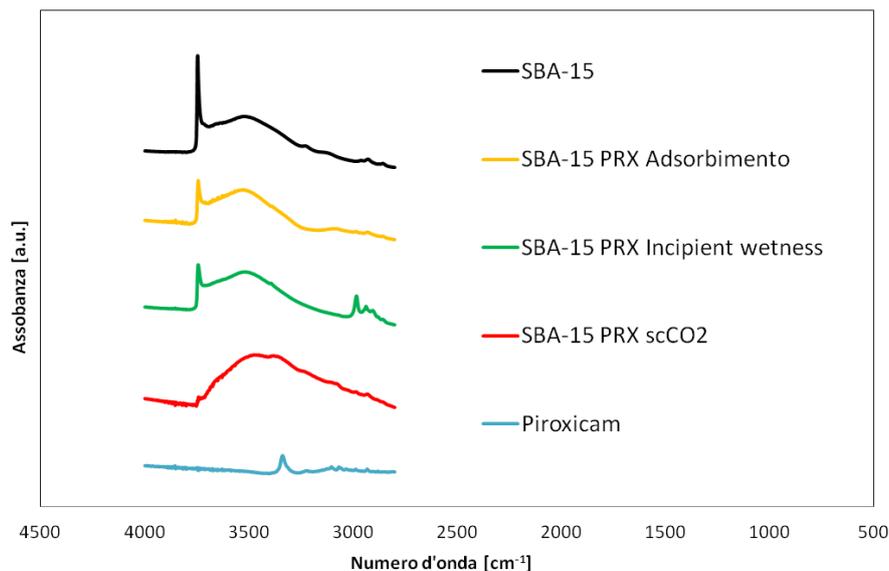
SBA-15	Quantità farmaco
Adsorbimento da soluzione	10,08%
Incipient wetness impregnation	15,01%
scCO <sub>2</sub>	15,34%

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

In figura 6.11 e 6.12 sono riportati gli spettri IR relativi alle tecniche di *drug loading* utilizzate. Per evitare la sovrapposizione degli spettri, le curve vengono riportate nelle zone di interesse pratico citate precedentemente.



**Figura 30 - Confronto tra spettri IR - Intervallo 1800-1300 cm<sup>-1</sup>**



**Figura 6.12 - Confronti tra spettri IR - Intervallo 4000-2800  $\text{cm}^{-1}$**

Gli spettri in figura 6.11 e 6.12 sono riportati in ordine decrescente di quantità di farmaco, da valori di assorbanza inferiori a quelli superiori. Le bande a bassi valori di numero d'onda mostrano un aumento di intensità, soprattutto quella relativa al *drug loading* tramite  $\text{CO}_2$ , la quale presenta valori di assorbanza molto elevati, soprattutto a  $1440 \text{ cm}^{-1}$ .

Riguardo gli alti numeri d'onda si è osservato un notevole ribaltamento del rapporto relativo dei silanoli isolati e interagenti, nel confronto tra materiale tal quale e *loading* tramite supercritico, in accordo alla quantità di farmaco incorporata. Questo è un risultato molto importante, in quanto sottolinea la profonda interazione tra farmaco e superficie della silice, confermata oltretutto dalla finestra di Evans, e che la  $\text{CO}_2$  supercritica riesca a disperdere il farmaco sulla superficie e all'interno dei pori in modo più efficace.

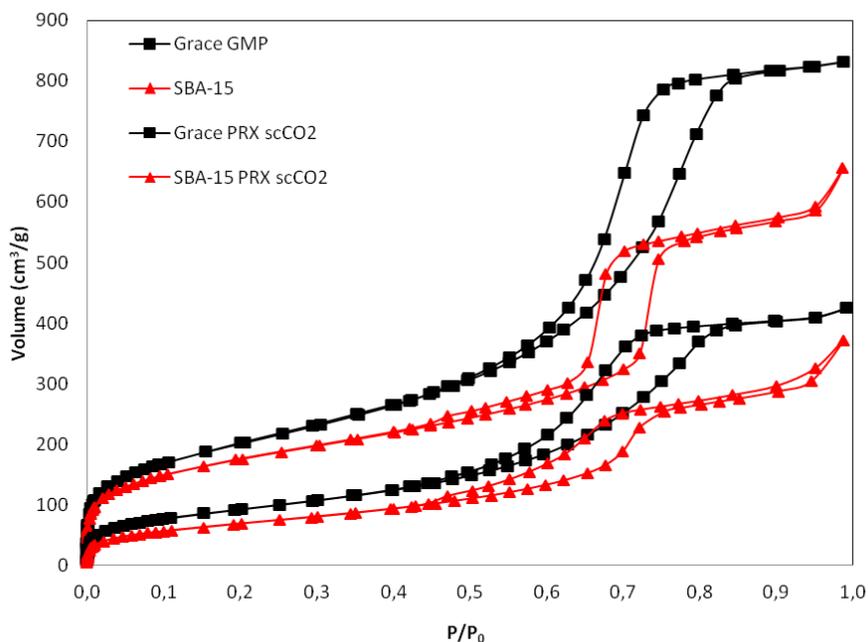
### 6.3 $\text{CO}_2$ supercritica

- Diffrazione a raggi X

Non vengono riportati gli spettri per via di una ridondanza. Si può semplicemente dire che entrambi i supporti si sono ben comportati nei confronti dell'incorporazione del piroxicam tramite questa tecnica.

- Analisi di adsorbimento di azoto

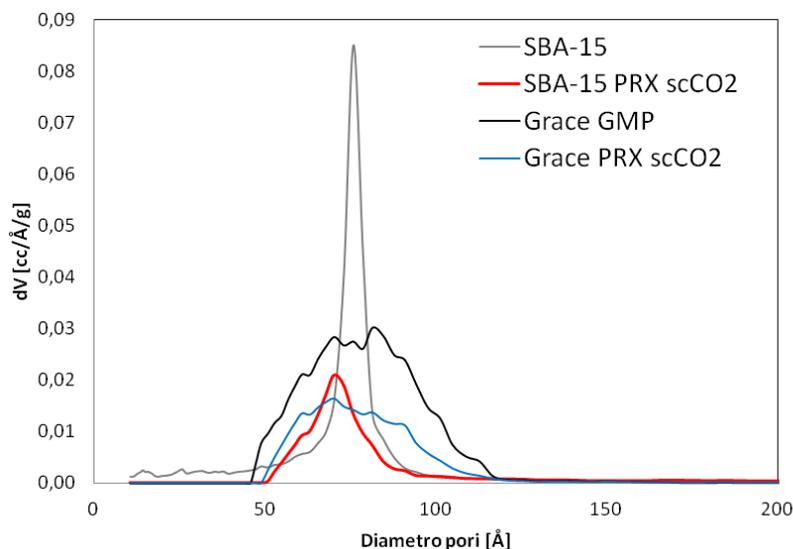
Nell'immagine sottostante viene riportato un confronto tra le isoterme dei due materiali utilizzati, tal quali in nero e incorporati in rosso, con due diversi indicatori.



**Figura 31 - Confronto tra isoterme di adsorbimento relative ai due supporti trattati in scCO<sub>2</sub>**

Come sottolineato nel capitolo precedente, la curva relativa alla silice Grace ha mantenuto pressoché identiche le sue caratteristiche. Si desume l'adsorbimento del materiale a seguito di una semplice riduzione del volume libero.

I segni più evidenti dell'incorporazione del piroxicam sono presenti nel caso dell'SBA-15, difatti è presente un totale cambio della porosità: il coppia di isteresi indica che ci sia stata una transizione da un tipo di porosità cilindrica a una meno definita. Questo è una grossa evidenza di riempimento delle microporosità, confermata anche dalla distribuzione porosimetrica nella figura sottostante.

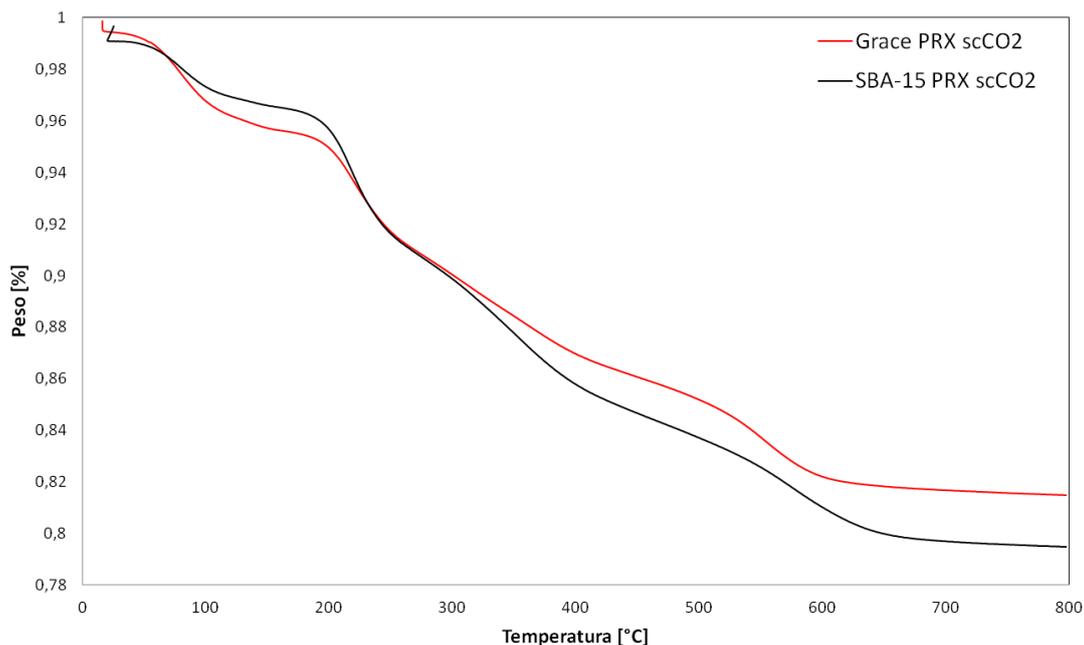


**Figura 32 - PSD a confronto: supporti tal quali e trattati in scCO<sub>2</sub>**

Lo shift della curva indica chiaramente una riduzione del diametro dei pori, cosa che invece non è avvenuta per la silice a mesoporosità non controllata, nella quale è presente una semplice riduzione del volume, in relazione ai pori più grandi, facilmente riempibili dalla molecola di piroxicam.

Nonostante i valori di area superficiale e di volume dell'SBA-15 siano meno vantaggiosi e quindi più bassi rispetto alla silice concorrente, la sua mesoporosità ordinata rende l'adsorbimento più efficace.

- Analisi termogravimetrica



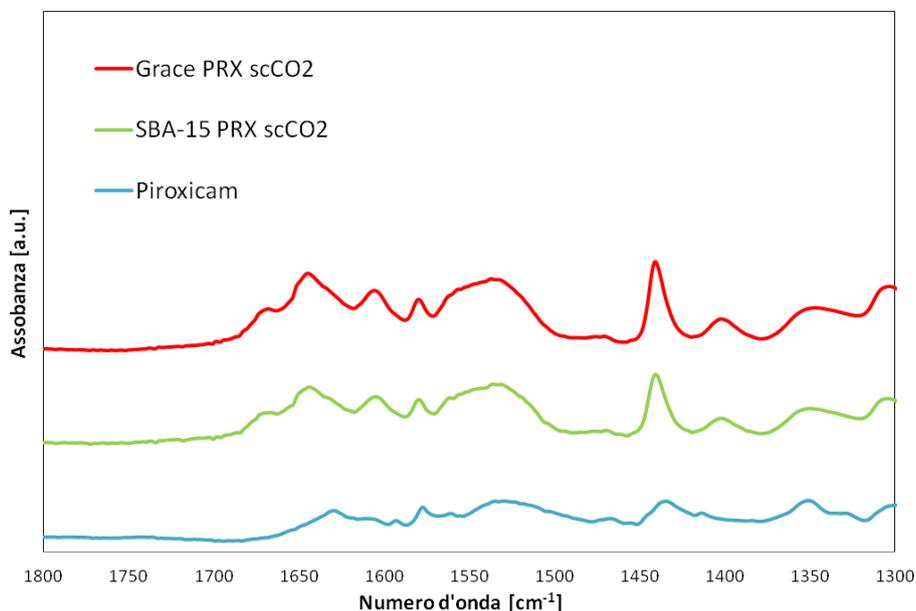
**Figura 33 - Confronto TGA tra i due supporti trattati in scCO<sub>2</sub>**

Il confronto dell'analisi termogravimetrica mostra una forte similitudine tra i due materiali incorporati. Al di sotto dei 200°C si osserva una leggera perdita maggiore nel caso della silice Grace, imputabile probabilmente alla reazione di condensazione: nel caso della silice a mesoporosità controllata, SBA-15, i silanoli sono impegnati in numero maggiore a formare un legame idrogeno col farmaco. Le molecole di quest'ultimo impediscono quindi l'accoppiamento di silanoli vicini per dare formazione di acqua, di conseguenza si osserva una perdita iniziale minore.

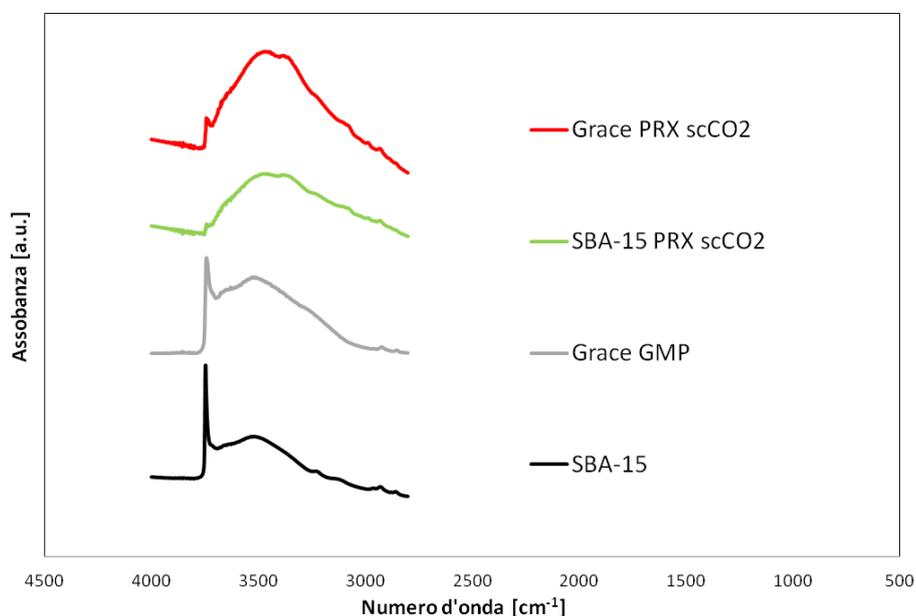
Sempre a proposito della quantità di piroxicam, a temperature elevate, si osserva una riduzione del peso anticipata: ciò può essere messo in relazione con la necessità, da parte dell'SBA-15, di un'energia termica maggiore per poter eliminare il farmaco incorporato.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Nelle figure sottostanti vengono riportati i materiali incorporati tramite fluido supercritico:



**Figura 6.16 - Confronti tra spettri IR - Intervallo 1800-1300 cm<sup>-1</sup>**



**Figura 6.17 - Confronti tra spettri IR - Intervallo 4000-2800 cm<sup>-1</sup>**

I bassi numeri d'onda non evidenziano grosse differenze. Quanto agli alti numeri è innegabile che il farmaco presente nell'SBA-15 stia effettivamente interagendo con la silice, dato che il picco a 3750 cm<sup>-1</sup>, rappresentativo dei silanoli isolati, sia trascurabile rispetto a quello degli

interagenti. Anche nel caso della silice Grace si osserva una forte riduzione di quest'intensità, in proporzione forse inferiore alla sua silice concorrente.

Da qui si evince come i siti dei supporti siano impegnati, in diversa misura, col farmaco e la bassa idrofilia di base dell'SBA-15 ha sicuramente giocato un ruolo fondamentale.

Per concludere, l'indagine infrarossa ha mostrato che la silice SBA-15 esibisce un legame più forte rispetto alla Grace.

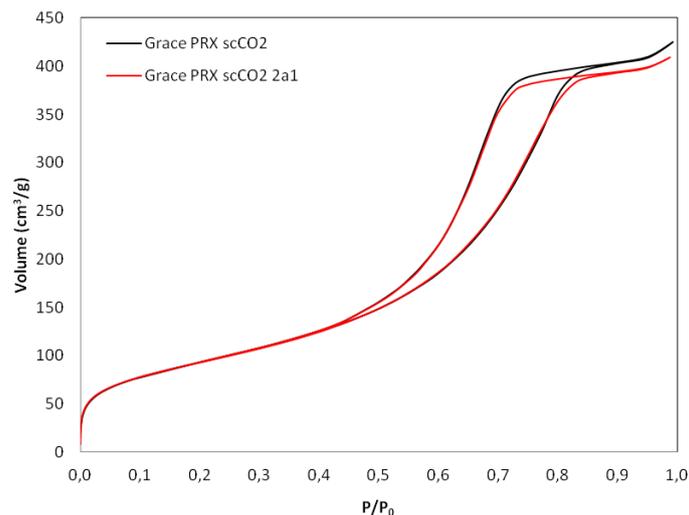
**Tabella 7 - Confronto riassuntivo fra dati caratteristici dei due supporti trattati in scCO<sub>2</sub>**

<b>Supporti tal quali</b>	<b>Grace GMP</b>	<b>SBA-15</b>
Area superficiale	732 m <sup>2</sup> /g	637 m <sup>2</sup> /g
Volume dei pori totale	1,29 cc/g	1,02 cc/g
Diametro medio dei pori	7,6 nm	7,6 nm
<b>CO<sub>2</sub> supercritica</b>	<b>Grace GMP</b>	<b>SBA-15</b>
Area superficiale	341 m <sup>2</sup> /g	253 m <sup>2</sup> /g
Volume totale dei pori	0,66 cc/g	0,58 cc/g
Diametro medio dei pori	7,0 nm*	7,0 nm
Quantità farmaco incorporato (TGA)	11,49%	15,34%
Struttura del farmaco	Amorfo	Amorfo

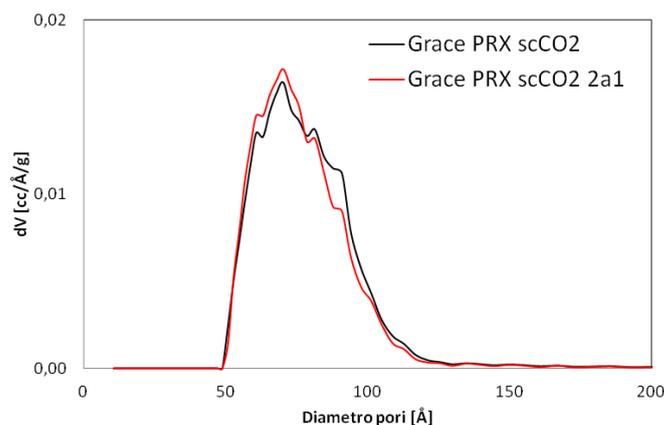
#### **6.4 Drug loading tramite CO<sub>2</sub> supercritica - 2 a 1**

A conclusione del capitolo 8 vengono riportati i dati e delle constatazioni riguardo uno dei possibili esperimenti, tuttavia abbandonati ai primi risultati. Per mera curiosità è stato pensato di impregnare i supporti tramite CO<sub>2</sub> supercritica con un quantitativo di farmaco doppio, immaginando che l'incorporazione avrebbe dato risultati più promettenti. L'esperienza non ha tuttavia mostrato significative differenze tra lo studio condotto e un rapporto in massa piroxicam/silice pari a 2, esibendo talvolta coincidenze di risultati sperimentali o addirittura dati contrastanti. Il meccanismo sembra del tutto basato sul caso o difficile da giustificare.

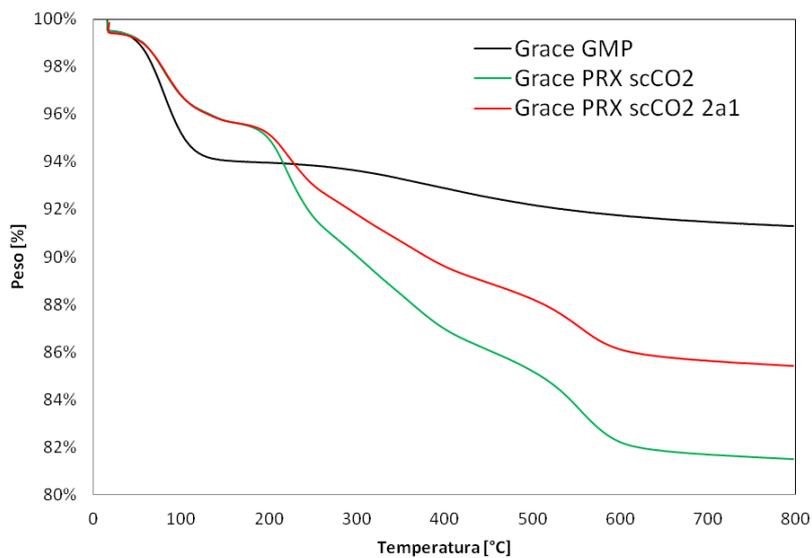
A titolo di esempio vengono riportate delle curve relative a quest'esperienza.



**Figura 34 - Sovrapposizione delle isoterme di adsorbimento relativa alla Grace GMP trattata in scCO2 con due diversi rapporti in peso tra piroxicam e supporto**



**Figura 35 - Confronto fra PSD relative alle isoterme della figura precedente**



**Figura 6.20 - Dato TGA contrastante: il materiale trattato con un rapporto di farmaco in peso doppio risulta avere una perdita minore rispetto al caso del rapporto 1 a 1**

## 7 Rilascio del farmaco

Come ultima prova si è scelto di effettuare uno studio sul rilascio del farmaco, al fine di valutare se il processo di incorporazione possa in qualche modo influire sulla cinetica di cessione del farmaco o vari solo in termini di quantità rilasciata. Per fare questo esperimento è stata costruita, come nel caso dell'adsorbimento da soluzione (paragrafo 5.4), una retta di taratura: le concentrazioni sono state mantenute pari al caso precedente, con la differenza di diluire il farmaco in una soluzione gastrica simulata, dal momento che il sistema è ideato per il rilascio di piroxicam via orale.

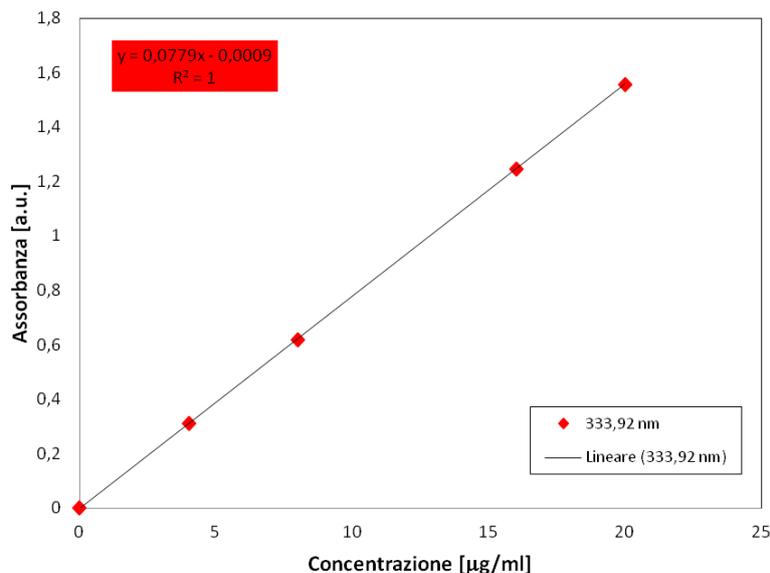


Figura 7.1 - Retta di taratura del piroxicam in HCl

L'equazione della retta interpolatrice i vari punti è necessaria al fine di conoscere la quantità di farmaco rilasciata dal sistema, schematizzato in figura 7.2:

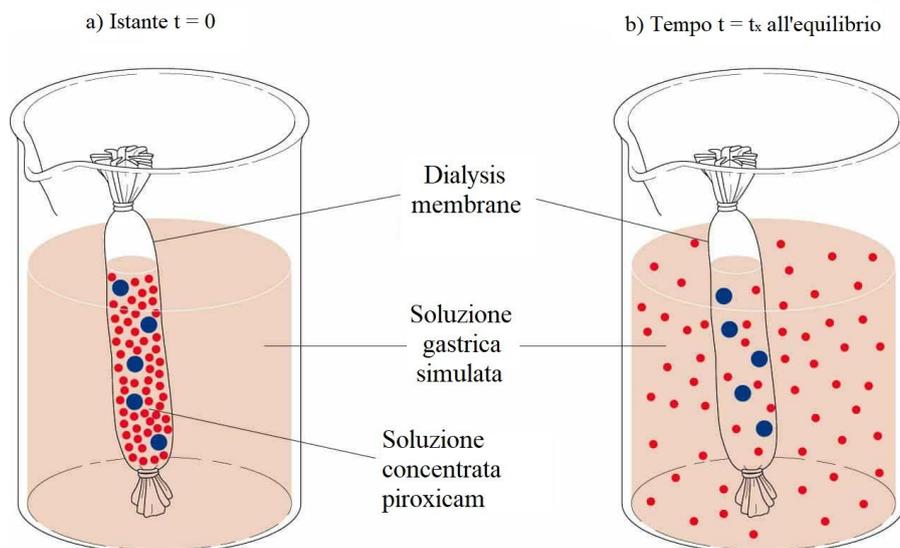


Figura 36 - Schematizzazione dell'esperimento di rilascio

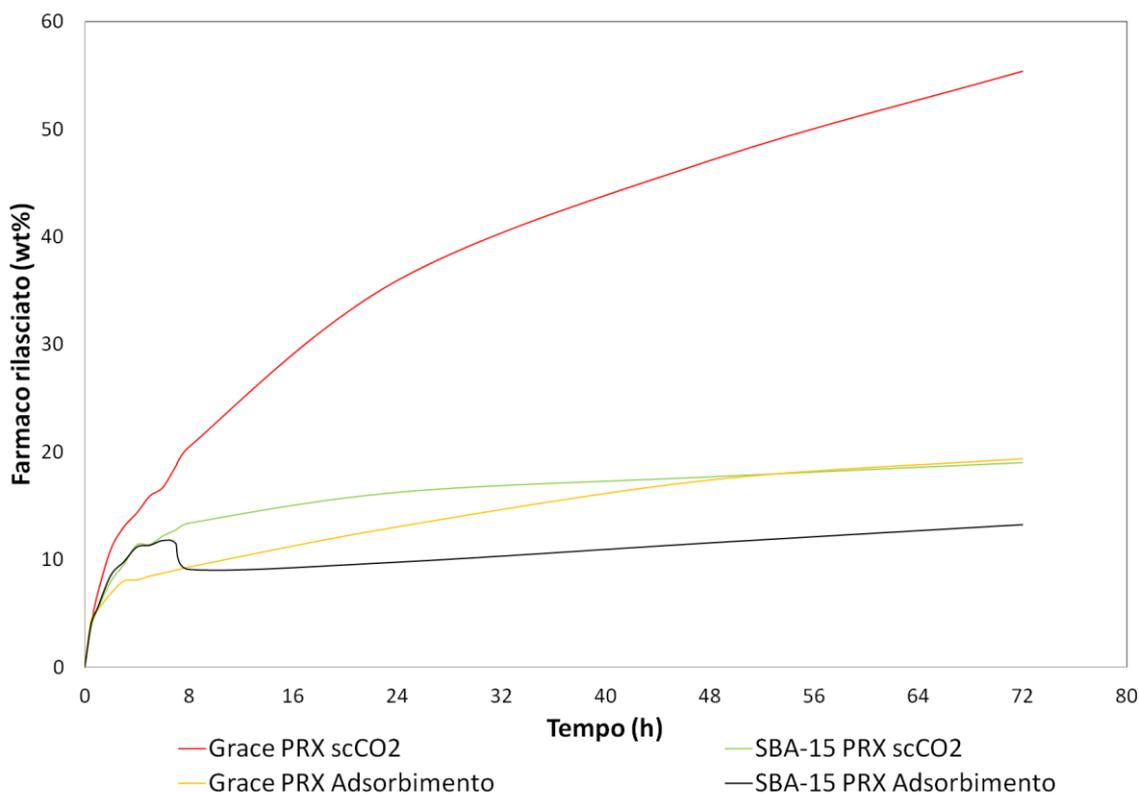
All'interno di quella che è nota come *dialysis membrane* è stata inserita una certa quantità nota di silice impregnata di piroxicam, con l'aggiunta di 2 ml di soluzione gastrica simulata (HCl 0,1 M). Il sistema, che dovrebbe equipararsi alle pareti dello stomaco, è stato poi inserito all'interno di un beaker dove è stata posta la soluzione ricevente di acido cloridrico nella stessa concentrazione. Il farmaco viene quindi rilasciato a causa di fenomeni di diffusione attraverso la membrana e semplice osmosi diretta.

In determinati tempi prefissati, sono stati prelevati 2 ml di soluzione ricevente e poi esaminati allo spettrofotometro, al fine di valutarne il valore di assorbanza e quindi il quantitativo di piroxicam rilasciato in funzione del tempo. Estratta la quantità da analizzare, sono stati rimpinguati 2 ml di soluzione gastrica simulata, al fine di portare il sistema il più possibile all'equilibrio. I valori delle quantità di piroxicam rilasciate nel tempo sono riportati in tabella 7.1.

**Tabella 8 - Valori di farmaco rilasciato in % in funzione del tempo**

Tempo (h)	Grace PRX Adsorbimento	Grace PRX scCO <sub>2</sub>	SBA-15 Adsorbimento	SBA-15 scCO <sub>2</sub>
	% Farmaco rilasciato	% Farmaco rilasciato	% Farmaco rilasciato	% Farmaco rilasciato
0	0	0	0	0
0,5	4,382101484	3,971657674	4,043836159	3,769652425
1	5,340491389	6,866177419	5,546180716	5,384079041
2	6,855214946	10,94951777	8,529538364	7,961152747
3	8,020866408	13,04010681	9,788094757	9,529593037
4	8,114367862	14,33876411	11,15534004	11,35862251
5	8,479023533	15,91339762	11,32903911	11,3874406
6	8,745502677	16,72194331	11,76379466	12,18637637
7	9,033798828	18,69438869	11,4946119	12,74740955
8	9,315861548	20,4743102	9,09025114	13,37650249
24	13,04345285	35,95074748	9,760668589	16,23991772
48	17,39282883	47,08735432	11,54743267	17,67285163
72	19,37194294	55,38814904	13,23668148	18,98928686

Nella figura sottostante vengono invece riportate le curve di rilascio del piroxicam in funzione del tempo. La quantità di farmaco ceduta alla soluzione ricevente è rapportata al valore di principio attivo caricato sul supporto, ovvero i valori ricavati dall'analisi termogravimetrica.



**Figura 37 - Curve di rilascio del piroxicam: confronto tra diversi supporti e tecniche**

Tutte le curve ottenute sono rappresentative di un rilascio controllato. Come si può osservare dai grafici riportati in figura 7.3 si nota una differenza nella cinetica di rilascio nel supporto a mesoporosità non ordinata, ovvero la silice commerciale Grace GMP: il *drug loading* tramite CO<sub>2</sub> supercritica si trova, chiaramente, a valori di quantità di piroxicam rilasciata più alti, in quanto il principio attivo si trova in quantità maggiori rispetto al caso dell'impregnazione tramite adsorbimento da etanolo. Tuttavia è possibile notare una differenza nelle pendenze delle due curve succitate, in particolare per valori temporali inferiori alle 24 ore: ciò può portare alla conclusione che l'impregnazione tramite fluido supercritico assicuri un rilascio maggiore nelle prime ore dall'assunzione della compressa, mentre per lunghi periodi la cinetica di entrambi i supporti caricati tramite i due diversi metodi tende a coincidere, con un rilascio più lento e costante nel tempo che, soprattutto nel caso del loading tramite CO<sub>2</sub> supercritica, sembrerebbe poter continuare per circa il doppio delle ore, prima di giungere all'equilibrio.

Quanto all'SBA-15, è presente una coincidenza di dati nelle prime 8 ore dell'esperimento, segno che non è presente un vantaggio nell'utilizzo di uno dei due metodi. Tuttavia, per periodi più lunghi, si osserva un crollo della concentrazione di farmaco rilasciato nel caso di adsorbimento da soluzione e un mantenimento di tale valore nel tratto compreso tra le 7 ore e i 3 giorni. Ciò potrebbe essere dovuto a diverse motivazioni:

- la presenza del residuo di etanolo ostacola il rilascio del farmaco, non lasciando spazio al principio attivo di abbandonare il supporto e finire in soluzione;

- la struttura dell'SBA-15, fatta da canali all'interno della struttura cilindrica e filamentosa, risulta essere un'ostacolo al rilascio a seguito dell'incorporazione, la quale sicuramente trova meno ostacoli;
- la bassa idrofilicità di questa particolare silice fa sì che, in superficie, sia preferita la creazione di un legame tra farmaco e supporto, piuttosto che con le molecole acquose. In questo modo può essere giustificato un rilascio piuttosto basso che viene giustificato dal fatto che l'SBA-15 trattenga a sé le molecole di principio attivo, piuttosto che rilasciarle in soluzione;
- al momento del prelievo delle 7 ore si è presentato un errore nelle quantità sottratte dalla soluzione ricevente, il quale si è riflesso ed ha influenzato i successivi prelievi. In questo modo, la soluzione ricevente risulterebbe essere diluita, con conseguente apparente riduzione del valore percentuale di piroxicam rilasciato.

Per lunghi periodi, l'SBA-15 ha mostrato la medesima cinetica di rilascio in relazione ai due diversi metodi di drug loading, con valori percentuali che si mantengono al di sotto del 20% di piroxicam incorporato già dopo le prime 24 ore.

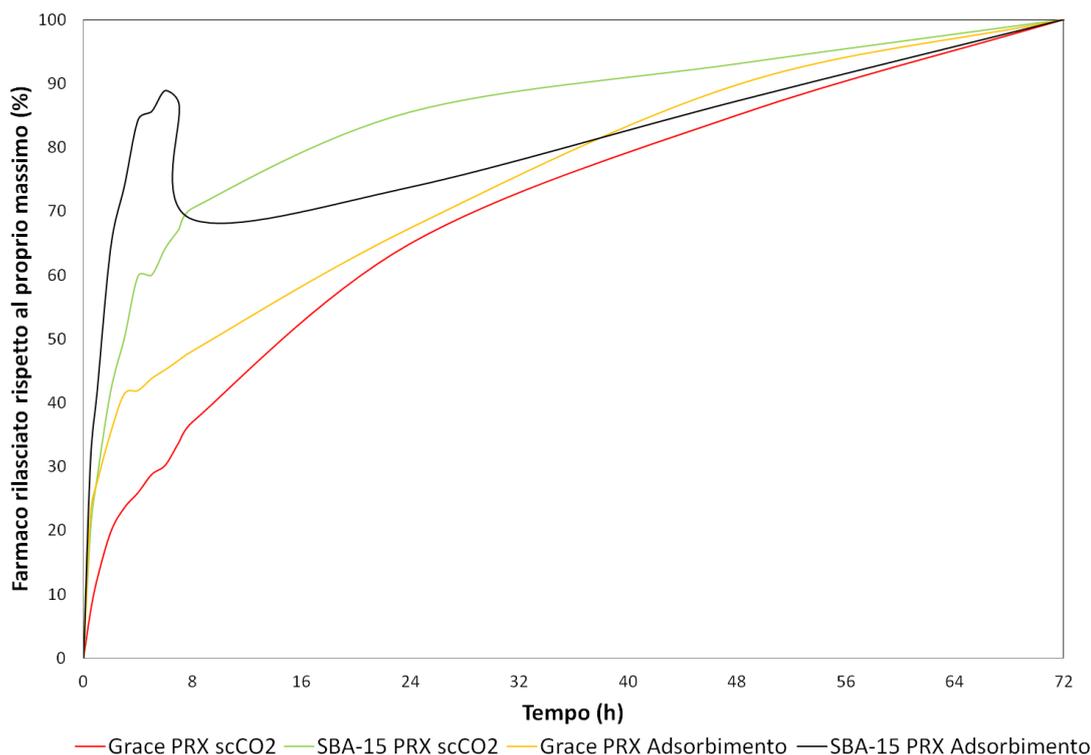
Un'interpretazione del dato relativo a questo supporto può portare alla conclusione che, inizialmente, si abbia una maggiore quantità di farmaco rilasciato determinato dalla fuoriuscita delle molecole di principio attivo all'imbocco dei canali, seguito poi da una cinetica lenta del piroxicam che deve attraversare dei canali molto lunghi prima di poter fuoriuscire. Si deve inoltre sottolineare l'affinità della superficie di questo supporto, senza escludere la differente diffusione della CO<sub>2</sub> dentro i canali in fase di loading, rispetto a quella della soluzione di HCl verso l'esterno.

Quanto al confronto tra le due tecniche si può sottolineare come:

- *Loading* tramite CO<sub>2</sub> supercritica: la struttura non ordinata, abbinata al quantitativo di farmaco superiore, ha migliorato l'efficacia nel rilascio di piroxicam. Al contrario, l'SBA-15 non ha mostrato un significativo vantaggio nell'utilizzo di questa tecnica, soprattutto per i lunghi periodi, nei quali si è osservato come non ci sia alcuna differenza tra l'SBA-15 trattata con CO<sub>2</sub> e la silice a mesoporosità non ordinata che ha subito *loading* tradizionale.

Quest'ultimo punto sottolinea l'importanza della mesostruttura dei due supporti caricati. In più, questa prova ha evidenziato come il desorbimento delle molecole adsorbite nel caso dell'SBA-15 risulti essere più difficoltoso, a causa della sua geometria, giustificando l'apparente isteresi manifestatasi nelle prove BET nel caso del supporto in questione caricato tramite adsorbimento da soluzione.

Per sottolineare la reale cinetica di rilascio da parte del materiale viene proposta la figura 7.4.



**Figura 38 - Percentuale di farmaco rilasciato in relazione al proprio massimo in funzione del tempo**

Le seguenti curve mostrano l'andamento del rilascio di piroxicam come percentuale di farmaco liberato da ciascun carrier rispetto al proprio valore massimo rilasciato alla fine della prova, ovvero il rapporto:

$$\% \text{ farmaco rilasciato} = \frac{\text{mg piroxicam rilasciati al } t = h}{\text{mg piroxicam rilasciati al } t = 72h} \cdot 100$$

Si può osservare come l'andamento sia opposto al caso precedente: il carrier che ha una cinetica più rapida risulta essere l'SBA-15 caricata tramite adsorbimento da etanolo che, tuttavia, decresce dopo aver toccato un massimo di efficacia nell'intorno delle 7 ore. Le altre tre curve hanno grossomodo lo stesso andamento, una leggera differenza si presenta nel caso dell'SBA-15 caricata tramite CO<sub>2</sub> supercritica, dove si osserva una cinetica di rilascio più elevata nelle prime 40 ore. Basandosi su questi dati, dunque, si ottiene un vantaggio nell'utilizzo di quest'ultimo materiale caricato tramite fluido supercritico, nonostante la minore quantità di piroxicam incorporato, nel caso di necessità di efficacia in tempi brevi.



## 8 Conclusioni e sviluppi futuri

È stato effettuato il drug loading del piroxicam su due silici a diversa mesoporosità, con diverse tecniche, due classiche e una innovativa, che ha previsto l'utilizzo di CO<sub>2</sub> supercritica. Le evidenze sperimentali hanno sottolineato l'effettivo miglioramento della solubilità del principio attivo, grazie all'avvenuta amorfizzazione, e un quantitativo di farmaco caricato superiore a quello offerto dall'utilizzo di etanolo come solvente.

I dati in possesso hanno però evidenziato che, sfortunatamente, la quantità di farmaco incorporato non è molto elevata e si attesta, nel migliore dei casi, al 15% per quanto riguarda il trattamento tramite CO<sub>2</sub> supercritica. Risulta esserci, comunque, un vantaggio e una migliore prestazione della silice a mesoporosità ordinata, a dispetto dei valori di superficie e di volume dei pori leggermente più bassi, rispetto alla concorrente Grace GMP. Il tutto è legato ad una diffusione facilitata dall'ordine dei pori stessi che inoltre rende l'adsorbimento più efficace.

Il rilascio del farmaco, a dispetto delle aspettative, risulta più conveniente nel caso della silice a mesoporosità disordinata, probabilmente a causa del fatto che la diffusione verso l'esterno sia limitata dalla struttura dell'SBA-15, nelle quali si osservano lunghi cammini diffusivi verso l'esterno. Deve essere sottolineata anche l'affinità della superficie di questo carrier verso il farmaco e la differente diffusione della CO<sub>2</sub> verso l'interno dei canali e della soluzione gastrica verso l'esterno di questi.

Tirando le somme, c'è una maggiore efficacia di loading nel caso dell'SBA-15, data la sua minore idrofilicità (che gioca un ruolo fondamentale nell'adsorbimento del piroxicam) ma un rilascio migliore nel caso della silice commerciale Grace GMP, più idrofila e quindi più propensa a rilasciare il farmaco.

Resta comunque il dato di fatto che il farmaco si è adsorbito e che risulta comunque esserci un vantaggio nell'utilizzo della CO<sub>2</sub> supercritica che, rispetto all'impregnazione tramite utilizzo di etanolo, è un solvente più pulito e quindi preferito, sia in termini di utilizzo che di smaltimento.

La bassa quantità di piroxicam incorporata esclude sicuramente l'utilizzo di un supporto del genere come delivery orale ma, in queste concentrazioni, può essere in alternativa preferito una via di assunzione topica e composizioni eudermiche, prevista dal farmaco, dove le concentrazioni di principio attivo risultano di norma inferiori, garantendo comunque un risvolto positivo nel trattamento in quanto il paziente, magari impossibilitato a seguire la frequenza della cura o se ne dimentichi, può beneficiare di un rilascio più costante per diverse ore, o giorni.

Data anche la probabile interferenza nelle dimensioni delle mesoporosità di entrambe le silici e la dimensione della molecola di piroxicam, sarebbe possibile compiere uno studio simile con dei carrier dotati di una porosità diametralmente più grande, al fine di poter comprendere se, effettivamente, le dimensioni siano un'ulteriore ostacolo alle quantità incorporate e alla cinetica del rilascio. Il sistema ideale sarebbe quello di una morfologia SBA-15 ottimizzata, intendendo che questo carrier offre la massima quantità adsorbita e la migliore distribuzione del farmaco, ma con una dimensione delle particelle, e quindi dei canali, più corta, al fine di

ridurre il cammino diffusivo verso l'esterno e avere una cinetica di diffusione più rapida, qualora richiesta.

## 9 Bibliografia

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] C.-Y. Lai *et al.*, “A Mesoporous Silica Nanosphere-Based Carrier System with Chemically Removable CdS Nanoparticle Caps for Stimuli-Responsive Controlled Release of Neurotransmitters and Drug Molecules,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 15, pp. 4451–4459, 2003.
- [4] M. Vallet-Regi, A. Rámila, R. P. Del Real, and J. Pérez-Pariente, “A new property of MCM-41: Drug delivery system,” *Chem. Mater.*, vol. 13, no. 2, pp. 308–311, 2001.
- [5] B. G. Trewyn, C. M. Whitman, and V. S.-Y. Lin, “Morphological Control of Room-Temperature Ionic Liquid Templated Mesoporous Silica Nanoparticles for Controlled Release of Antibacterial Agents,” *Nano Lett.*, vol. 4, no. 11, pp. 2139–2143, 2004.
- [6] D. Fitzpatrick, “Implantable Drug Delivery Systems,” *Implant. Electron. Med. Devices*, pp. 139–157, 2015.
- [7] Z. Nachum, A. Shupak, and C. R. Gordon, “Transdermal scopolamine for prevention of motion sickness: Clinical pharmacokinetics and therapeutic applications,” *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 45, no. 6, pp. 543–566, 2006.
- [8] R. Mortera, S. Fiorilli, E. Garrone, E. Verné, and B. Onida, “Pores occlusion in MCM-41 spheres immersed in SBF and the effect on ibuprofen delivery kinetics: A quantitative model,” *Chem. Eng. J.*, vol. 156, no. 1, pp. 184–192, 2010.
- [9] H. Danan and P. Esposito, “Critical gases for critical issues: CO<sub>2</sub> technologies for oral drug delivery,” *Ther. Deliv.*, vol. 5, no. 2, pp. 205–232, 2014.
- [10] B. Subramaniam, R. A. Rajewski, and K. Snavely, “Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no. 8, pp. 885–890, 1997.
- [11] A. A. Barros, J. M. Silva, R. Craveiro, A. Paiva, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, “Green solvents for enhanced impregnation processes in biomedicine,” *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 5, pp. 82–87, 2017.
- [12] A. Gignone, L. Manna, S. Ronchetti, M. Banchemo, and B. Onida, “Incorporation of clotrimazole in Ordered Mesoporous Silica by supercritical CO<sub>2</sub>,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 200, pp. 291–296, 2014.
- [13] S. J. Macnaughton, I. Kikic, N. R. Foster, P. Alessi, A. Cortesi, and I. Colombo, “Solubility of Anti-Inflammatory Drugs in Supercritical Carbon Dioxide,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 41, no. 5, pp. 1083–1086, 1996.

- [14] M. Moritz and M. Łaniecki, "SBA-15 mesoporous material modified with APTES as the carrier for 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 19, pp. 7523–7529, 2012.
- [15] E. Ahmadi, N. Dehghannejad, S. Hashemikia, M. Ghasemnejad, and H. Tabebordbar, "Synthesis and surface modification of mesoporous silica nanoparticles and its application as carriers for sustained drug delivery," *Drug Deliv.*, vol. 21, no. 3, pp. 164–172, 2014.
- [16] M. N. Tanaka *et al.*, "Encapsulation study of citalopram and risperidone into nanostructured silica SBA-15 for in vitro release evaluation," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 127, no. 2, pp. 1725–1732, 2017.
- [17] V. Ambrogi, F. Marmottini, and C. Pagano, "Amorphous carbamazepine stabilization by the mesoporous silicate SBA-15," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 177, pp. 1–7, 2013.
- [18] V. Ambrogi, L. Perioli, F. Marmottini, S. Giovagnoli, M. Esposito, and C. Rossi, "Improvement of dissolution rate of piroxicam by inclusion into MCM-41 mesoporous silicate," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 32, no. 3, pp. 216–222, 2007.
- [19] S. Jangra, S. Duhan, M. S. Goyat, V. Chhokar, S. Singh, and A. Manuja, "Influence of functionalized mesoporous silica in controlling azathioprine drug release and cytotoxicity properties," *Mater. Res. Innov.*, vol. 21, no. 7, pp. 413–425, 2017.
- [20] T. Lebold, C. Jung, J. Michaelis, and C. Bruchle, "Nanostructured silica materials as drug-delivery systems for doxorubicin: Single molecule and cellular studies," *Nano Lett.*, vol. 9, no. 8, pp. 2877–2883, 2009.
- [21] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, and G. D. Stucky, "Tri-, Tetra-, and Octablock Copolymer and Nonionic Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 24, pp. 6024–6036, 1998.
- [22] R. Mellaerts *et al.*, "Ordered mesoporous silica induces pH-independent supersaturation of the basic low solubility compound itraconazole resulting in enhanced transepithelial transport," *Int. J. Pharm.*, vol. 357, no. 1–2, pp. 169–179, 2008.
- [23] F. Torney, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, and K. Wang, "Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 5, pp. 295–300, 2007.
- [24] M. Banchemo and L. Manna, "Investigation of the piroxicam/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexation by means of a supercritical solvent in the presence of auxiliary agents," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 57, no. 3, pp. 259–266, 2011.
- [25] 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.

## 10 Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento va, in primo luogo, alla professoressa Barbara Onida, la quale ha riposto in me una grande fiducia, affidandomi la sperimentazione di un argomento pionieristico e rivelandosi un punto di riferimento nell'interpretazione dei dati, nel proporre nuovi spunti di lavoro e un grande supporto morale.

Ringrazio Federica Leone per aver dedicato tanto del suo tempo nell'aiutare me e il gruppo di tesisti nel lavoro sperimentale, a discapito del tempo dedicato al suo dottorato di ricerca, mostrando interesse verso il nostro lavoro.

Grazie al professor Luigi Manna e Mauro Banchemo per aver messo a disposizione il loro laboratorio e le loro strumentazioni e alla professoressa Silvia Ronchetti per l'aiuto nella strumentazione e l'interpretazione dei dati XRD.

Un forte abbraccio va ai miei genitori, i quali hanno avuto grande pazienza e fatto grandi sacrifici per mantenere questi anni di studio, soprattutto permettendomi di proseguire gli studi fuori sede e gioendo dei miei successi in ambito universitario. Vi sarò sempre riconoscente. Ringrazio mia zia Anita, mia sorella e i miei fratelli, in particolar modo mio fratello Domenico, il quale mi ha offerto un posto dove stare e avermi supportato nei periodi più complicati di questi tre anni, facendo sì che potessi dedicare più tempo possibile al raggiungimento della fine degli esami. È a voi che dedico la fine dei miei studi.

Un pensiero va ad una mia nuova amicizia, Roberta Cataldo, con la quale ho avuto modo di legare sin da subito, diventando un punto di riferimento, di svago e supporto morale nei momenti difficili, in questi mesi di attività di tesi, alleggerendo la pesantezza delle ore passate all'università. Grazie ad Arianna Gennari, per essermi stata accanto nei periodi più complicati e divertenti, dandomi modo di riscoprirmi molto più di una collega, ma una grande amica e confidente. Un grande grazie va a Francesca Benevento senza la quale, probabilmente, dovrei ancora dare analisi 1, essermi stata sempre vicina, presente e disponibile nei periodi più critici della mia carriera. Un ringraziamento anche ad Alessandra Piras che, anche se qui per poco tempo, mi ha dato tanto. Sembra che voi quattro vi conosca da molto più tempo.

Grazie al gruppo corale dei SineNomine per aver allietato numerose serate e offerto momenti di benessere mentale e fisico cantando con voi.

Un ringraziamento agli amici messinesi che mi hanno accolto qui a Torino: Erica, Rosaria, Marta e Giulia.

Infine, l'attenzione non può che ricadere su amici fisicamente lontani ma che porto con me nel cuore: Giuliana Bruno per TOTTE le risate e le infinite ore al telefono, Valerio D'Arrigo e Giulia Di Giacomo per aver messo una pietra sopra alle nostre divergenze ed esservi confermati gli amici di sempre, Alessandro De Trovato per il suo grande affetto nei miei confronti, Andrea Borgia (anche se qui presente a Torino) per avermi fatto sentire meno la mancanza di Messina, Eleonora e Veronica Currò per essermi amiche da innumerevoli anni nonostante tutto.

La mia più profonda gratitudine va a Novella Morabito, alla quale dedico questa tesi. Molto più di un'amica ma una sorella, una psicologa, la prima persona con la quale gioire e un faro di luce nei momenti più bui. Lei è la mia persona.