

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

Ossido di Zinco nanostrutturato come riserva di Ibuprofene



Relatori

prof.ssa Barbara Onida
prof. Luigi Manna
Federica Leone

Candidato

Roberta Cataldo

Dicembre 2017

Indice

1.	Introduzione	5
2.	Ossido di zinco nanostrutturato come <i>drug delivery system</i>	7
2.1	Proprietà e applicazioni di ZnO	10
2.2	Azione antibatterica di ZnO	12
2.3	ZnO come drug carrier	15
2.3.1	ZnO e farmaci anti-infiammatori	16
2.3.1. 1	Ibuprofene	16
2.4	Metodologie di sintesi	19
3.	CO ₂ supercritica in applicazioni farmaceutiche	23
3.1	Proprietà e applicazioni	23
3.2	ScCO ₂ e drug loading	27
3.3	ScCO ₂ e ibuprofene	30
4.	Tecniche di caratterizzazione	33
4.1	Diffrazione a raggi X	33
4.2	Analisi di adsorbimento di azoto	33
4.3	Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier	34
4.4	Microscopia elettronica a scansione	35
4.5	Spettroscopia ultravioletto-visibile	35
4.6	Analisi termogravimetrica	36
5.	Sintesi e caratterizzazione dei supporti	37
5.1	NsZnO-1	37
5.1.1	Sintesi	37
5.1.2	Caratterizzazione	38
5.2	NsZnO-2	43
5.2.1	Sintesi	43
5.2.2	Caratterizzazione	44
6.	Impregnazione dell'Ibuprofene	53
6.1	Incorporazione dell'ibuprofene con CO ₂ supercritica	52
6.1.1	Caratterizzazione	54
6.2.1. 1	NsZnO-1	54
6.2.1. 2	NsZnO-2	60

6.2	Adsorbimento da etanolo.....	64
6.2.1	Caratterizzazione.....	66
6.2.1. 1	NsZnO-1	66
6.2.1. 2	NsZnO-2	69
7.	Rilascio del farmaco	77
8.	Conclusioni	85
9.	Bibliografia	87

1. Introduzione

La nanotecnologia rappresenta una interessante piattaforma di studio all'interno della scienza dei materiali; uno dei principali motivi di interesse è la possibilità di sintetizzare particelle con dimensioni inferiori ai 100 nm, ordine di grandezza comparabile con le biomolecole all'interno della cellula.[1]

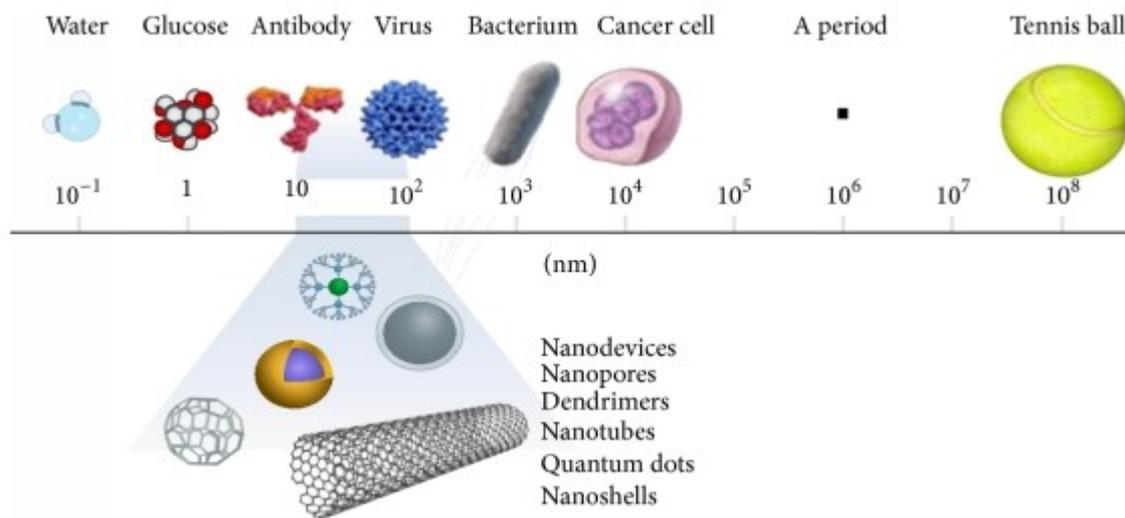


Figura 1.1 Confronto dimensionale di nanoparticelle con altri materiali di dimensioni maggiori[2]

Le principali applicazioni dei nanomateriali in campo medico e biologico sono [3]:

- Rivelazione di proteine e patogeni
- Drug e gene delivery
- Separazione e purificazione di molecole biologiche
- Distruzione cellule tumorali attraverso controllo della temperatura
- Studi sulla fagocinetica

Al momento, l'applicazione commerciale più diffusa in medicina per le nanoparticelle risulta quella inerente alla veicolazione di farmaci.

I vantaggi di usare nanoparticelle come *drug delivery system* sono associabili alla possibilità di manipolare adeguatamente la dimensione particellare e l'area superficiale attraverso la scelta di opportune metodologie di sintesi, la capacità delle stesse di legarsi al farmaco senza ulteriori reazioni chimiche che potrebbero causare inattività e degradazione del principio attivo e controllando il trasporto verso opportuni "organi bersaglio".

Questa caratteristica permette di poter utilizzare i nanomateriali nel campo biologico e biomedico, come veicoli per il rilascio di farmaci. [4]

Negli ultimi anni una grande varietà di nanoparticelle di ossidi metallici si sono rivelati efficienti come supporti per il *drug delivery* e *gene delivery*; tra questi è stato utilizzato l'ossido di ferro (IONPs) come *nanocarrier* per la somministrazione di agenti

antitumorali[5], TiO_2 come carrier per rilascio di complessi rutenici contro il melanoma[6].

Il seguente lavoro di tesi è stato rivolto allo studio e alla realizzazione di un sistema per il rilascio di farmaci in applicazioni topiche. Si è scelto di utilizzare un materiale nanostrutturato, quale l'ossido di zinco (ZnO), come vettore per il rilascio di ibuprofene. In particolare, l'attenzione è stata rivolta all'utilizzo di un metodo eco friendly, senza utilizzo di solventi organici, solitamente di difficile recupero. Nello specifico, è stata utilizzato il biossido di carbonio nello stato supercritico come alternativa ai classici metodi di incorporazione, grazie alle sue proprietà chimico-fisiche, di non tossicità ed economicità. In più, la sintesi dell'ossido di zinco non ha richiesto alcun tipo di solvente organico, in accordo alla scelta di un metodo "green".

Nel capitolo 2 verrà introdotto l'argomento del *drug delivery* in generale, con particolare riferimento all'ossido di zinco come *drug carrier* evidenziandone le sue proprietà e applicazioni.

Il capitolo 3 mostrerà l'utilizzo della CO_2 supercritica nelle applicazioni farmaceutiche come alternativa ai metodi tradizionali di *drug loading*. Verranno introdotti in linea generali i fluidi supercritici e le loro applicazioni industriali, con particolare riferimento alla possibilità di usarli per incorporare farmaci in diversi supporti.

Nel capitolo 4 l'attenzione verrà rivolta alle tecniche di caratterizzazione utilizzate, cercando di descriverne a grandi linee il funzionamento.

Nel capitolo 5 verranno introdotti i supporti utilizzati come possibili veicoli del farmaco, descrivendone la sintesi e i risultati derivanti dalla caratterizzazione.

Il capitolo 6, invece, illustrerà i due metodi utilizzati per incorporare il farmaco, tramite processo in scCO_2 e adsorbimento tradizionale da soluzione, e i relativi risultati ottenuti da ciascuno.

Il capitolo 7 è quello conclusivo della parte sperimentale di questo lavoro che sarà incentrato sulla capacità di rilascio dell'ibuprofene.

Nel capitolo 8 saranno messe in luce le conclusioni di questa tesi al quale seguirà la bibliografia.

2. Ossido di zinco nanostrutturato come drug delivery system

Con il termine *drug delivery* ci si riferisce alla somministrazione e veicolazione di composti farmaceutici all'interno del corpo (umano e animale) attraverso sistemi a rilascio controllato, tramite i quali si possono ottenere grandissimi vantaggi rispetto alle terapie farmacologiche tradizionali. I convenzionali dispositivi implicano la preparazione del farmaco in una determinata forma; questa può essere una pastiglia, nel caso di somministrazione orale, o ad esempio una soluzione, nel caso di somministrazione intravenosa. La limitazione può essere dovuta all'alto dosaggio che potrebbe portare a tossicità ed effetti collaterali se il farmaco dovesse interagire con parti del corpo non interessate

I drug delivery systems sono basati sul coordinamento di tre componenti essenziali: farmaco, molecola "target" e carrier; sono stati sviluppati per aggirare e surclassare queste limitazioni permettendo di migliorare l'efficacia e la sicurezza di un farmaco attraverso controllo della velocità, del tempo, del luogo e del dosaggio di principio attivo rilasciato nel corpo.

Tra i vantaggi possiamo trovare[7]:

- Diminuzione della tossicità
- Diminuzione effetti collaterali
- Possibilità di curare malattie specifiche attraverso la specificità del rilascio
- Maggiore efficienza terapeutica
- Convenienza

Diversi studi hanno dimostrato i benefici derivanti da un corretto tempo di somministrazione del farmaco e cinetica di rilascio del farmaco controllato, regolando così sia la velocità del rilascio che l'organo bersaglio su cui agire.

I drug carrier vengono usati nel rilascio controllato al fine di prolungare l'azione in vivo, diminuire il metabolismo del farmaco, ridurre la sua tossicità e determinare dove indirizzare il farmaco. Questi possono essere composti naturali o sintetici; i più comuni sono liposomi, micelle, dendrimeri, polimeri, microsfele, proteine e nanoparticelle. Queste ultime rappresentano una innovazione in questo campo poiché grazie alla loro dimensione sono in grado di trasportare il farmaco al loro interno o legarsi ad esso superficialmente. Generalmente non vengono identificate come organismi estranei all'interno del corpo e possono essere utilizzate per arrivare in punti in cui altri non possono arrivare.

Tabella 2.1 Elenco di classi di particelle usate in campo biomedico[7]

Particle class	Materials	Application
Natural materials or derivatives	Chitosan	Drug/Gene delivery
	Dextrane	
	Gelatine	
	Alginates	
	Liposomes	
Dendrimers	Branched polymers	Drug delivery
	Fullerenes	Carbon based carriers Photodynamics
Polymer carriers	Poly(lactide) acid	Drug delivery Drug/gene delivery
	Poly(cyano)acrylates	
	Polyethylenimine	
	Block copolymers	
	Polycaprolactone	
Ferrofluids	SPIONS	Imaging (MRI)
	USPIONS	
Quantum dots	Cd/Zn-selenides	Imaging In vitro diagnostics
Various	Silica-nanoparticles	Gene delivery
	Mixtures of above	

Il rilascio del farmaco si basa sulla legge della diffusione, o legge di Fick e si basa quindi sul gradiente di concentrazione.

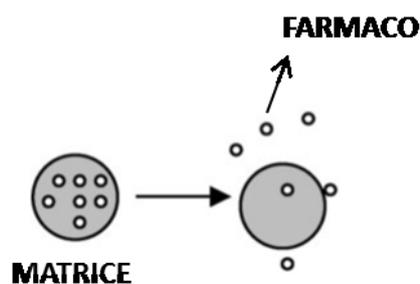


Figura 2.1 Rappresentazione schematica del rilascio del farmaco da un sistema di riserva

L'efficienza del drug delivery si basa sulle interazioni tra il farmaco e i carrier che vengono usati come veicoli [8].

L'affinità è definita come la tendenza di una molecola ad associarsi con un'altra molecola attraverso interazioni di vario tipo quali legami idrogeno, forze di van der Waals ed interazioni elettrostatiche.

In figura 2.2 vengono mostrati gli andamenti della percentuale di rilascio in funzione del tempo per tre sistemi diversi in base alla loro affinità.

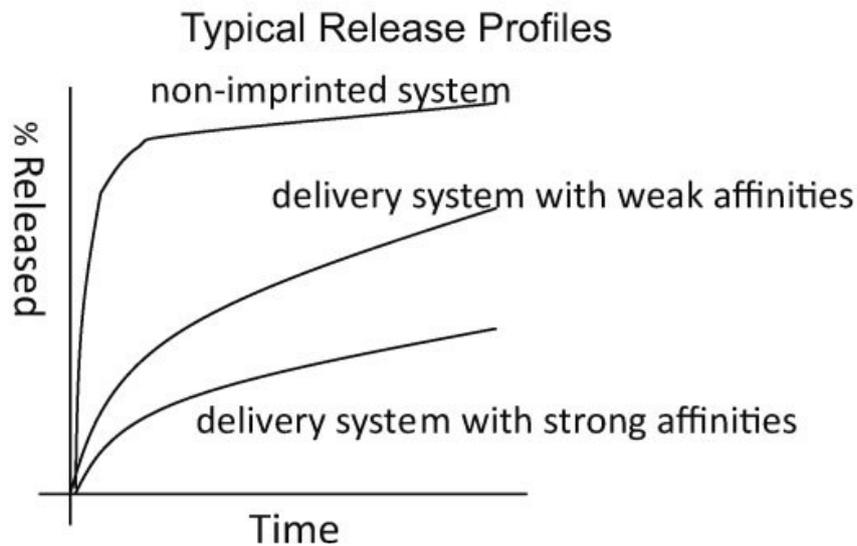


Figura 2.2 Curve della % di rilascio in funzione del tempo per sistemi con affinità diversa [8]

Le vie di somministrazione dei farmaci sono molteplici: orale, intranasale, dermica, intravenosa e molte altre.

Negli ultimi tempi quella dermica e transdermica hanno suscitato un maggiore interesse nell'industria farmaceutica, rappresentando una valida alternativa a quello orale, soprattutto per farmaci scarsamente solubili in acqua.

Nel caso di applicazioni transdermiche vi è la necessità che il farmaco venga rilasciato in modo controllato e relativamente lento nel tempo.

Il rilascio di questi sistemi può essere descritto da un modello di ordine zero rappresentato dalla seguente equazione:

$$Q_t = Q_0 + K_0t \quad (2.1)$$

con Q_t, Q_0 rispettivamente la quantità di farmaco dissolta nel tempo e quella iniziale in soluzione e K_0 la costante cinetica di ordine zero espressa come concentrazione/tempo[9]. Gli andamenti di una cinetica di ordine zero nel caso di rilascio controllato è riportato in figura 2.3.

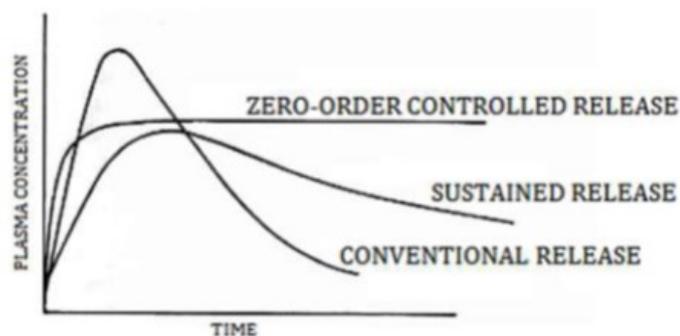


Figura 2.3 Andamenti cinetici della concentrazione di plasma in funzione del tempo[9]

2.1 Proprietà e applicazioni di ZnO

Tra gli ossidi metallici, l'ossido di zinco è stato quello più studiato nelle ultime decadi grazie alla sua estrema versatilità e multifunzionalità, rendendolo un materiale fondamentale in numerose applicazioni.

L'ossido di zinco (ZnO) è un composto inorganico solido di colore bianco e inodore. Le strutture cristalline di questo materiale sono *wurtzite*, *zinc-blend* e *rock salt*, come mostrato in figura:

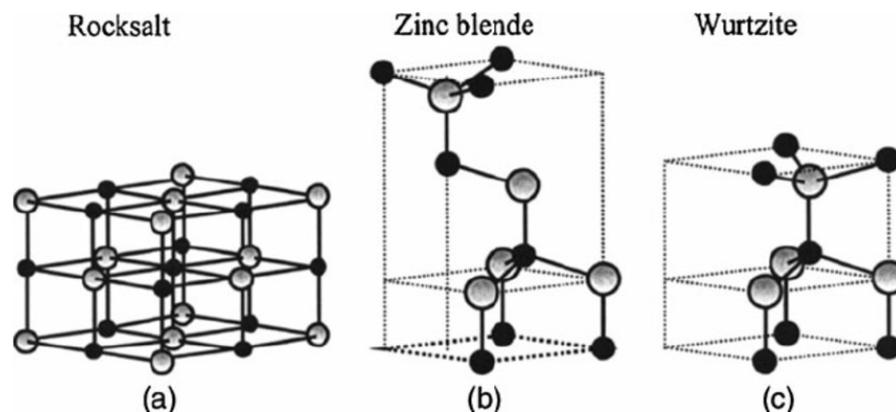


Figura 2.4 Strutture cristalline di ZnO: a) rocksalt, b) zinc blende, c) wurtzite[10]

La struttura termodinamicamente più stabile a temperatura ambiente è la wurtzite dove ciascun atomo di zinco è circondato da un tetraedro di quattro atomi di ossigeno formando così una combinazione alternata di piani di atomi di zinco e ossigeno. I tetraedri sono orientati in una sola direzione garantendo una simmetria esagonale.

Le altre due strutture possono essere stabilizzate solo dalla crescita su substrati cubici (zinc-blend) o a valori relativamente altri di pressione (rocksalt)[10].

L'ossido di zinco è un composto semiconduttore II-IV con bandgap di 3.37 eV ed energy binding di 60 mV.

La coordinazione tetraedrica è tipica di un legame covalente sp^3 , tuttavia questo materiale presenta un carattere ionico che incrementa il bandgap.

È definito un materiale multifunzionale per le sue particolari proprietà fisiche e chimiche, alcune delle quali riportate in tabella 2.1.

Physical appearance	White, colorless, odorless solid
Crystalline structure	Wurtzite
Molecular Weight	81.38 g/mol
Electron effective mass	60
Melting Point	1,975°C
Density	5.47 g/cm ²
Isoelectric point	9.5–10
Space group	C_{6v}^4 - $P6_3mc$
Standard molar entropy	43.9 J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹
Standard enthalpy of formation	-348.0 kJ/mol

Tabella 2.1 Elenco delle principali proprietà di ZnO

La sua grande versatilità è dovuta all'esistenza di numerose morfologie ad elevata area superficiale[11], derivanti dall'incredibile varietà di metodi di sintesi con cui è possibile produrlo.

Queste strutture, che possono essere classificate in quattro differenti classi (0D, 1D, 2D, 3D) includono ad esempio: nanoparticles[12], nanowires[13], nanotubes[14], nanobelts, nanoring[15], flower-like morphology[16]

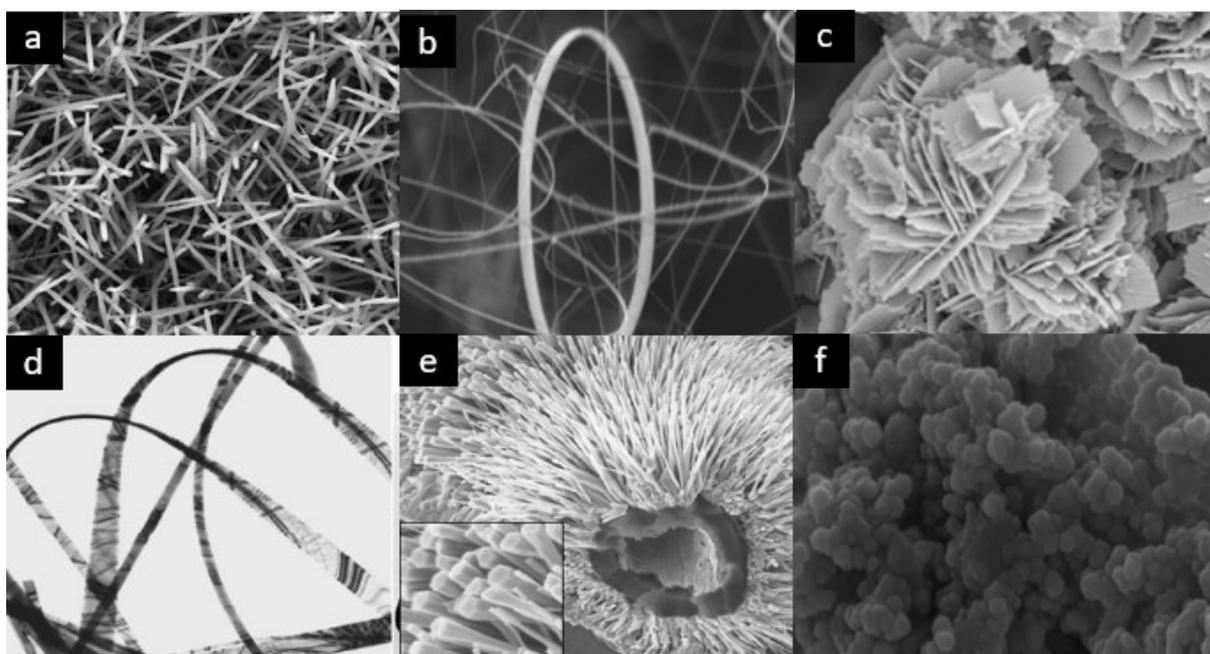


Figura 2.5 Esempi di differenti morfologie di ZnO: a) nanorods, b) nanorings, c) flower-like, d) nanobelts, e) nanowires, f) nanoparticles [15]

In particolare, la morfologia è dipendente da tre parametri fondamentali: composizione del materiale usato come fonte di ioni Zn^{++} , temperatura di crescita e velocità di diffusione[17].

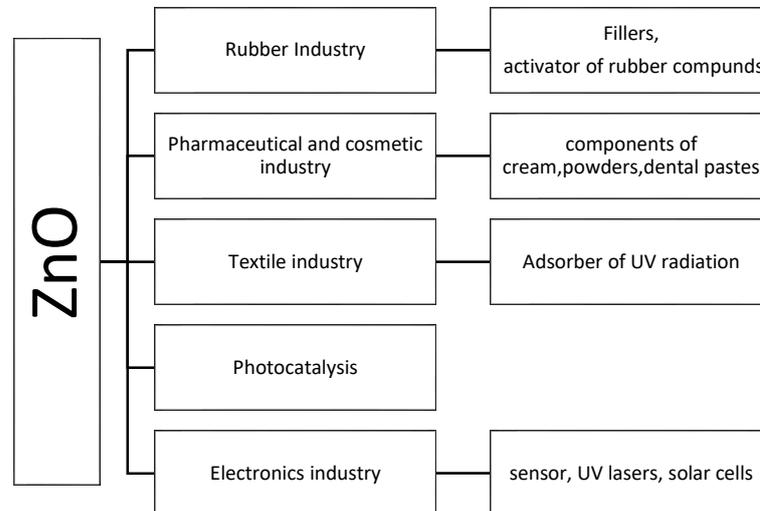


Figura 2.6 esempi di applicazioni di ZnO [22]

2.2 Azione antibatterica di ZnO

Una interessante caratteristica di questo ossido, in ambito biomedicale, è la particolare capacità di svolgere un'azione antibatterica che lo rende un materiale altamente versatile.

L'azione antibatterica delle nanoparticelle di ZnO, nonostante sia ancora incerta, può essere attribuita a diversi meccanismi [18]:

- Rilascio di ioni Zn^{++}
- Formazione di ROS (Reactive Oxygen Species)
- Interazioni elettrostatiche tra ZnO e la superficie del batterio

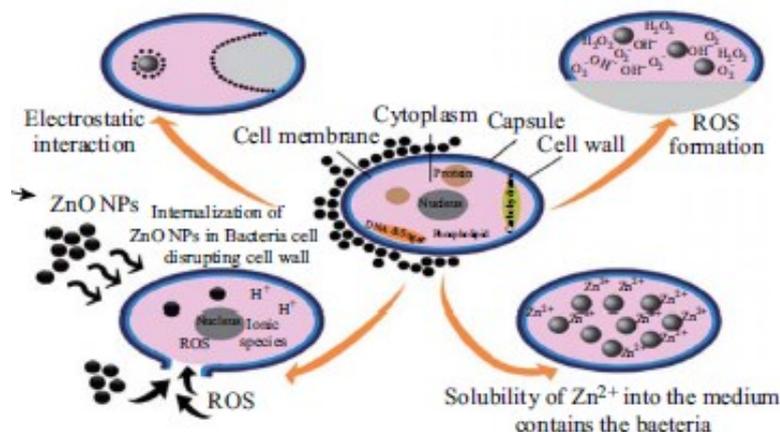


Figura 2.7 Rappresentazione grafica dell'azione antibatterica esercitata da ZnO[18]

La tossicità dei ROS nei confronti dei batteri è attribuita alla loro elevata reattività e proprietà ossidante, che comporta la distruzione della parete cellulare e conseguentemente quella dei componenti cellulari come lipidi, DNA e proteine, portando così alla morte dei microrganismi. L'azione antibatterica si è dimostrata efficiente sia nei confronti dei gram- che gram+; la differenza tra queste due categorie risiede essenzialmente nel diverso spessore della parete batterica. Tra questi microrganismi fanno parte anche quelli derivanti da contaminazioni alimentari come *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus*.

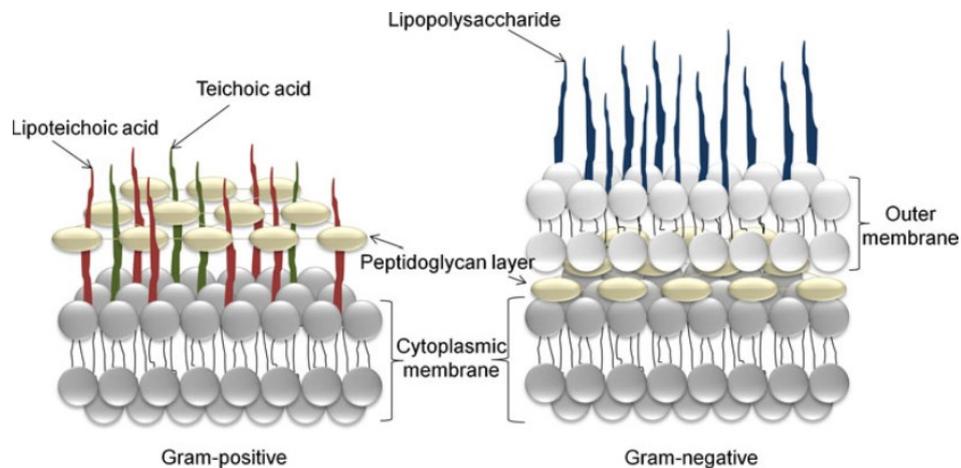
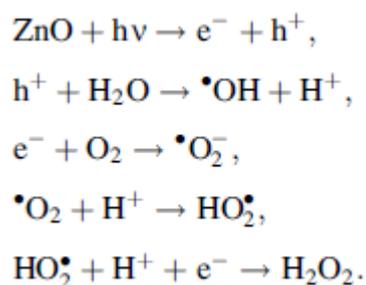


Figura 2.8 Rappresentazione grafica della composizione cellulare di batteri Gram- e Gram+ [19]

Ad esempio nell'articolo di Xie et al[20] è stata studiata l'azione antibatterica nei confronti del M.O. *Campylobacter jejuni*. dimostrando l'interazione diretta tra le ZnO nanoparticellare e le superfici cellulari; le NPs influenzano la permeabilità della membrana causando uno stress ossidativo nelle cellule batteriche che provoca inibizione nella crescita e morte.

Le reazioni chimiche che portano alla formazione di ROS a partire da ZnO sono le seguenti:



In diversi studi è stato anche dimostrato che la somministrazione in contemporanea di nanoparticelle di ZnO e di farmaci chemioterapici e quindi il loro effetto sinergico possa portare alla distruzione di cellule tumorali se potenziato dalla radiazione UV[1]. Queste possono quindi essere utilizzate anche come valida alternativa per le terapie contro il cancro, grazie alla loro dimensione e citotossicità. [21]

L'ingegneria genetica sembra quindi avere un ruolo fondamentale nella scoperta di nuovi trattamenti anti-cancro grazie alla possibilità di isolare il gene codificante le cellule cancerogene.

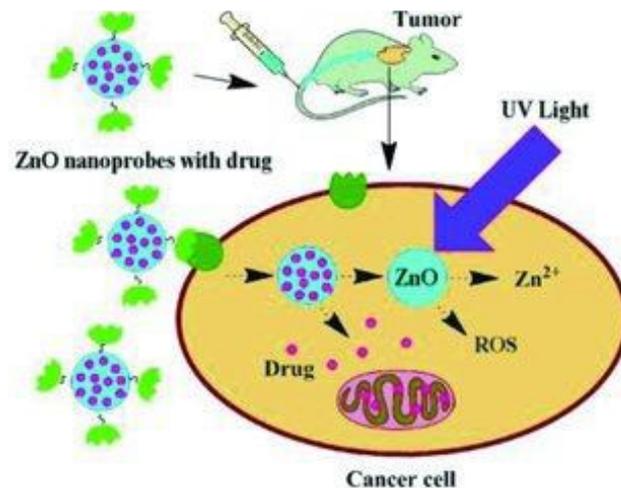


Figura 2.9 Meccanismo di azione di ZnO nei confronti di una cellula tumorale[1]

La tossicità di ZnO nei confronti dei batteri può essere anche attribuita al rilascio degli ioni Zn^{++} in soluzione; nello specifico questi ioni interagiscono con i gruppi funzionali presenti sulla parete batterica andando a creare uno squilibrio di carica che porta alla rottura della parete cellulare.

Il terzo meccanismo citato è quello relativo alle interazioni elettrostatiche. In questo caso si viene a creare una interazione tra le cariche opposte presenti nella superficie del microrganismo e dell'ossido di zinco che porta a uno squilibrio del metabolismo cellulare e conseguente morte del batterio.

L'azione antibatterica permette che l'ossido di zinco trovi applicazione in diversi campi industriali [22], quali alimentare, farmaceutico, tessile.

Nell'industria farmaceutica il suo utilizzo è indirizzato verso la produzione di una grande varietà di medicinali, somministrati sia oralmente che localmente sotto forma di creme, lozioni e polveri.

L'ossido di zinco viene riconosciuto come un materiale GRAS (*generally recognized as safe*) dalla "Food and Drug Administration" e per questo porta alla sua applicazione nell'industria alimentare come additivo di alimenti come i cereali, ma anche in prodotti

alimentari animali in quanto fonte di zinco e come potenziale battericida nel packaging[19].

Negli ultimi anni, infatti, la richiesta di nuove tecnologie per il controllo di patogeni di origine alimentare si è intensificata arrivando alla necessità di trovare un packaging antimicrobico, ovvero un particolare tipo di imballaggio in grado di interagire con il prodotto al fine di ritardare, ridurre o inibire la crescita di microrganismi presenti sulla superficie degli alimenti. In questo modo è stato possibile diminuire la concentrazione di additivi direttamente nel prodotto migliorandone e incrementandone la shelf-life.

In generale i composti inorganici presentano una forte attività antibatterica anche a basse concentrazioni grazie alla loro elevata superficie specifica, stabilità termica e non-tossicità. Questi materiali sono in grande misura nanoparticelle di ossidi metallici, come l'ossido di zinco.

Nell'articolo di riferimento di Espitia et al.[19] sono state incorporate particelle di ZnO in differenti materiali con differenti tecniche dimostrando l'efficacia dell'azione antimicrobica per diversi agenti patogeni.

Anche nell'industria tessile viene utilizzato l'ossido di zinco come agente antimicrobico; in particolare questo composto inorganico viene additivato al tessuto sia per la protezione delle utenze dai microrganismi patogeni, sia per la protezione del tessuto stesso da danni causabili dagli agenti microbici[23].

2.3 ZnO come drug carrier

L'ultimo decennio ha visto risultati significativi nella diagnostica biomedica. In generale nanoparticelle con luminescenza o con proprietà magnetiche sono utilizzate come sonde di rilevamento e trasportatori di farmaci, sia *in vitro* che *in vivo*.

Le nanoparticelle di ZnO, grazie alla loro buona biocompatibilità e basso costo hanno mostrato un potenziale promettente nel bioimaging, nel *drug delivery* grazie alle proprietà antibatteriche, antidiabetiche, anticancerogene, anti-infiammatorie[24]. La scelta di utilizzare ZnO come drug carrier risiede anche nella buona biodegradibilità, elevata loading capacity e le molteplici metodologie per sintetizzarlo[25].

Negli ultimi anni diversi ricercatori hanno studiato la possibilità di ottenere ZnO da utilizzare come carrier, implementando l'area superficiale; l'elevata area superficiale è infatti una caratteristica fondamentale per ospitare una molecola di farmaco e successivamente rilasciarla.

In letteratura l'ossido di zinco viene indirizzato soprattutto verso il veicolo di farmaci chemioterapici; nell'articolo di Mitra si utilizza ZnO poroso per l'incorporazione e il rilascio della doxorubicina, antibiotico con ampio spettro antitumorale usato nel trattamento contro melanomi, sarcomi e fibroblasti muscolari [26].

Nel luglio 2017, Zamari et al. si sono occupati di preparare un materiale composito a base di ossido di zinco e ossido di grafene per il veicolo di un altro farmaco chemioterapico, la curcumina[27].

Di seguito, in tabella 2.2, si riportano altri lavori in cui è stato utilizzato l'ossido di zinco come drug carrier, anche come materiale composito.

Tabella 2.2 Lavori riportati in letteratura che utilizzano ZnO come drug carrier

Materiale	Farmaco	Riferimenti
mZnO/PLGA/GE	Camptotecina	[28]
ZnO	Clotrimazolo	[29]

2.4 ZnO e farmaci anti-infiammatori

I farmaci anti-infiammatori rappresentano una vasta gamma di molecole, molti con un forte potenziale per le applicazioni topiche. Questi farmaci possono essere suddivisi in farmaci anti-infiammatori steroidei e non steroidei.

Lo zinco è noto come agente anti-infiammatorio. Recenti studi hanno dimostrato l'uso di ioni di zinco per incrementare l'effetto anti-infiammatorio dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS); a tal proposito Olbert et al. hanno dimostrato che questo effetto è intensificato nel caso di ZnO nanoparticellare [30]

2.4.1 Ibuprofene

L'ibuprofene, derivato dell'acido propionico, è un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (NSAID) con proprietà analgesiche e antipiretiche, comunemente utilizzato per il trattamento della febbre, debolezza e dolori di media entità [31] in particolare associati ad infiammazioni, post-operatori o artriti reumatoidi (artriti causate dal gonfiore del rivestimento articolare).

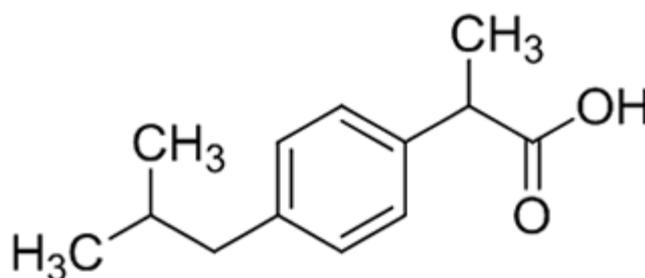


Figura 2.10 Formula di struttura dell'ibuprofene

Il meccanismo d'azione dell'ibuprofene è stato attribuito alla sua capacità di inibire la sintesi di determinate molecole, le prostaglandine, all'interno del corpo umano bloccando un enzima fondamentale per la loro produzione. Le prostaglandine rivestono un ruolo biologico importante come mediatori di reazioni infiammatorie, dolore, febbre.

Questo farmaco viene di norma somministrato oralmente, sotto forma di pastiglie, capsule, sospensioni e soluzioni orali; il dosaggio richiesto per l'effetto terapeutico in un adulto è di circa 20 mg ~ 30 mg ma la dose prevista dovrebbe essere dieci volte superiore a causa dello scarso assorbimento dovuto alla sua bassa solubilità in acqua.

Per aggirare e superare questi limiti, recentemente, si è posta l'attenzione sulla possibilità di sviluppare formulazioni parenterali o applicazioni topiche (crema, gel, schiuma) che offrono una valida alternativa alla somministrazione orale per il trattamento locale dell'infiammazione della pelle.

Solitamente l'infiammazione della pelle o la presenza di un'infezione si registrano dopo interventi chirurgici, ustioni o abrasioni; al fine di evitare un ritardo nella guarigione del paziente, che potrebbe portare anche alla morte, sono state adottate diverse strategie. Tra queste sono inclusi l'uso di determinate medicazioni anti-batteriche che potrebbero ritardare o inibire la proliferazione dei microrganismi o l'uso di farmaci antiinfiammatori, come l'ibuprofene[32].

Un medicamento sotto forma di schiuma è semplice da usare, garantisce un costante rilascio di basse dosi di ibuprofene permettendo di ridurre sia il dolore persistente sia quello temporaneo causato dalla ferita; inoltre riduce anche gli effetti collaterali derivanti da un elevato dosaggio che potrebbero causare ulcere o dolori gastro-intestinali.

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che l'ibuprofene, inoltre, non danneggia le cellule vitali e questo rappresenta un aspetto cruciale nella realizzazione di applicazioni per la guarigione delle ferite[33][34][35][4].

Morgado et al., hanno confermato questa ipotesi realizzando un sistema composito di polivinilalcol, chitosano e β -ciclodestrine, evidenziando come, in presenza di ibuprofene, l'attività metabolica cellulare non sia calata drasticamente dopo 7 giorni[32].

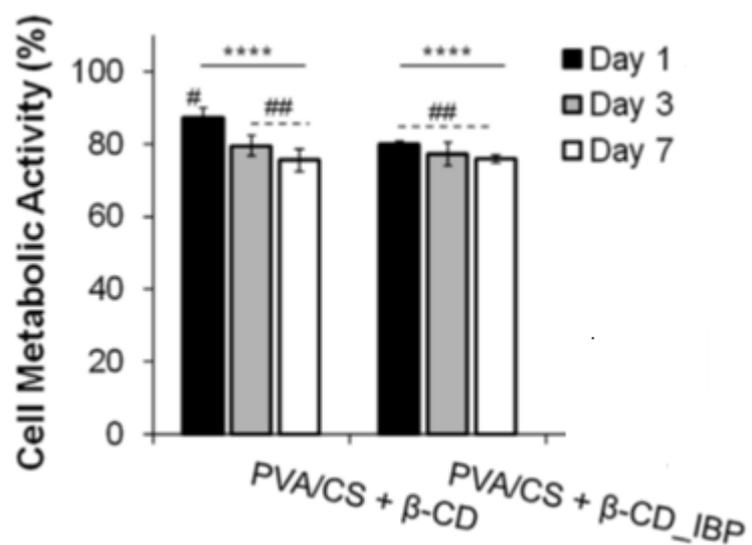


Figura 2.11 Effetto dell'ibuprofene sull'attività metabolica cellulare [32]

Le principali caratteristiche chimico-fisiche dell'ibuprofene sono riassunte in tabella 2.3

Tabella 2.3 Proprietà chimico fisiche dell'ibuprofene [Drug Bank]

Peso molecolare	206,285 g/mol
Solubilità in acqua	0,0684 mg/mL
pKa	4,85
Aspetto	Polvere cristallina bianca

2.5 Metodologie di sintesi

In questo paragrafo verranno presentate le varie tipologie di sintesi per ottenere l'ossido di zinco con particolare riferimento a quelle utilizzate in questo lavoro sperimentale. Generalmente le proprietà di ZnO dipendono fortemente dalla sua nanostruttura la quale è strettamente correlata alla tecnica usata per sintetizzare il materiale.

Una grande varietà di tecniche possono essere usate per produrre ossido di zinco. Queste si dividono principalmente in tre categorie: metodi chimici, biologici e fisici.[36]

Tabella 2.4 Elenco metodologie di sintesi di NP ZnO[36]

Sintesi di ZnO nanoparticellare		
<i>Sintesi di tipo chimico</i>	<i>Sintesi di tipo biologico</i>	<i>Sintesi di tipo fisico</i>
Fase gas <ul style="list-style-type: none"> - Pirolisi - Metodo di condensazione di gas Fase liquida <ul style="list-style-type: none"> - Precipitazione - Metodo colloidale - Processo Sol-gel - Microemulsione - Metodo Idrotermale 	<ul style="list-style-type: none"> - Da materiali di rifiuto - Mediato da microbi - Mediato da piante 	<ul style="list-style-type: none"> - Macinazione ad alta energia - Solid, physical and Chemical vapor deposition - Ablazione laser

I metodi di sintesi utilizzati in questa tesi sono metodi di natura chimica in fase liquida; tra questi sono stati usati la *Chemical bath deposition* e il *sol-gel method*.

- *CHEMICAL BATH DEPOSITION*

Il meccanismo chiave si basa sulla crescita di materiali inorganici stratificati da usare come donatori di ioni Zn^{2+} . La maggior parte dei processi chimici che utilizzano questo metodo si basano su sali di zinco come precursori (cloruro di zinco, nitrato di zinco, solfato di zinco, acetato di zinco). In genere un agente precipitante viene aggiunto in soluzione (idrossido di sodio, urea) che miscelandosi con il precursore porta alla formazione di un prodotto intermedio e successivamente, previa calcinazione, all'ossido di zinco[24].

Nel lavoro di Koao et al.[16] come precursore è stato usato acetato di zinco e come precipitanti l'ammoniaca e la tiourea.

In un altro articolo è stato sempre utilizzato acetato di zinco ed etilendiammina[37]

Nell'articolo di Kakiuchi[38], invece, sono state preparate quattro diverse soluzioni con acetato di zinco, cloruro di zinco, nitrato di zinco esaidrato e solfato di zinco eptaidrato come precursori e urea come precipitante.

I vantaggi di questo metodo risiedono nella facilità di preparazione, costo basso, versatilità e bassa temperatura.

- *SOL-GEL METHOD*

Questo metodo è fortemente utilizzato per ottenere svariati tipi di morfologie di ossido di zinco, quali le *flower-like particles*. Il suo grande vantaggio è la semplicità del metodo stesso, la capacità di controllare i componenti chimici e il basso costo. I principali fattori che influenzano la composizione finale in termini di morfologia e dimensione delle particelle sono il pH della soluzione, il tempo, la concentrazione del precursore e il trattamento termico finale; nel lavoro di Wang et al. è stato infatti dimostrato che una morfologia di tipo *flower* e *rods* può essere ottenuta semplicemente variando la basicità della soluzione

Solitamente come precursori vengono utilizzati sia composti inorganici (es. nitrato di zinco) sia organici (es. acetato di zinco).

Nel lavoro di Alwan et al.[39] è stato usato come precursore l'acetato di zinco diidrato, sciolto successivamente in acqua bidistillata. La soluzione è stata asciugata a 80°C per diverse ore in forno dove è avvenuta la completa conversione in ossido di zinco, con l'ottenimento di nanoparticelle di 100-200 nm.

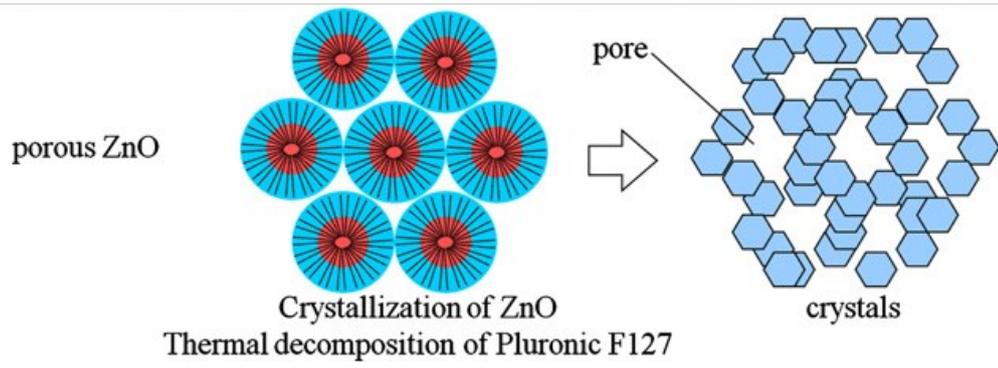


Figura 2.11 Meccanismo di formazione di ZnO poroso

3. CO₂ supercritica in applicazioni farmaceutiche

3.1 Proprietà e applicazioni

I processi farmaceutici stanno diventando estremamente importanti e questo ha portato la competizione globale a focalizzarsi, oltre che sull'aspetto economico, anche sull'impatto ambientale.

Proprio per questo motivo le industrie farmaceutiche si sta indirizzando verso una tecnologia di tipo "green" che sembra avere un impatto positivo sulla natura e l'ambiente; questo obiettivo ha portato alla scelta di utilizzare fluidi supercritici, ovvero fluidi che quando si trovano in condizioni di temperatura superiore a quella critica e pressione superiore alla pressione critica presentano proprietà in parte analoghe a quelle di un liquido (ad esempio la densità) ed in parte simili a quelle di un gas (ad esempio viscosità, coefficiente di diffusione)[40].

Di conseguenza un fluido supercritico può comportarsi da solvente (potere solvente proporzionale alla densità) e grazie alla bassa viscosità ed elevato coefficiente di diffusione mostra buone proprietà di trasporto.

Stato del fluido	Densità (ρ , g/cm ³)	Diffusività (D_{AB} , cm ² /s)	Viscosità (μ , g s/cm)
Gas (P=1 atm, T=21°C)	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Liquido (P=1 atm, T= 15-30°C)	1	<10 ⁻⁵	10 ⁻²
Supercritico (Pc, Tc)	0.3-0.8	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ -10 ⁻³

Tabella 3.1 Range di valori di diverse proprietà chimico-fisiche di gas, liquidi e fluidi supercritici[41]

Più del 98% dei processi farmaceutici utilizzano come fluido supercritico il biossido di carbonio (CO₂) che risulta inodore, incolore, non tossico, non infiammabile, riciclabile e a basso prezzo. Questo presenta un punto critico estremamente basso (temperatura critica pari a 31,4°C e pressione critica pari a 74 bar).

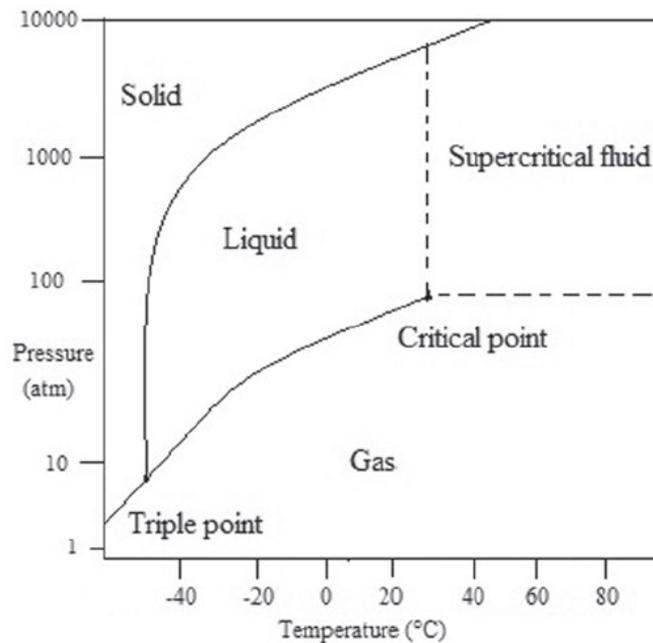


Figura 3.1 Diagramma di stato dell'anidride carbonica

Le applicazioni dei fluidi supercritici (SF) sono molteplici, dall'estrazione di prodotti alimentari e nutraceutici (es. caffè), formazione e preparazione di schiume e aerogels[42], sintesi di complesse molecole organiche, ottimizzazione della qualità dei farmaci in termini di controllo della morfologia e della dimensione particellare[43].

Estrazione

L'estrazione con fluidi supercritici è una tecnologia green rappresentante una valida alternativa ai sistemi classici di estrazione con solventi organici che risultano tossici per l'uomo e l'ambiente e, nel caso di processi alimentari, potrebbero contaminare il prodotto finale. Usando fluidi supercritici, soprattutto anidride carbonica, si riesce ad avere un processo pulito, selettivo con prodotto estratto di elevata qualità e purezza.

Come fluido supercritico viene usato essenzialmente la CO₂ poiché, essendo un gas a temperatura ambiente, una volta completato il processo di estrazione è necessario semplicemente depressurizzare il sistema per non avere residui di solvente.

A causa del suo carattere apolare non è in grado di estrarre composti polari; a tal scopo possono essere aggiunte piccole quantità di questi ultimi per migliorarne l'efficienza.

L'estrazione con fluidi supercritici permette, ad esempio, di estrarre la caffeina dai chicchi di caffè[44], oli essenziali[45][46], estrarre molecole biologiche[47] ed inquinanti organici[48].

Cromatografia

La cromatografia è una tecnica analitica che permette di separare miscele chimiche in singoli componenti.

La *Supercritical Fluid Chromatography* (SFC) è una tecnica relativamente recente che rispetto alle altre tecniche cromatografiche utilizza un fluido supercritico come fase mobile invece di un gas o un solvente allo stato liquido. Il processo e quindi le apparecchiature utilizzate sono le stesse della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) ma presenta vantaggi inerenti a una migliore, efficiente e veloce separazione.

Dry cleaning

Anche in questo settore vengono usati i fluidi supercritici come validi sostituti ai normali solventi organici che potrebbero portare alla formazione di residui tossici. Il vantaggio di questa tecnologia risiede nella possibilità di cambiare la solubilità di diversi composti variando semplicemente i valori di pressione e temperatura del fluido; inoltre grazie alla bassa viscosità ed elevata diffusività sono in grado di arrivare anche in piccole cavità dimostrando un'elevata efficienza. Infine, come già è stato detto precedentemente, depressurizzando il sistema fino a condizioni ambiente è possibile eliminare tutti i residui di solvente.

Stampaggio a iniezione o estrusione

In questo settore viene utilizzata la CO₂ supercritica per diminuire la viscosità e quindi ridurre la relativa pressione necessaria da applicare per effettuare lo stampaggio[49]. Questo si traduce in una diminuzione dei tempi di processo con conseguente incremento dei tassi di produzione. La possibilità di accostare al trattamento una temperatura più bassa permette conseguentemente di poter trattare materiali termolabili.

Sintesi di particelle polimeriche

I metodi convenzionali per sintetizzare particelle polimeriche presentano limitazioni relative all'uso di solventi organici che potrebbero essere dannosi sia per l'ambiente che per il sistema fisiologico; inoltre potrebbero portare alla sintesi di particelle con una distribuzione eterogenea della dimensione. La tecnologia che utilizza fluidi supercritici è stata ben investigata negli ultimi anni proprio per minimizzare e superare questi ostacoli e produrre micro e nanoparticelle biodegradabili andando a scegliere un adeguato solvente da utilizzare[4].

Generalmente la tecnica utilizzata prevede una rapida espansione da una soluzione supercritica dove il fluido si comporta come antisolvente (RESS); nello specifico il materiale viene dissolto in CO₂ supercritica e successivamente fatto passare attraverso un ugello. Come risultato della rapida espansione causata dalla riduzione di pressione si ha la formazione di particelle polimeriche piccole e uniformi, grazie a una elevata velocità di nucleazione rispetto a quella di accrescimento dei germi cristallini.

L'unico prerequisito di questa tecnica concerne l'elevata solubilità che deve avere il materiale nei confronti del fluido supercritico; il vantaggio invece risiede nella possibilità di utilizzare il processo anche per materiali termolabili. Questo fa sì che si possa utilizzare anche in ambito farmaceutico per la formazione di materiali veicolanti i farmaci[50].

In ambito farmaceutico, tuttavia, la più grande applicazioni dei fluidi supercritici risiede nell'impregnazione di farmaci in matrici adeguate per applicazioni biomediche, che verrà discusso nel paragrafo successivo.

Di seguito vengono riportati alcuni esempi di fluidi supercritici, come validi sostituti ai tradizionali solventi organici.

Fluido supercritico	Formula chimica	Temperatura critica (°C)	Pressione critica (MPa)
Acqua	H ₂ O	374	22
Metano	CH ₄	19	4,6
Etilene	C ₂ H ₄	9,1	5,1
Biossido di carbonio	CO ₂	31,4	7,4
Trifluorometano	CHF ₃	25,9	4,7
Propene	CH ₂ =CHCH ₃	36,5	4,6
Monossido di diazoto	N ₂ O	36,5	4,1
Esafluoruro di zolfo	SF ₆	45,5	3,8
Xenon	Xe	16,6	5,9
Ammoniaca	NH ₃	133	11,4

Tabella 3.2 Esempi di fluidi supercritici con relativa formula chimica, temperatura e pressione critica

3.2 ScCO₂ e drug loading

Negli ultimi anni, grazie a un considerevole numero di studi, si è verificato un crescente interesse nell'utilizzo di scCO₂ in campo farmaceutico e biomedico, inerentemente al *drug loading*.

L'uso di fluidi supercritici, come detto in precedenza, presenta considerevoli vantaggi sia nella sintesi di materiali nanoparticellari, con distribuzione omogenea dei pori, da usare come veicoli di farmaci, sia nel processo vero e proprio di incorporazione del farmaco nel supporto.

In questo paragrafo verrà approfondito quest'ultimo meccanismo.

La preparazione di matrici impregnate con un principio attivo (API) consiste nel solubilizzare la sostanza con l'aiuto di un fluido supercritico e successivamente di porla a contatto con la matrice stessa[51].

Essenzialmente il processo conta di tre fasi:

- Dissoluzione del farmaco in scCO₂
- Impregnazione del farmaco nella matrice porosa
- Depressurizzazione del sistema

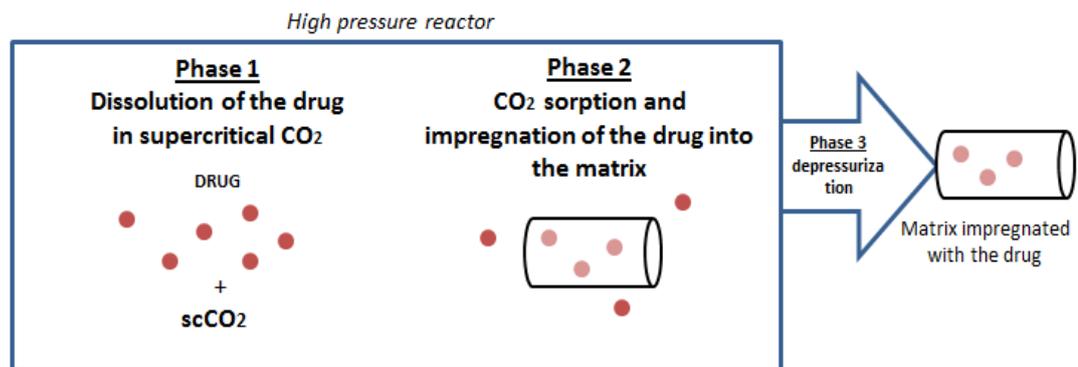


Figura 3.2 Rappresentazione schematica delle tre fasi del processo di impregnazione

Il vantaggio di usare scCO₂ per incorporare il farmaco risiede nel buon potere solvatante di questo solvente e nell'elevata diffusività. Tuttavia la buona efficienza di questo metodo è da ritenersi dovuta alla buona solubilità del farmaco nel fluido, all'interazione con il materiale ed infine all'affinità tra principio attivo e quest'ultimo.

La possibilità di incapsulare il farmaco permette di aumentare la biodisponibilità dello stesso in termini di velocità con cui entra in circolazione accedendo al sito di azione, soprattutto per quelli scarsamente solubili in soluzioni acquose.

L'impregnazione in scCO₂ è stata utilizzata per numerosi polimeri e principi attivi (farmaci, geni, proteine) sia per sistemi di riserva che per altre applicazioni biomedicali.

Inoltre l'efficienza del drug loading con biossido di carbonio risulta più elevata rispetto ai tradizionali metodi di incorporazione grazie alla maggiore solubilità che presentano i principi attivi in questo rispetto ai sistemi a base acquosa.

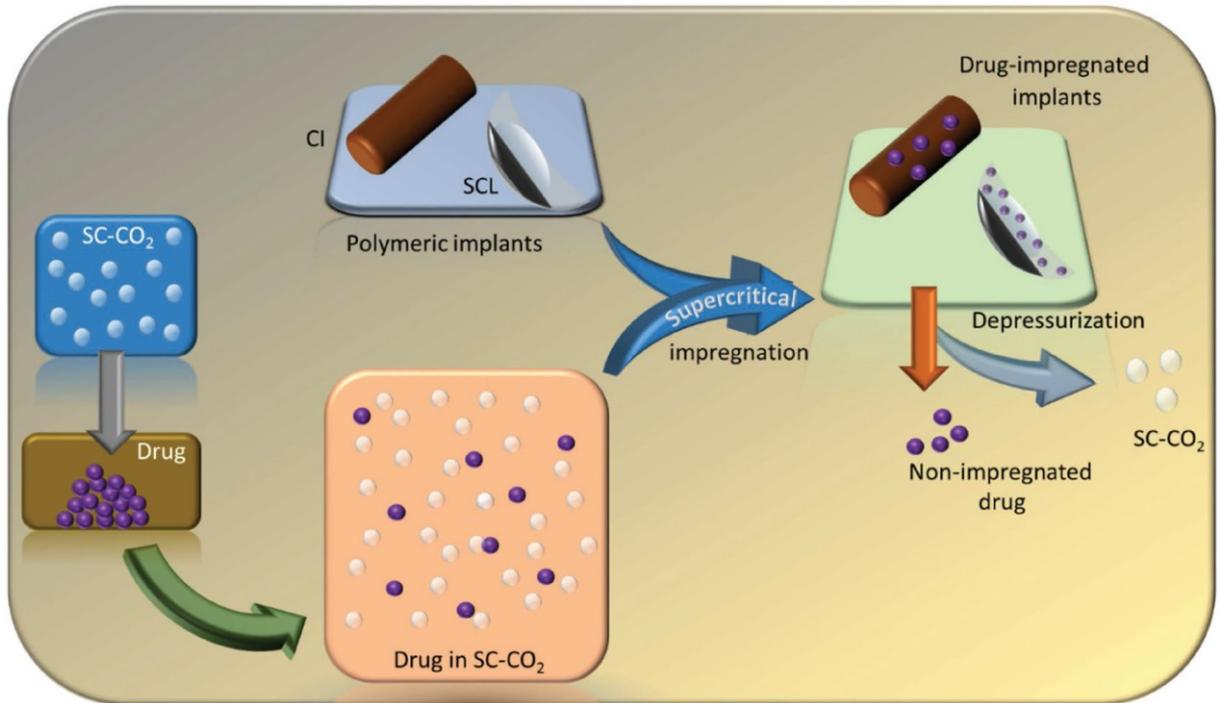


Figura 3.3 Rappresentazione grafica del meccanismo di impregnazione in $scCO_2$ [51]

Il processo di impregnazione supercritica viene eseguito nell'apparato mostrato in figura 3.4[52]:

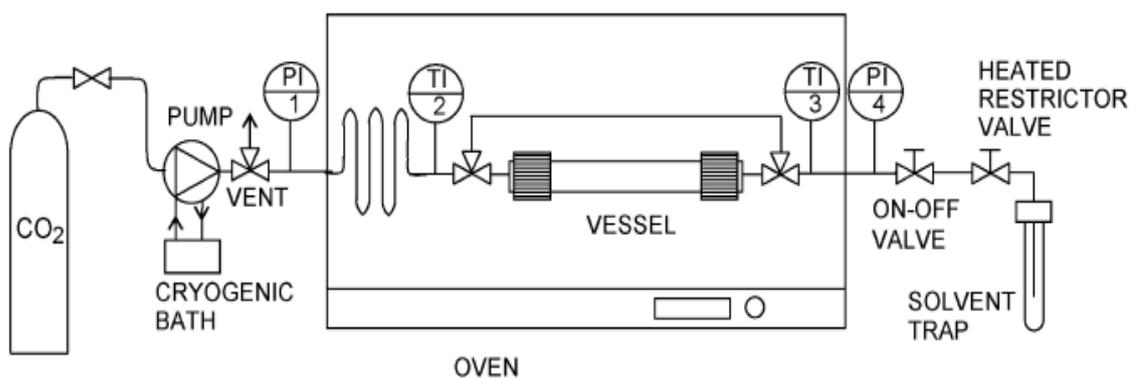


Figura 3.4 Schema del processo di impregnazione in $scCO_2$ [52]

È un apparato continuo che opera in modo statico per ottenere l'impregnazione del farmaco nel materiale. I cilindri, carichi dei due campioni, vengono inseriti in un tubo

cavo di acciaio (*vessel*), il quale viene posto all'interno di un forno, che ha la funzione di mantenere costante la temperatura all'interno del sistema.

Inizialmente, il *vessel* viene purificato con CO₂ gassosa, al fine di rimuovere l'aria residua. In seguito, viene azionata la modalità continua fino al raggiungimento delle condizioni di funzionamento selezionate. Il *vessel* viene poi riempito con il solvente supercritico e la valvola on-off viene chiusa. In questo modo il materiale e il farmaco vengono a contatto con il *medium* supercritico a temperatura e pressione costante.

Prove diverse, con tempi di contatto diversi (20-48h) hanno dimostrato il raggiungimento dell'equilibrio termodinamico del sistema. Alla fine della prova l'apparato è stato scaricato attraverso una valvola di regolazione riscaldata dotata di una trappola per il solvente.

Al termine dell'impregnazione, il materiale contenente il farmaco viene estratto dalla navicella in modo da poter essere analizzato, previa macinazione manuale in un mortaio.

Il grande vantaggio di utilizzare la CO₂ come fluido supercritico risiede nella possibilità di riottenerlo in forma gassosa semplicemente riportando il sistema in condizioni ambiente così da poter eliminare eventuali residui di solvente.

In conclusione si può affermare che, grazie alle sue svariate caratteristiche, scCO₂ rappresenta una valida alternativa ai comuni solventi organici nell'incorporazione di farmaci per diversi *carrier*.

Di seguito viene riportata una tabella riassuntiva con esempi di lavori di impregnazione di principi attivi con l'ausilio di questo solvente.

Tabella 3.3 Esempi di lavori che hanno utilizzato scCO₂ per incorporare il farmaco

Materiale	Farmaco	Temperatura di processo	Pressione di processo	Riferimenti
PVP	ketoprofene	T=50 °C	P=190 bar	[53]
PVP	piroxicam	T=100 °C	P=300 bar	[52]
PDMS+PVP	piroxicam	T=40 °C	P=130 bar	[54]
ZnO	clotrimazolo	T=100°C	P=250 bar	[29]
methyl- β -cyclodextrin	ketoprofene	T=40°C	P=200 bar	[55]
β -CDs	Ibuprofene	T=40°C	P=250 bar	[32]

3.3 $scCO_2$ e ibuprofene

La caratteristica fondamentale affinché un farmaco possa essere incorporato attraverso il processo in CO_2 supercritica è che sia solubile nel fluido supercritico.

Come precedentemente detto, l'ibuprofene è un farmaco appartenente alla classe degli anti-infiammatori non steroidei con caratteristiche analgesiche e antipiretiche, scarsamente solubile in soluzioni acquose; presenta due enantiomeri (S+ e R-) con attività infiammatoria diversa, ma in ambito farmacologico viene usata una miscela racemica.

L'impregnazione di farmaci in matrici polimeriche usando $scCO_2$ è stata ben studiata da diversi autori. Molte di queste ricerche hanno considerato l'ibuprofene come esempio di farmaco anti-infiammatorio non steroideo (NSAID).

Per verificare l'effettiva possibilità di usare fluidi supercritici con questo composto organico sono stati effettuati test sulla sua solubilità ad elevati valori di pressioni e temperatura; in questi lavori è stato dimostrato che l'ibuprofene è un farmaco altamente solubile in $scCO_2$ e la sua solubilità aumenta con l'aumentare della pressione[56][57].

Diversi lavori in letteratura riguardano la formazione di complessi di ibuprofene e ciclodestrine[58], oligosaccaridi ciclici in grado di formare complessi di inclusione con molti farmaci. La complessazione è uno dei mezzi più utili per migliorare la dissoluzione di farmaci scarsamente solubili in acqua in formulazioni per via endovenosa e orale.

Nel 2006 Hussein et al.[59], hanno investigato sulla possibilità di creare un complesso ibuprofene/ β -ciclodestrine attraverso un processo in CO_2 supercritica; l'esperimento è stato effettuato a una temperatura di $39,7^\circ C$ e pressione di 247 bar con percentuali equimolari di farmaco e *carrier*. L'impregnazione è stata ottenuta attraverso il trasporto dell'ibuprofene in CO_2 e precipitazione nei pori del carrier attraverso repentina depressurizzazione.

L'uso di polimeri come carriers presenta vantaggi inerenti alla semplicità, basso costo e flessibilità. In vari articoli, è stato usato il polimetilmetacrilato (PMMA), un polimero biocompatibile usato per applicazioni in cui il meccanismo di rilascio è controllato dalla diffusione. Nell'articolo di Hussain [60] sono stati effettuate diverse prove con diversi valori di temperatura e pressione dimostrando come con l'aumentare della temperatura si ottenga una maggiore velocità di impregnazione.

In un altro articolo è stato sintetizzato un materiale composito di polimetilmetacrilato e acido polilattico (PMMA-PLA) in cui è stato incorporato l'ibuprofene. Il processo in $scCO_2$ prevedeva una temperatura di $60^\circ C$ e una pressione di 200 bar con un rilascio finale del 50% [61].

Altri esempi di lavori di impregnazione dell'ibuprofene sono riportati in tabella 3.4.

Tabella 3.4 Esempi di lavori che hanno utilizzato scCO₂ per incorporare l'ibuprofene

Materiali	Temperatura di processo (°C)	Pressione di processo (bar)	Riferimenti
Silice SBA-15	T= 37°C	P=170 bar	[62]
PVP	T= 40°C	P=100 bar	[63]
MISCELA PEG-PVP	T= 40-60°C	P=120-220 bar	[64]
β -CDs	T=40°C	P=250 bar	[32]

4. Tecniche di caratterizzazione

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

4.1 Diffrazione a raggi X

L'analisi diffrattometrica viene comunemente usata per caratterizzare i materiali poiché fornisce informazioni sulla struttura cristallina del solido.

È un'analisi qualitativa non distruttiva che è stata utilizzata per caratterizzare il materiale di sintesi verificandone la struttura cristallina e il materiale impregnato al fine di valutare l'effettiva presenza del farmaco amorfo.

Il campione da analizzare deve essere ridotto in polvere e deve essere planare affinché possa valere la legge di Bragg:

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

Il diffrattometro è costituito da una camera di diffrazione al centro della quale è situato il porta campione (in questo caso è stato utilizzato un porta campione normale) nel quale deve essere inserita la polvere da analizzare; la sorgente di raggi X e il rivelatore sono posti ai lati della camera su bracci mobili che si muovono in modo sincronizzato.

Nel caso di questo lavoro sono state usate delle slitte di ampiezza di $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$; queste slitte sono delle lamelle molto sottili che permettono di convergere il fascio diretto e quindi di ridurre i fenomeni di aberrazione che rendono il segnale spurio.

Attraverso un software collegato è possibile creare un diffrattogramma il quale mette in relazione l'angolo del rivelatore (2θ) in funzione dell'intensità del segnale, ovvero dei fotoni che arrivano al rivelatore.

Lo strumento utilizzato è un diffrattometro Philips3040 che utilizza un anodo in Cu per la generazione di raggi X.

4.2 Analisi di adsorbimento di azoto

L'analisi di fisisorbimento a 77K è una tecnica che permette la caratterizzazione di materiali porosi definendone:

- L'area superficiale specifica
- Il volume dei pori
- La dimensione e distribuzione dei pori

Nella pratica sperimentale l'analisi viene effettuata eseguendo un iniziale degasaggio in cui circa 100 mg di campione, in una buretta di vetro, vengono inseriti in un fornello a una temperatura ben definita ($T=150^{\circ}\text{C}$ per il materiale di sintesi e $T=60^{\circ}\text{C}$ per il materiale con il farmaco incorporato) allo scopo di eliminare eventuale acqua adsorbita in superficie. La seconda parte dell'analisi consiste nella vera e propria misura in cui la buretta contenente il campione degasato viene posta in un bagno di azoto liquido e viene inviato azoto gassoso da far adsorbire in superficie.

A fine misura si ottengono diversi punti che permettono di costruire l'isoterma di adsorbimento che mette in relazione il volume adsorbito in funzione della pressione parziale.

Di seguito vengono riportati gli andamenti tipici delle isoterme di adsorbimento che permetteranno un confronto con quelle ricavate dall'analisi di caratterizzazione dei materiali di questa tesi.

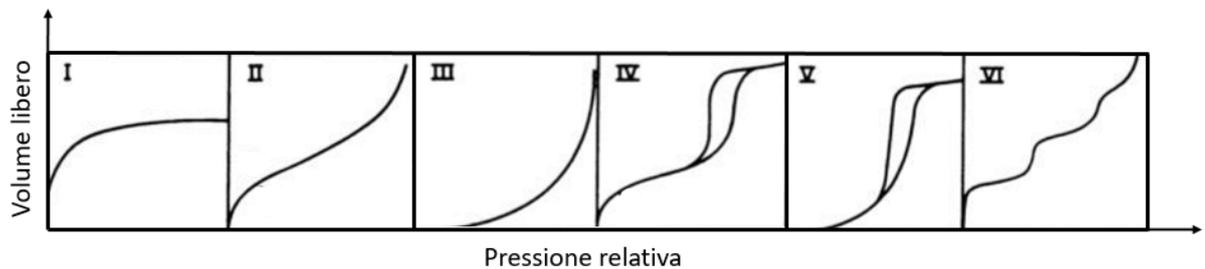


Figura 4.1 Isotherme di adsorbimento secondo la classificazione IUPAC

Lo strumento utilizzato in questa tesi è un Quantachrome Autosorb 1.

4.3 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Questa tecnica di caratterizzazione è un'analisi non distruttiva che permette di identificare i gruppi funzionali presenti nel campione attraverso vibrazioni di legame.

Gli spettri vengono prodotti attraverso un'operazione matematica e forniscono informazioni sia qualitative ovvero le lunghezze d'onda assorbite dal campione caratteristiche dei gruppi chimici presenti sia quantitative dovute all'intensità del picco di assorbimento.

In questo lavoro è stato necessario preparare una pastiglia di materiale disperso in KBr; una prima misura è stata effettuata tal quale, mentre la seconda è stata fatta in seguito a un trattamento termico in vuoto (10^{-3} mbar) per circa un'ora.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un Bruker Equinox 55. Gli spettri sono stati registrati con una risoluzione di 2 cm^{-1} .

4.4 Microscopia elettronica a scansione

È una tecnica analitica che permette di caratterizzare un materiale identificandone la morfologia, visualizzando dettagli della struttura fino a 1 nm.

In questo elaborato è stata utilizzata per individuare la struttura superficiale molecolare dei campioni sintetizzati, con ingrandimenti da 5.00 K X fino a 250.00 K X che hanno permesso di osservare particelle dell'ordine di 100 nm.

4.5 Spettroscopia ultravioletto-visibile

Le analisi effettuate con lo spettrofotometro UV-vis sono state:

- Quantificazione del farmaco incorporato
- Quantificazione del farmaco rilasciato dai materiali impregnati

Ogni analisi è stata effettuata con cuvettes in quarzo con capacità di 2 ml.

Prima di quantificare il farmaco è stata costruita una retta di taratura interpolando da tre a sei punti, al fine di mettere in relazione l'assorbanza con la concentrazione.

In figura 4.2 sono riportati gli spettri della retta di taratura dell'ibuprofene in etanolo puro. In questo caso è stata utilizzata una lunghezza d'onda $\lambda=263$ nm

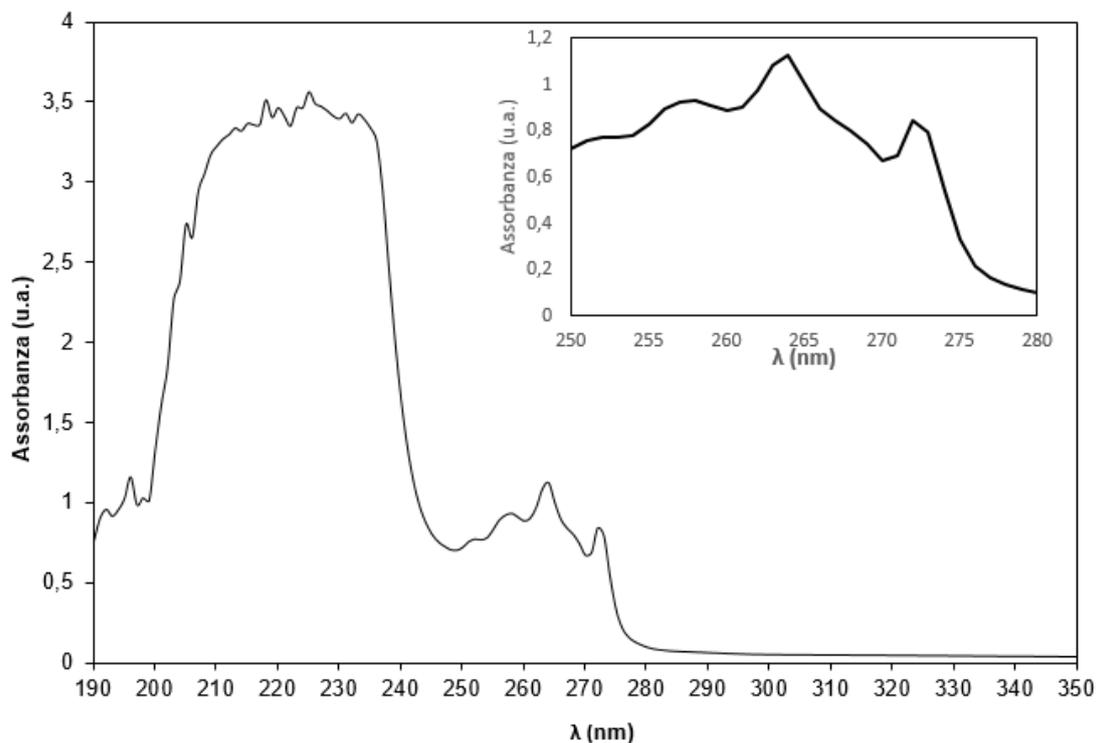


Figura 4.2 Spettri della retta di taratura dell'ibuprofene in etanolo puro

4.6 Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA) è un'analisi termica di tipo quantitativo in cui si misura la perdita di peso di un campione in funzione della temperatura, attraverso un riscaldamento controllato.

Il campione si inserisce all'interno di un crogiolo collegato ad una bilancia sensibile e il tutto viene posto all'interno di un forno.

In questo elaborato l'analisi termica è stata eseguita in aria mediante un iniziale riscaldamento da una temperatura di 17°C fino a 25°C, seguita da una piccola isoterma di temperatura a 25°C ed infine un riscaldamento più spinto che ha portato la temperatura da 25°C fino a 800°C con una rampa di 10°C/min.

Nella figura 4.3 si vede un tipico andamento di questa analisi.

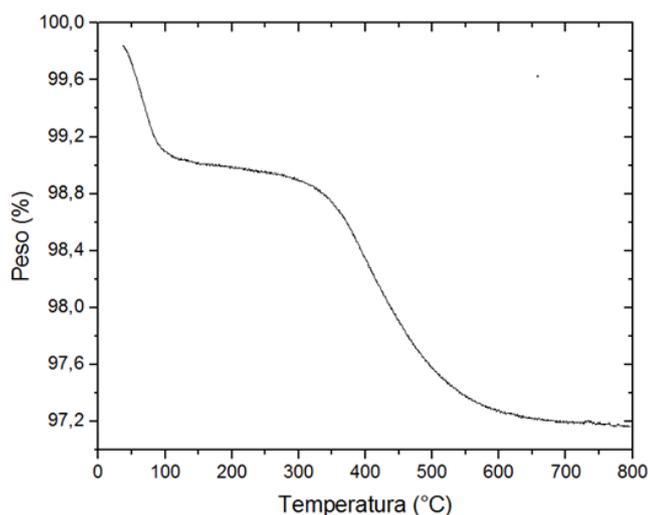


Tabella 4.3 Tipico andamento di una TGA

Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è una TGA 92.16-18 SETARAM.

5. Sintesi e caratterizzazione dei supporti

Nel capitolo seguente verranno presentate le sintesi utilizzate per ottenere l'ossido di zinco nanostrutturato e le relative caratterizzazioni.

5.1 *NsZnO-1*

5.1.1 Sintesi

Il campione *NsZnO-1* è stato sintetizzato utilizzando, come reagenti iniziali, cloruro di zinco e urea.

Facendo riferimento all'articolo di Kakiuchi et al.[38] 0,7g di cloruro di zinco e 6g di urea sono stati sciolti in 94 ml di acqua bidistillata in modo da ottenere una concentrazione di Zn^{2+} e di urea rispettivamente di 0,5M e 1M; la soluzione acquosa ottenuta, con $pH \approx 6-7$, viene acidificata con poche gocce di acido cloridrico 0,1 M al fine di ottenere un valore di pH pari a circa 4. Si ottiene così una soluzione completamente trasparente e priva di qualsiasi precipitato. Successivamente la soluzione viene mantenuta sotto agitazione con stirrer magnetico a 500 rpm, per 24 ore a una temperatura costante di 80°C mediante tecnica di riflusso con conseguente precipitazione di un composto di colore bianco, depositato in particolare modo sulle pareti. Si è quindi filtrato il precipitato, lavandolo con acqua distillata e successivamente si è proceduto a un essiccamento in stufa per 1 giorno a 47°C. Infine il precipitato è stato trattato termicamente attraverso calcinazione in muffola per 30 minuti, alla temperatura di 300°C al fine di trasformarlo in ossido di zinco. Si è ottenuta in questo modo una polvere di colore bianco



Figura 5.1 Immagine di *NsZnO-1* che mostra il caratteristico colore bianco

5.1.2 Caratterizzazione

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

Microscopia elettronica a scansione

Il campione è stato caratterizzato anche dal punto di vista morfologico mediante microscopia elettronica a scansione. L'immagine riportata in basso evidenzia la morfologia del materiale NsZnO-1 a due diversi ingrandimenti (5.00 K X e 100.00 K X) evidenziando la presenza di forme lamellari costituite da aggregati di particelle ovoidali di circa 40 nm.

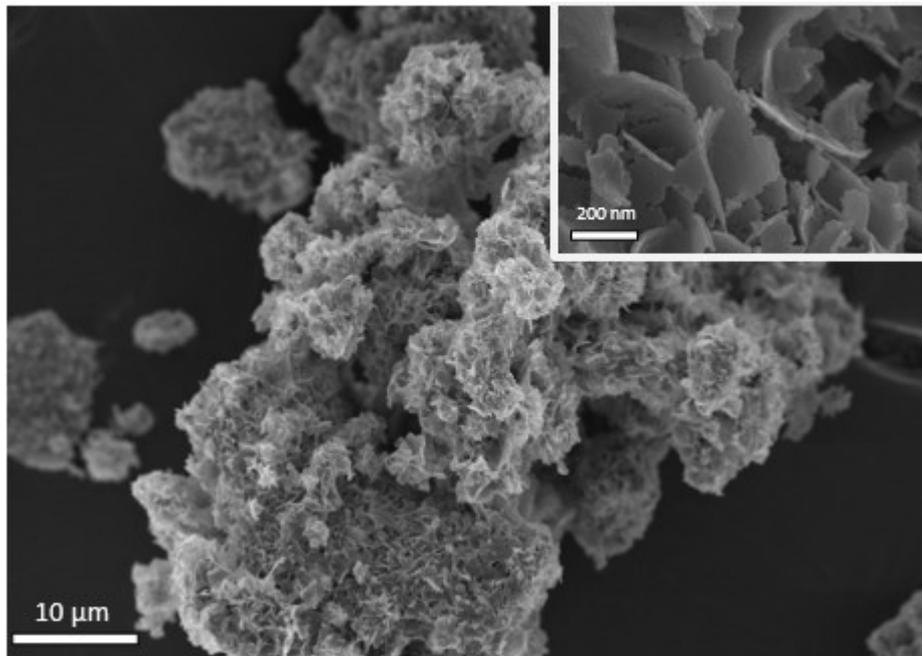


Figura 5.2 Immagini SEM del campione NsZnO-1

Diffrazione a raggi X

Lo spettro XRD del campione NsZnO-1 è riportata nella figura sotto.

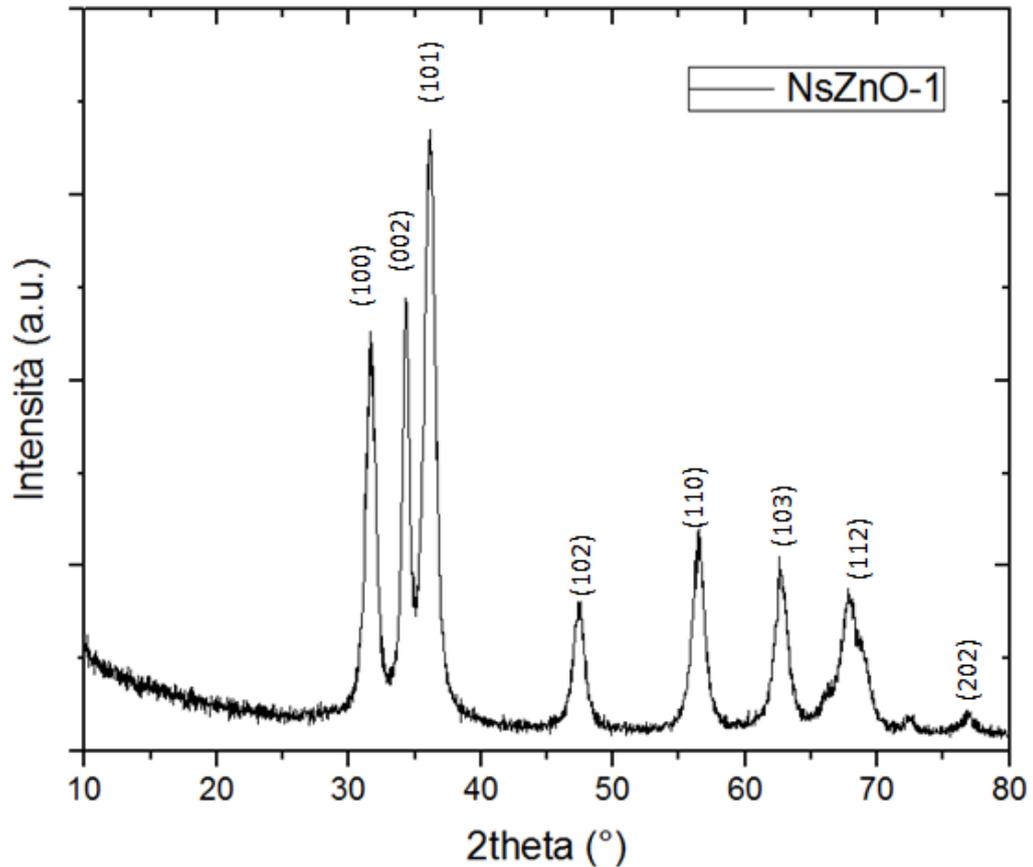


Figura 5.3 Spettro XRD del campione NsZnO-1

Come evidente, il *pattern* di diffrazione conferma la struttura cristallina esagonale wurtzite dell'ossido di zinco, evidenziata in diversi lavori, come ad esempio nell'articolo di Mitra et al.[26]; in particolare nell'intervallo $2\theta=10-80^\circ$ si possono notare sette picchi principali ai seguenti angoli: $31,7^\circ$, $34,3^\circ$, $36,2^\circ$, $47,5^\circ$, $56,4^\circ$, $62,6^\circ$, $67,8^\circ$ a cui corrispondono i piani (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112).

Non sono presenti picchi dovuti ad impurità, indice della sintesi di un ossido di zinco relativamente di alta qualità e purezza.

Analisi di adsorbimento di azoto

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

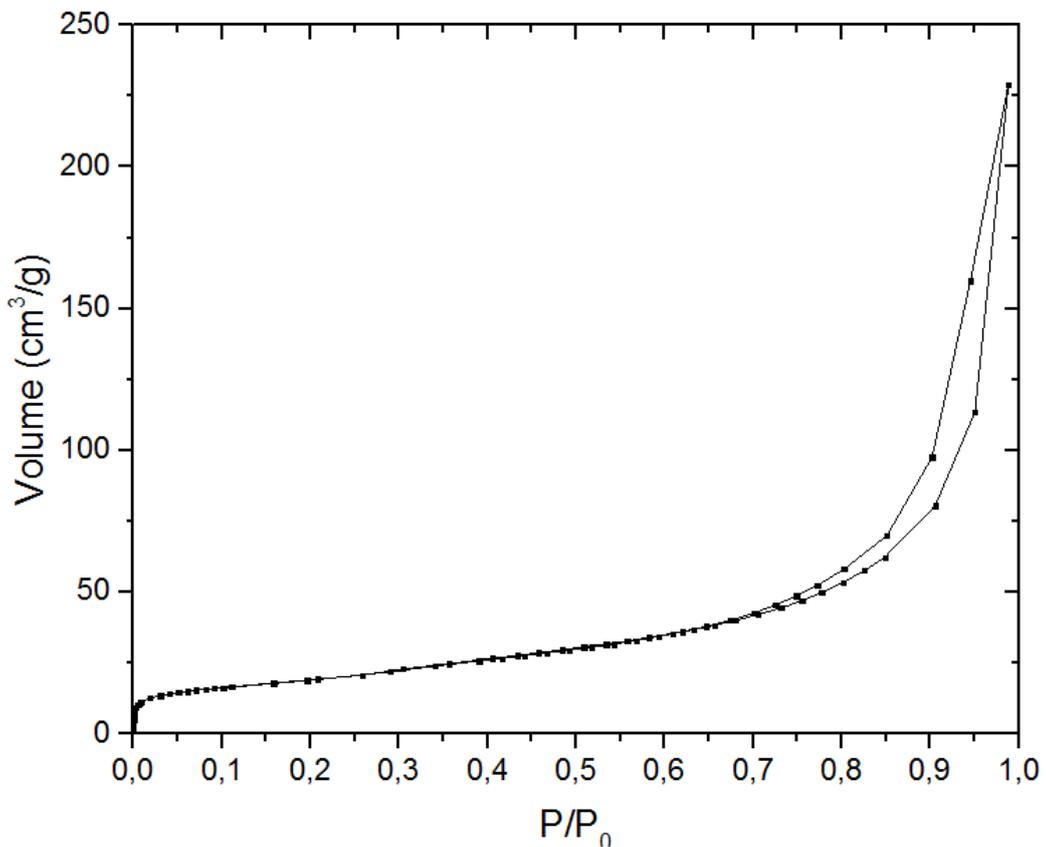


Figura 5.4 Isoterma di adsorbimento del campione NsZnO-1

L'isoterma di adsorbimento ottenuta corrisponde a un'isoterma di "tipo II" con cappio d'isteresi a partire dal rapporto P/P_0 di circa 0,7 dovuta a condensazione capillare nel volume interparticellare

Valutando le informazioni ottenute dall'analisi è stato possibile ricavare l'area superficiale specifica del campione e il volume dei pori, i cui valori vengono riportati in tabella 5.1.

Tabella 5.1 Dati ottenuti dall'analisi di fisisorbimento per il campione NsZnO-1

Campione	Area superficiale specifica	Volume dei pori
NsZnO-1	68 m ² /g	0,234 cc/g

L'area superficiale specifica del campione ricavata è coerente con l'articolo di riferimento[65].

Non viene invece riportata la distribuzione dei pori del campione a causa dell'elevata eterogeneità nella dimensione degli stessi.

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 5.4.

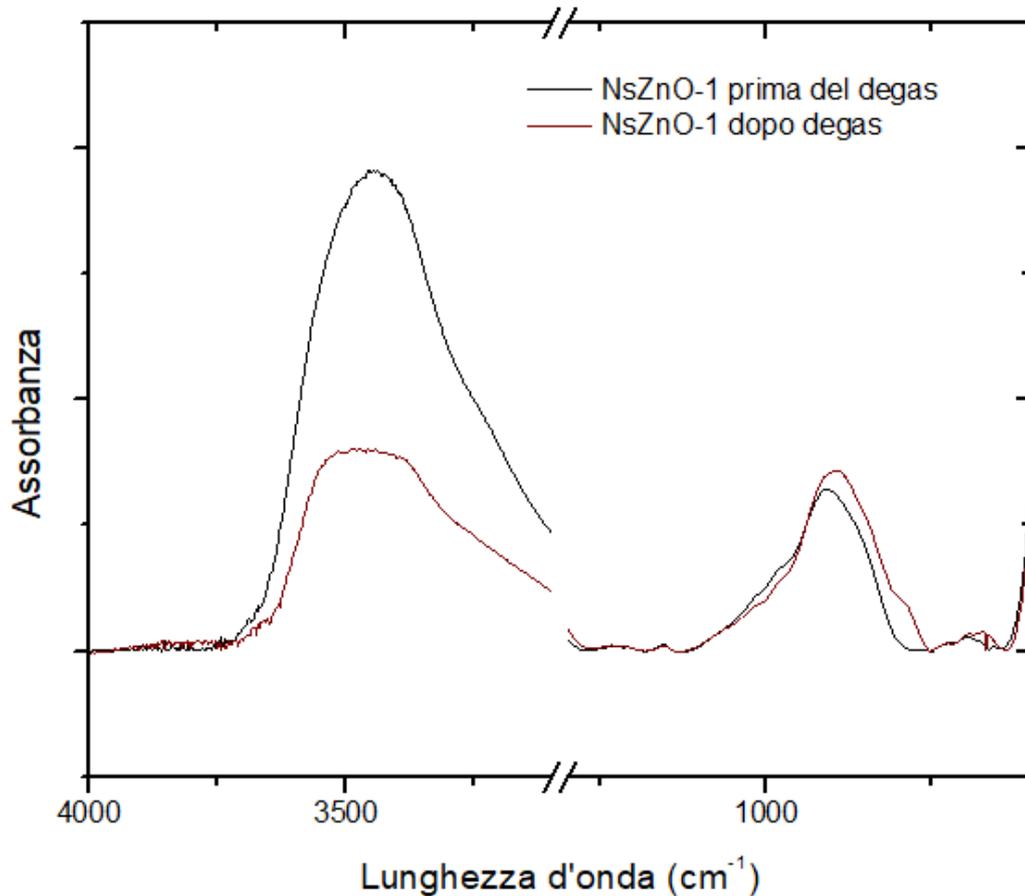


Figura 5.5 Spettro IR del campione NsZnO-1

Lo spettro mostra una banda allargata di assorbimento nella zona compresa tra 3600 e 3200 cm^{-1} dovuta ai gruppi ossidrilici e alle molecole d'acqua adsorbite sulla superficie; infatti si nota che dopo il degasamento, il picco relativo alla presenza di questi gruppi si riduce notevolmente.

La presenza del legame Zn-OH è presente nell'intervallo di assorbimento compreso tra 900 e 880 cm^{-1} in accordo con l'articolo di riferimento.

Analisi termogravimetrica

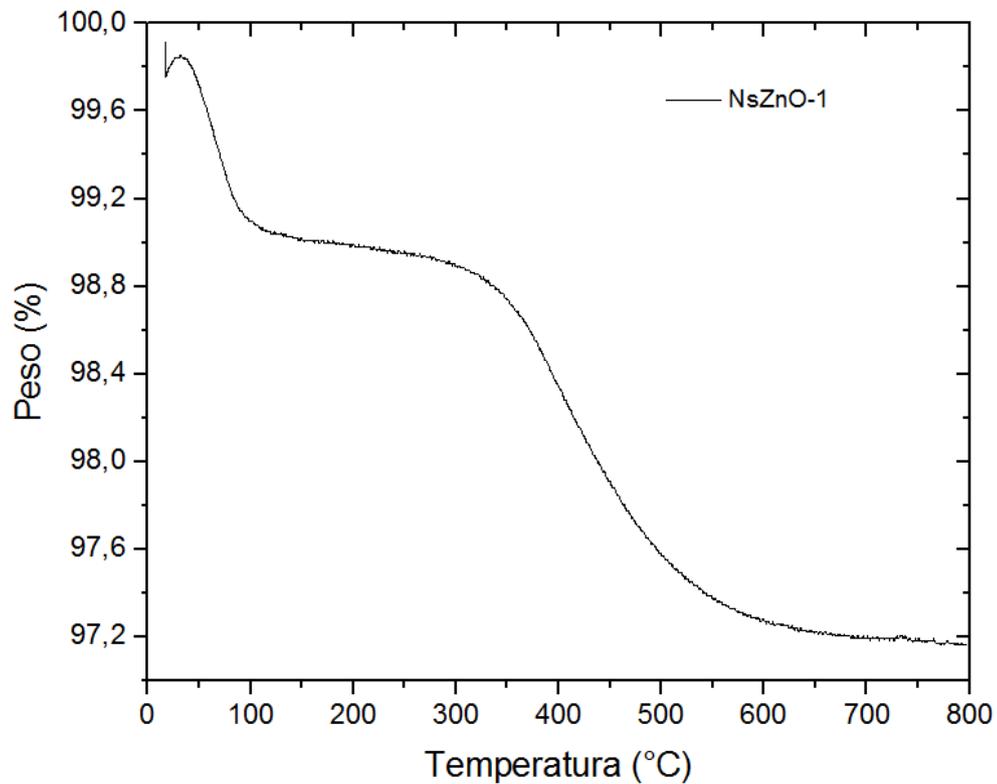


Figura 5.6 Curva termogravimetrica del campione NsZnO-1

Come si vede dalla figura 5.6, il materiale subisce una prima perdita di peso di circa l'1% tra 20 e 100°C dovuta principalmente al rilascio di acqua residua presente nel campione. Un secondo step di perdita di peso, di neanche il 2%, si registra a temperature più alte, nel range 300-600 °C, associabile alla decomposizione di ioni carbonati. Dopo 600°C l'andamento è pressoché lineare.

5.2 *NsZnO-2*

5.2.1 Sintesi

Il campione *NsZnO-2* è stato sintetizzato sulla base dell'articolo di Ueno [66], dove vengono utilizzati come reagenti iniziali il Pluronic F127 e l'acetato di zinco.

Inizialmente, 10g di Pluronic F127 sono stati pesati ed aggiunti a 90ml di acqua bidistillata sotto agitazione magnetica a bassi giri al minuto per evitare la formazione di eccessiva schiuma. Ottenuta la dissoluzione del template, sono stati aggiunti 12,8 g di acetato di zinco diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), lasciando il campione in agitazione per ulteriori 2 ore a una temperatura di circa 35°C. Dopo aver ottenuto una sospensione omogenea, si procede con l'essiccamento del solvente inducendo il vuoto con l'utilizzo di una pompa.

Infine si è effettuato un trattamento termico di calcinazione a 500° in forno statico per 2h45min con una rampa di 3°C/min.

Seguendo questo metodo di sintesi sono stati sintetizzati diversi campioni, variando la procedura di essiccamento del solvente per investigare una possibile variazione nei valori di area specifica superficiale. In particolare l'evaporazione in vuoto è stata sostituita con essiccamento in stufa ed essiccamento diretto in forno statico.

I nomi dei campioni relativamente al tipo di trattamento eseguito sono di seguito riportati:

- *NsZnO-2* VUOTO
- *NsZnO-2* STUFA
- *NsZnO-2* MUFFOLA

Tutti i campioni ottenuti presentano un colore grigio come mostrato in figura 5.7.



Figura 5.7 Immagine di *NsZnO-2* che mostra il caratteristico colore grigio

5.2.2 Caratterizzazione

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

Microscopia elettronica a scansione

Nelle figure 5.8, 5.9 e 5.10 vengono riportate le morfologie dei campioni NsZnO-2

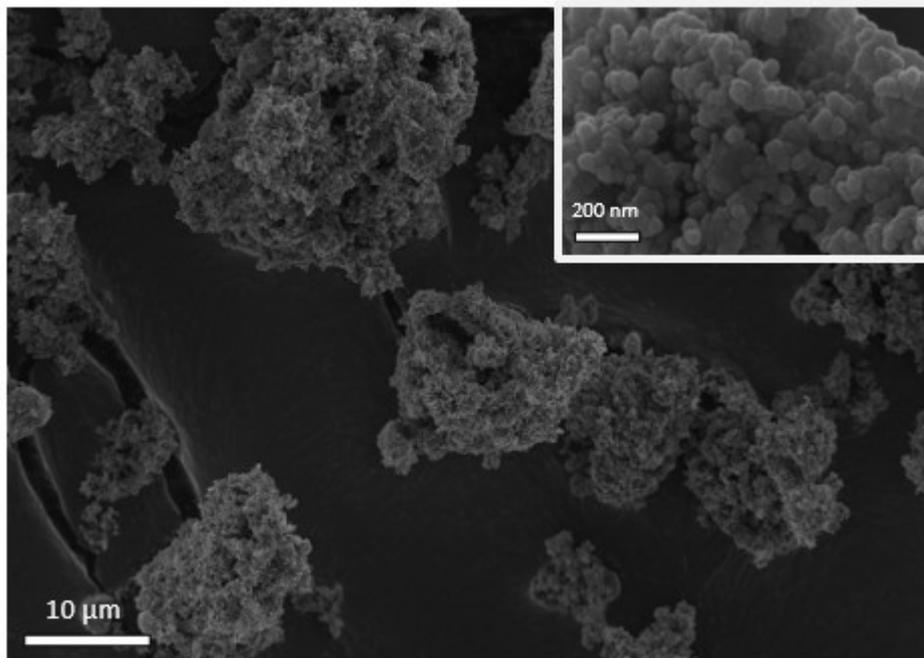


Figura 5.8 Immagine SEM del materiale NsZnO-2 VUOTO

L'immagine riportata a due diversi ingrandimenti (5.00 K X e 100.00 K X) evidenzia la presenza di aggregati micrometrici di forma sferica con dimensioni eterogenee di circa 40-80 nm. La morfologia ottenuta è in accordo con l'articolo di riferimento.

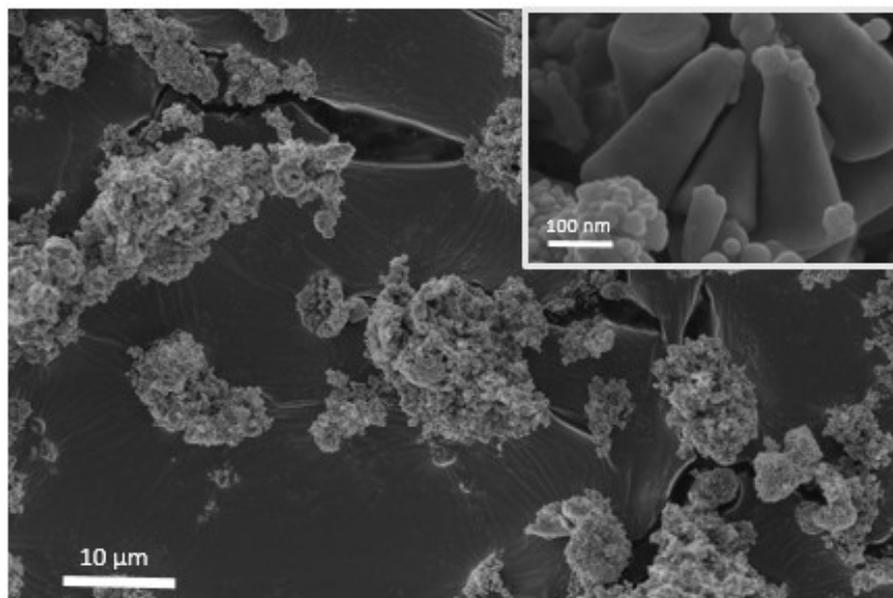


Figura 5.9 Immagine SEM del materiale NsZnO-2 STUFA

La morfologia del campione è visibile a diversi ingrandimenti. Il materiale, da una prima analisi appare simile a quello sintetizzato con trattamento in vuoto; solo grazie a un maggiore ingrandimento si nota la presenza di particelle di forma in gran parte conica e acuminata, decisamente meno accettabili per applicazioni topiche.

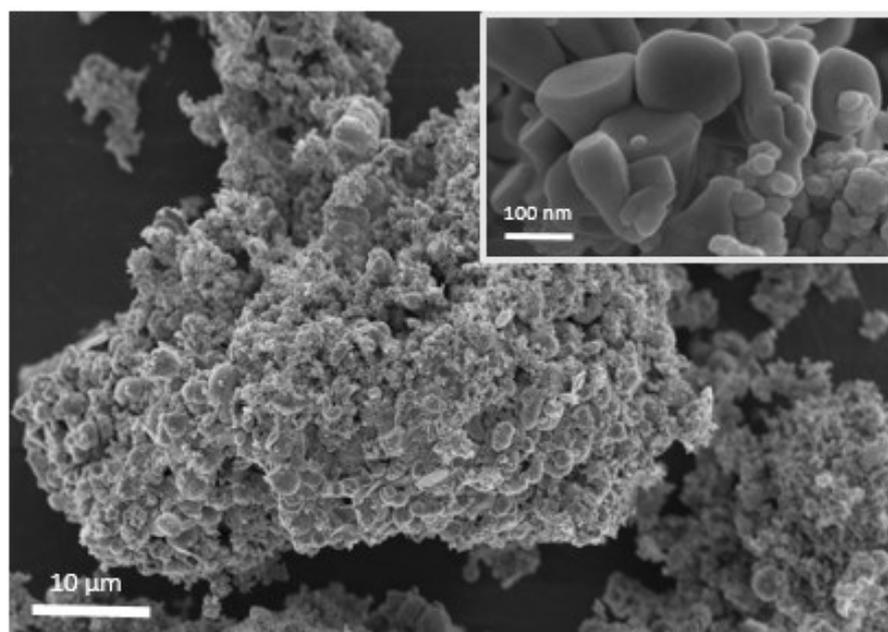


Figura 5.10 Immagine SEM del materiale NsZnO-2 MUFFOLA

Anche questo campione è formato da aggregati particellari di forma conica.

Diffrazione a raggi X

Vengono riportati, nella figura sotto, gli spettri XRD del campione NsZnO-2, ottenuti con le tre diverse tecniche di essiccamento, in modo da permetterne il confronto.

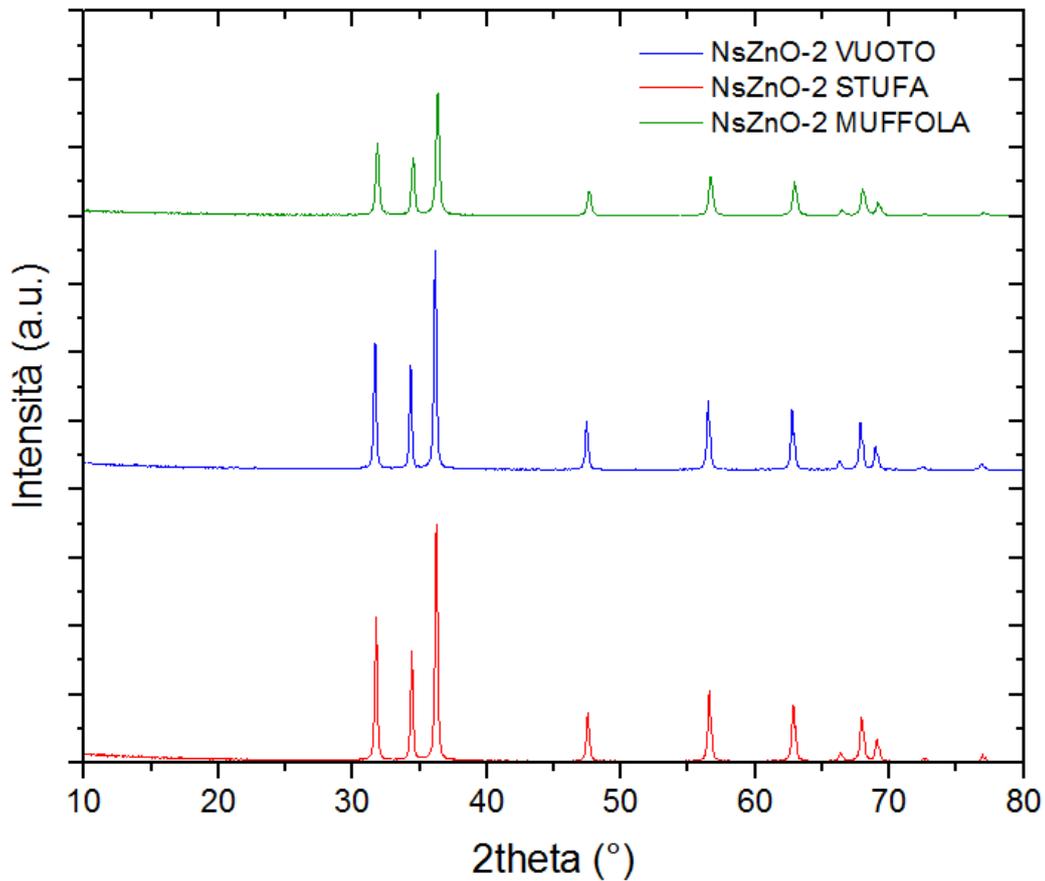


Figura 5.11 Spettri XRD dei campioni NsZnO-2

In tutti e tre i campioni si riscontra la struttura cristallina esagonale, tipo wurtzite, dell'ossido di zinco. Le intensità dei picchi sono paragonabili tra loro, ad eccezione del campione NsZnO-2 MUFFOLA che presenta valori di intensità relativamente più bassi rispetto agli altri due campioni.

Confrontando i picchi del campione NsZnO-2 con quelli del campione NsZnO-1, visto precedentemente, si nota che quest'ultimo mostra picchi più larghi. Questo è indice di una maggiore dimensione delle particelle per il campione NsZnO-2 rispetto a NsZnO-1.

In entrambi i casi, tuttavia, non vengono rilevati i picchi dei precursori indice del fatto che si possa ottenere ossido di zinco puro a partire dai metodi sopra descritti.

Analisi di adsorbimento di azoto

Nella figura sottostante viene riportata l'isoterma di adsorbimento di azoto a 77K. Anche in questo caso viene fatto un confronto fra i vari NsZnO-2 ottenuti, attraverso le informazioni fornite dall'analisi BET come l'area superficiale specifica di ogni singolo campione e il volume dei pori, i cui valori vengono riportati in tabella sottostante.

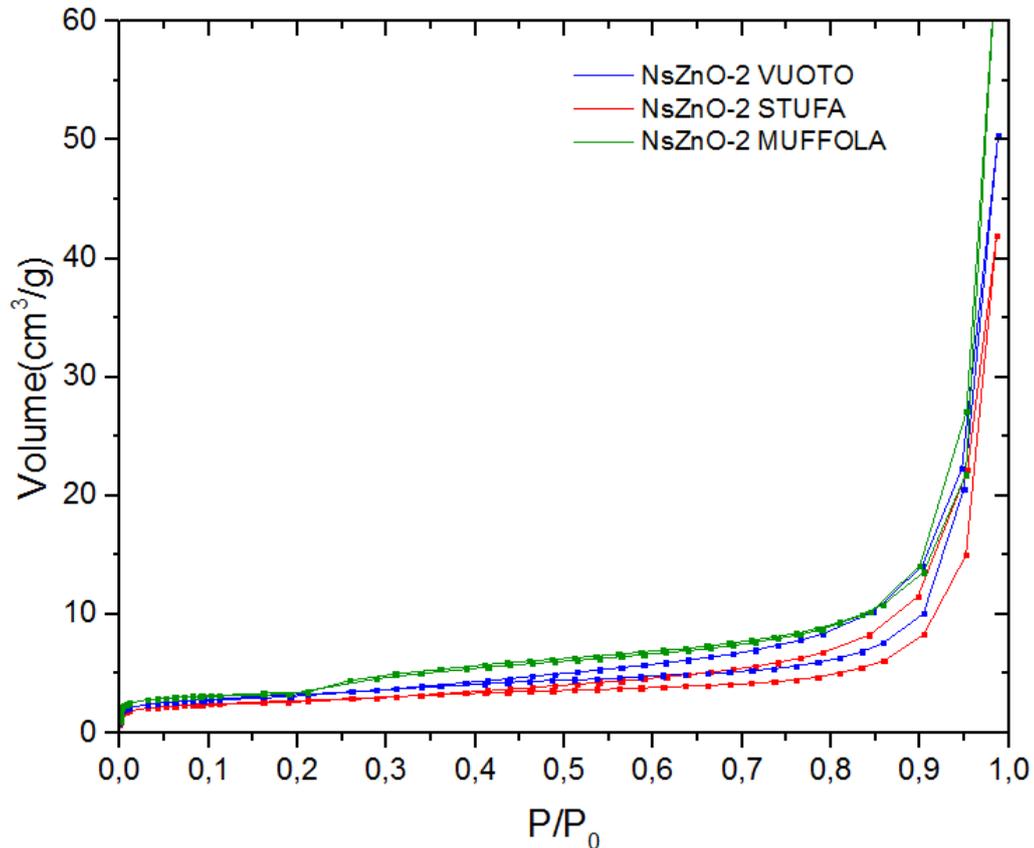


Figura 5.12 Isotherme di adsorbimento dei campioni NsZnO-2; in blu NsZno-2 VUOTO, in rosso NsZnO-2 STUFA e in verde NsZnO-2 MUFFOLA

Tabella 5.2 Dati ottenuti dall'analisi di fisisorbimento per i campioni NsZnO-2

Campione	Area superficiale specifica	Volume dei pori
NsZnO-2 (VUOTO)	11,6 m ² /g	0,0326 cc/g
NsZnO-2 (STUFA)	9,8 m ² /g	0,0323 cc/g
NsZnO-2 (MUFFOLA)	12,2 m ² /g	0,096 cc/g

Dal grafico in figura 5.9 sopra riportato si evince che le isoterme di adsorbimento sono di tipo II, secondo la classificazione IUPAC. Le aree superficiali dei campioni sono tra loro

simili e presentano valori compresi in un range di 10-12 m²/g; il volume dei pori è anch'esso paragonabile, in particolare modo per i primi due campioni che presentano praticamente lo stesso valore.

Il campione NsZnO-1, descritto precedentemente, presenta dei valori decisamente più elevati in accordo con la minore dimensione delle particelle come evidenziato dalle analisi XRD e FESEM.

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

Il campione è stato sottoposto ad analisi spettroscopica infrarossa (FT-IR) di cui si riporta lo spettro in un intervallo di 1000-3600 cm⁻¹.

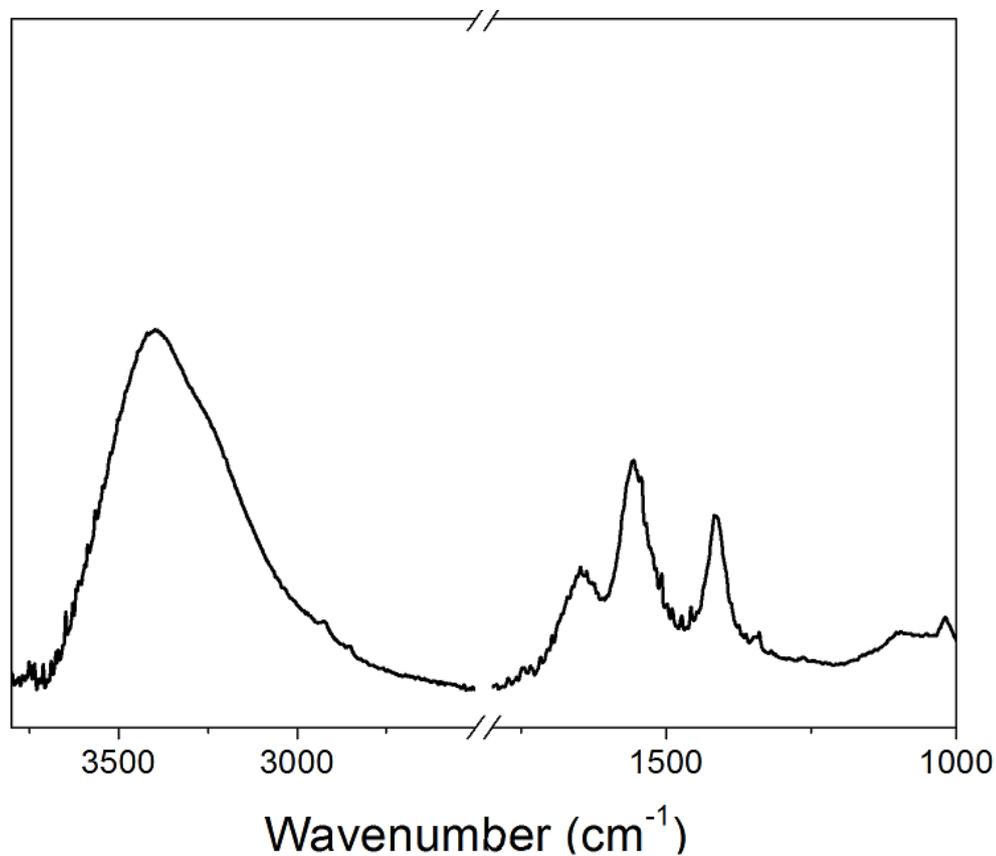


Figura 5.13 Spettro IR del campione NsZnO-2 VUOTO

Lo spettro IR, in figura 5.9, può essere diviso in due zone: la prima da 3600 a 2500 cm⁻¹ e la seconda da 2000 a 1000 cm⁻¹.

La banda osservabile nel range 3380–3600 cm⁻¹ è attribuibile alle vibrazioni di stretching dovuti a gruppi ossidrilici superficiali e molecole di acqua adsorbite mentre i picchi a circa 1400 e 1600 cm⁻¹ sono correlabili a vibrazioni di stretching di specie carbonato superficiali formate dal chemiadsorbimento di CO₂ nella superficie dell'ossido di zinco.

Siccome il campione NsZnO-2- VUOTO, quello ottenuto con la sintesi originale, è l'unico che presenta una morfologia sferica, ideale per le applicazioni topiche in quanto non danneggia le cellule tissutali, da questo momento fino alla fine della tesi verrà considerato solamente questo, con il nome generico NsZnO-2.

Analisi termogravimetrica

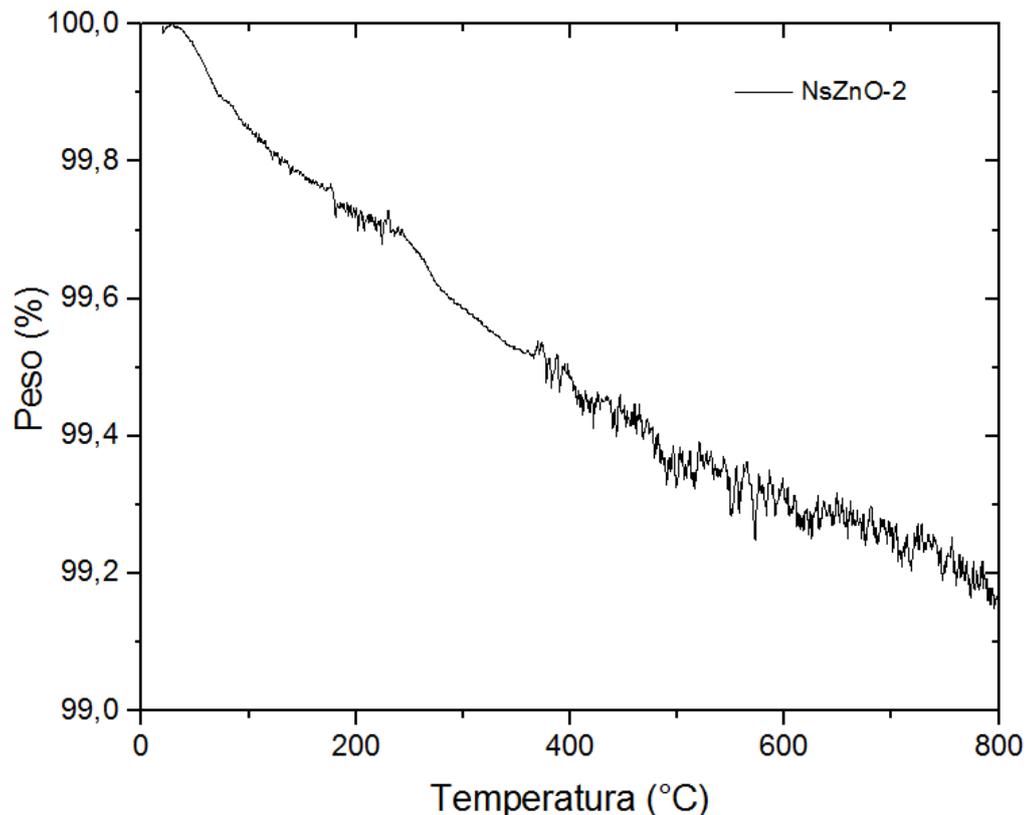


Figura 5.14 Curva TGA del campione NsZnO-2 VUOTO

Il campione NsZnO-2 in seguito a trattamento termico in aria non perde un grande quantitativo di peso. Si può notare che questa perdita avviene in due steps; il primo si trova nel range di temperatura di 20-200°C che rappresenta la deidratazione dell'acqua adsorbita in superficie e corrisponde a una perdita di peso relativamente molto piccola (circa 0,02-0,03%). Il secondo step, nel range 250-600°C, porta a una maggiore perdita di peso, comunque molto piccola, relativa alla perdita di gruppi OH e carbonati. L'andamento complessivo in figura conferma il carattere semiconduttore di questo materiale, come si può notare dai segnali elettrici che si sono venuti a creare.

5.3 Rilascio di ioni Zn^{2+}

La valutazione dell'assorbimento percutaneo delle molecole è molto importante nella valutazione di qualsiasi sistema di somministrazione di farmaci in applicazioni topiche.

Il meccanismo con cui le molecole vengono rilasciate si basa sul principio fisico della diffusione e della permeazione; proprio per questo vengono utilizzate delle celle a diffusione, che possono essere di natura statica o dinamica.

In questo lavoro di tesi, per effettuare il rilascio degli ioni Zn^{2+} sulla pelle, è stata utilizzata la cella di Franz.

Una rappresentazione di questa cella è riportata nella figura sottostante.

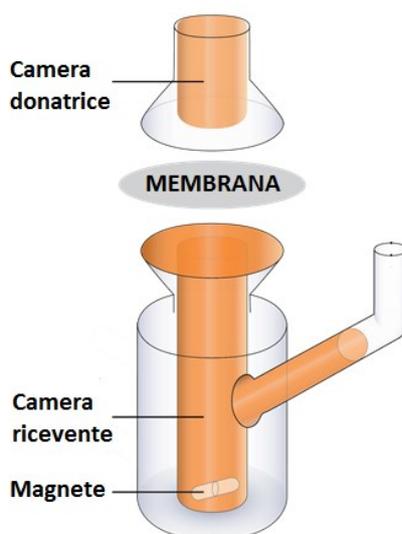


Figura 5.15 Rappresentazione grafica di una cella di Franz

Come si vede, la cella è divisa in due compartimenti, uno definito donatore e uno ricevente; tra il corpo e la testa della cella viene posta la pelle sintetica.

La soluzione ricevente è stata preparata sciogliendo una pastiglia di Phosphate Buffered Saline (PBS) in 200 ml di acqua distillata mentre la soluzione donatrice è stata preparata unendo 0,005 g di materiale a 0,5 ml di PBS, poi sottoposta a sonicazione per rendere la sospensione omogenea.

La soluzione ricevente è stata posta, successivamente, nel corpo della cella attraverso un ingresso laterale facendo però attenzione a non creare bolle al di sotto della membrana; quella donatrice invece è stata messa nel compartimento donatore, fungente da tappo, e chiusa attraverso del parafilm.

L'intera cella è stata poi adagiata all'interno di un bagno d'acqua sullo stirrer a una temperatura di 33°C.

L'esperimento è stato eseguito per 48 h; nello specifico, il primo giorno, ogni ora, per la durata complessiva di 8 ore, si è prelevata la soluzione ricevente poi sostituita con un'altra soluzione "fresca".

I restanti due prelievi sono stati fatti dopo 24 ore e dopo 48 ore.

L'andamento del rilascio di ioni è mostrato, per ciascun materiale, nella figura 5.15 in basso.

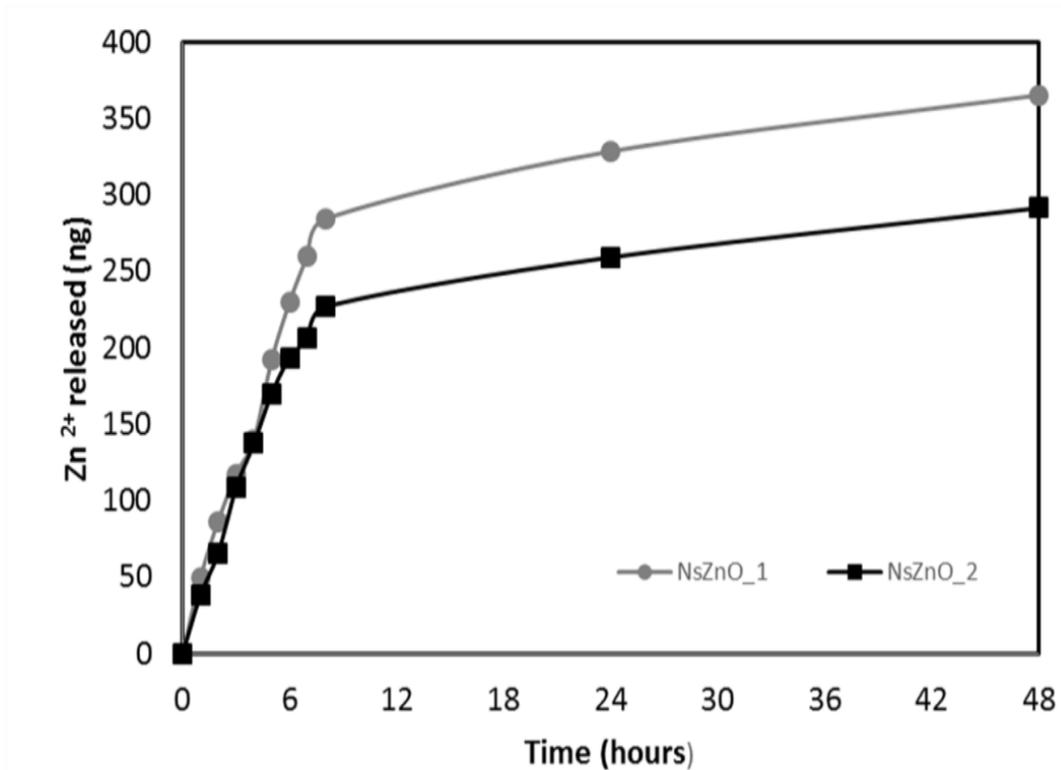


Figura 5.16 Curve di rilascio di ioni Zn²⁺

Entrambi i materiali sono in grado di rilasciare ioni Zn⁺⁺ su una superficie sintetica che simula la pelle a pH fisiologico pari a 7,4. Come si evidenzia dall'andamento delle due curve, il campione NsZnO-1 è in grado di rilasciare un maggior contenuto di ioni Zn⁺⁺ nell'arco di 48h rispetto al campione NsZnO-2, in accordo con la maggiore area superficiale specifica. Questo rappresenta un grande vantaggio in campo dermatologico poiché si ha una maggiore efficienza antibatterica in accordo con lo scopo di creare supporti adeguati in campo topico.

6. Incorporazione dell'Ibuprofene

L'incorporazione del farmaco all'interno dei pori dei due campioni di ossido di zinco sintetizzati è stata eseguita con il processo in CO₂ supercritica e attraverso adsorbimento da etanolo.

In entrambi i casi le molecole di Ibuprofene vengono adsorbite sulla superficie dell'ossido grazie ad interazioni fisico-chimiche[67].

Ulteriori metodi per incorporare il farmaco all'interno di una matrice sono l'*Incipient wetness*, *Physical mixing*, *Melt method*, *Solvent impregnation*.

6.1 Incorporazione dell'ibuprofene con CO₂ supercritica

L'incorporazione dell'Ibuprofene nell'ossido di zinco, mediante trattamento in CO₂ supercritica si basa sull'articolo di Gignone et al.[68]. Sono utilizzati i due campioni di ossido di zinco ottenuti dalle sintesi precedenti: NsZnO-1 e NsZnO-2.

Questo metodo consiste nella preparazione di due pastiglie: una pastiglia di 100 mg di Ibuprofene e una pastiglia di 100 mg di ossido di zinco; queste vengono inserite in un cilindretto di vetro all'interno del quale viene posto anche un filtro di carta dello stesso diametro del cilindro. Il filtro, di adeguato cut-off, permette di far passare le molecole di farmaco nel materiale. Infine le estremità del cilindro vengono occluse con lana di polipropilene per evitare contaminazioni esterne.

L'immagine sottostante permette di capire al meglio come è costituito il cilindro.

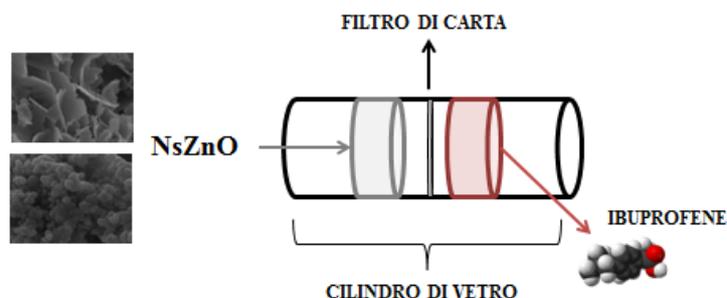


Figura 6.1 Rappresentazione schematica del cilindro con pastiglie di farmaco e materiale

I cilindri di vetro vengono successivamente inseriti all'interno dell'impianto di CO₂ supercritica; in quest'ultimo è necessario imporre le condizioni ottimali per il farmaco, che ricordiamo essere troppo solubile in CO₂. La temperatura viene impostata a un valore relativamente basso, pari a 35°C, mentre la pressione raggiungibile può avere valori più elevati. In questo caso il valore di pressione risulta di 100 bar.

Il trattamento in scCO₂ ha durata di 12 ore per permettere la dissoluzione e contemporanea diffusione del farmaco all'interno del materiale. Al termine di tale periodo si riporta il

sistema alle condizioni di temperatura e pressione ambiente, ottenendo così delle pastiglie di ossido di zinco contenenti l'ibuprofene e due pastiglie di materiale bianco.

6.1.1 Caratterizzazione

In questo caso sono state effettuate come tecniche di caratterizzazione la diffrazione a raggi X, l'analisi di adsorbimento di azoto, l'analisi termogravimetrica e la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.

6.1.1.1 NsZnO-1

Diffrazione a raggi X

Al fine di indagare lo stato cristallino del farmaco presente all'interno del supporto è stata eseguita un'analisi diffrattometrica XRD del campione.

A tal scopo si è messo a confronto la curva del materiale IBU@NsZnO-1 dopo trattamento in CO₂ supercritica con quella dell'ibuprofene e quella del campione prima dell'incorporazione.

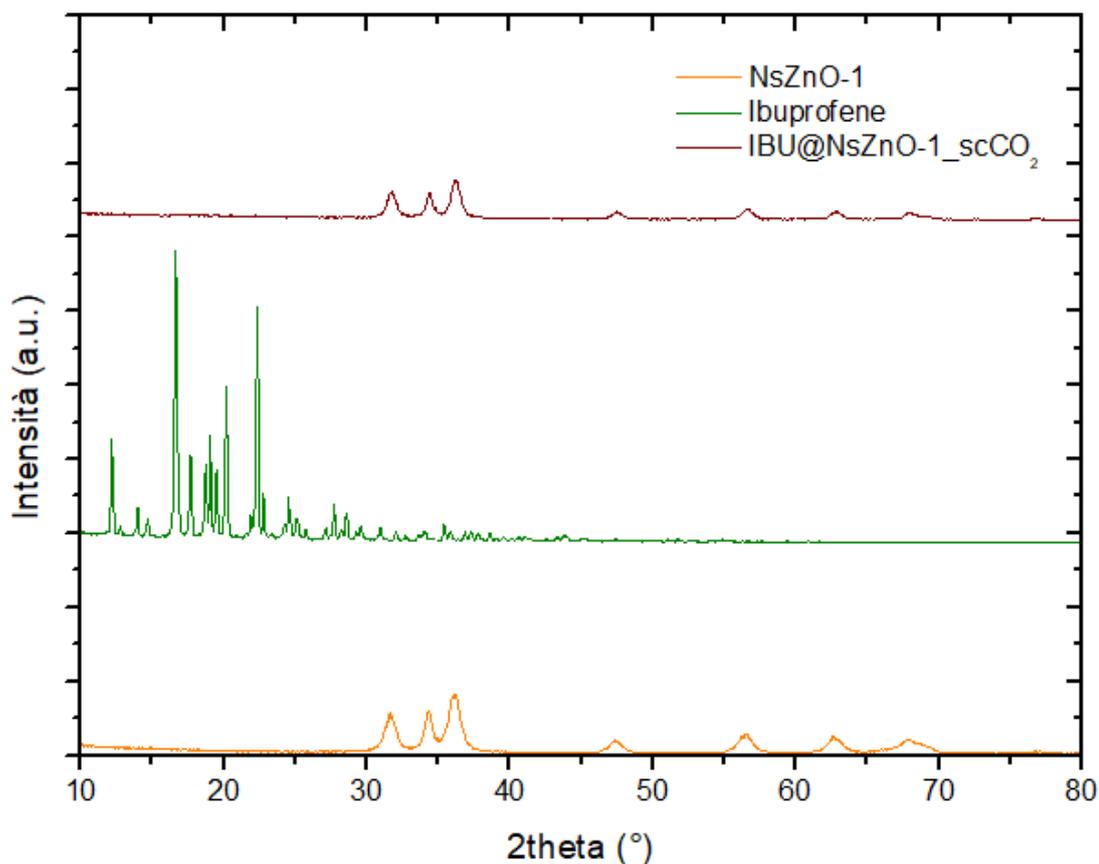


Figura 6.2 Confronto degli spettri XRD di: NsZnO-1(arancione), ibuprofene (verde), IBU@NsZnO-1 dopo trattamento in scCO₂ (rossa)

Il campione con il farmaco presenta un *pattern* congruente a quello del materiale tal quale mostrando la sola fase cristallina di tipo wurtzite dell'ossido di zinco. L'assenza dei picchi relativi all'ibuprofene evidenzia che quest'ultimo sia presente in forma amorfa.

L'amorfezzazione delle molecole di farmaco gioca un ruolo chiave all'interno di un carrier farmaceutico poiché aumenta la velocità di dissoluzione e la solubilità, parametri fondamentali nella somministrazione di principi attivi.

Inoltre non si osserva una nuova fase di $ZnCO_3$, possibile prodotto di reazione tra ZnO e CO_2 .

Analisi di adsorbimento di azoto

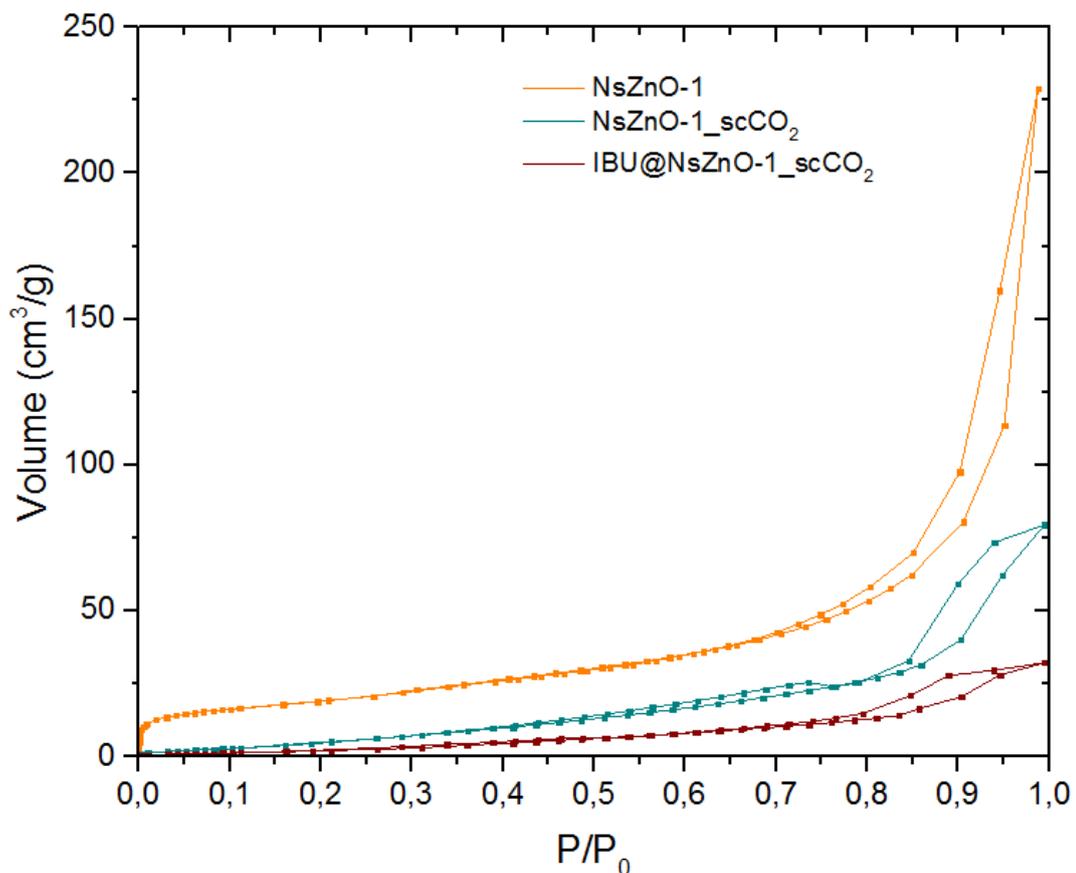


Figura 6.3 Confronto delle isoterme di: NsZnO-1(arancione), NsZno-1 dopo scCO₂ (verde), IBU@NsZnO-1 dopo trattamento in scCO₂ (rossa)

Tabella 6.1 Dati ottenuti dall' analisi di fisisorbimento per i campioni NsZnO-1

Campione	Area superficiale specifica	Volume dei pori
NsZnO-1	68 m ² /g	0,234 cc/g
NsZnO-1 dopo scCO ₂	19 m ² /g	0,123 cc/g
NsZnO-1+IBU dopo scCO ₂	8,329 m ² /g	0,00443 cc/g

È ragionevole pensare che il cambiamento delle isoterme possa essere dovuto al trattamento in scCO₂ e quindi alla carbonatazione che si è verificata.

I risultati ottenuti mostrano come l'area specifica superficiale del campione diminuisca dopo l'incorporazione del farmaco; in particolare il valore decresce da 68 m²/g fino a circa 8 m²/g; anche il volume dei pori diminuisce di praticamente due ordini di grandezza. Questo è coerente con la capacità del farmaco di andare a occupare le porosità libere del materiale.

Un ragionamento simile potrebbe essere fatto per quanto riguarda il trattamento in CO₂ supercritica; la superficie del materiale infatti può reagire con la CO₂ andando a modificare sia l'area superficiale specifica che il volume dei pori.

Analisi termogravimetrica

Da questa analisi si possono avere informazioni riguardanti la quantità di farmaco incorporato. In questo caso però non vale l'assunzione per cui la differenza della curva arancione (campione tal quale) e quella della curva rossa (materiale impregnato) sia attribuibile tutta alla presenza del farmaco poiché, dopo trattamento in CO₂ supercritica, potrebbe essere avvenuta reattività tra la superficie del campione e il biossido di carbonio che quindi può reagire in modo diverso in presenza del farmaco. Non si può quindi dire a priori che la curva arancione sia il bianco di quella rossa perché questo porterebbe a sottostimare l'effetto del farmaco. Per questo motivo si può affermare che la quantità di farmaco presente nel campione dopo trattamento in CO₂ supercritica sia compresa nell'intervallo tra 6% e 13%.

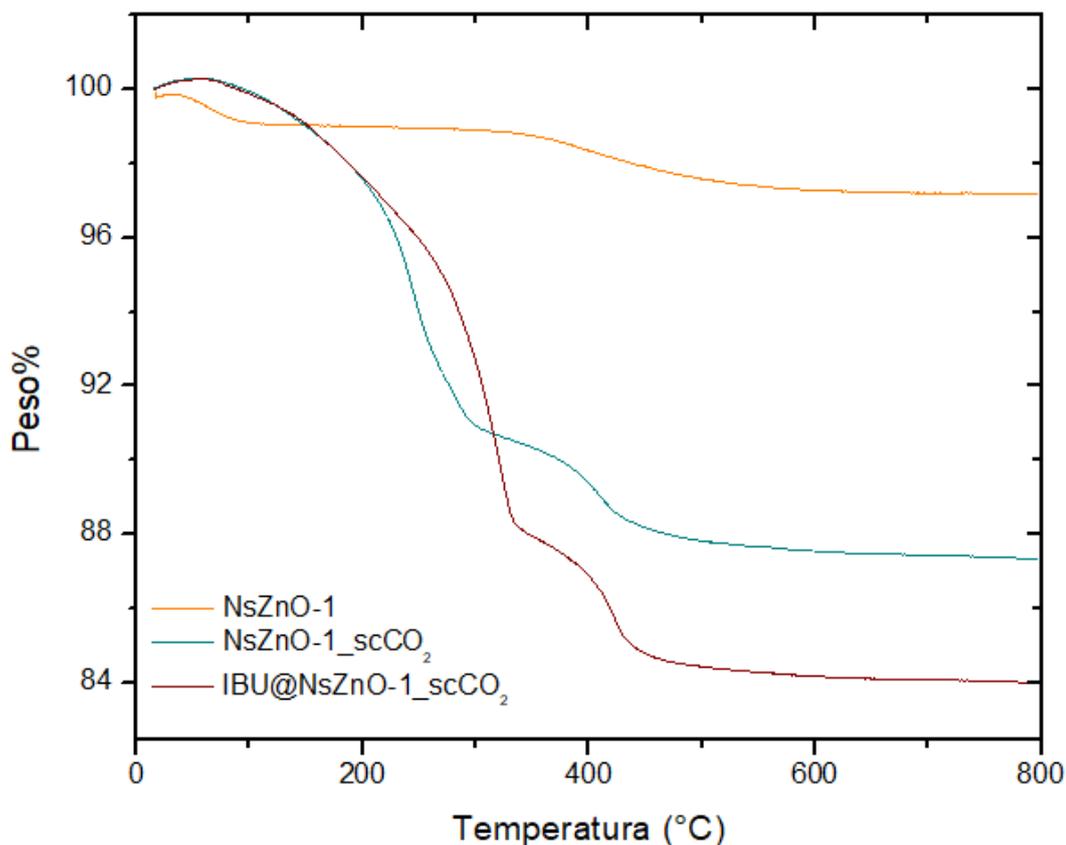


Figura 6.4 Confronto delle curve TGA di: NsZnO-1(arancione), NsZnO-1 dopo scCO₂ (verde), IBU@NsZnO-1 dopo trattamento in scCO₂ (rossa)

Il campione tal quale non è molto carbonatato; in seguito al trattamento in scCO₂ si carbonata con un 12% in peso di carbonati. La curva con il farmaco (rossa) ha per certi aspetti la stessa forma di quella senza (verde) con due salti principali di perdita di peso come se le fasi di perdita di peso fossero sempre quelle dei carbonati; tuttavia appare spostata poiché la superficie è diversa in presenza del farmaco ovvero si perde peso in modo diverso.

Questo perché i carbonati non si decompongono alla stessa temperatura poiché è presente l'effetto del farmaco che ritarda la loro decomposizione in temperatura.

Ipotizzando che la quantità di acqua adsorbita in superficie dal campione comporti una perdita di peso di circa il 3-4% (curva arancione), allora si può affermare che i carbonati presenti rappresentino il 12% in peso del campione trattato in CO₂ supercritica (differenza tra la curva verde e quella arancione).

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

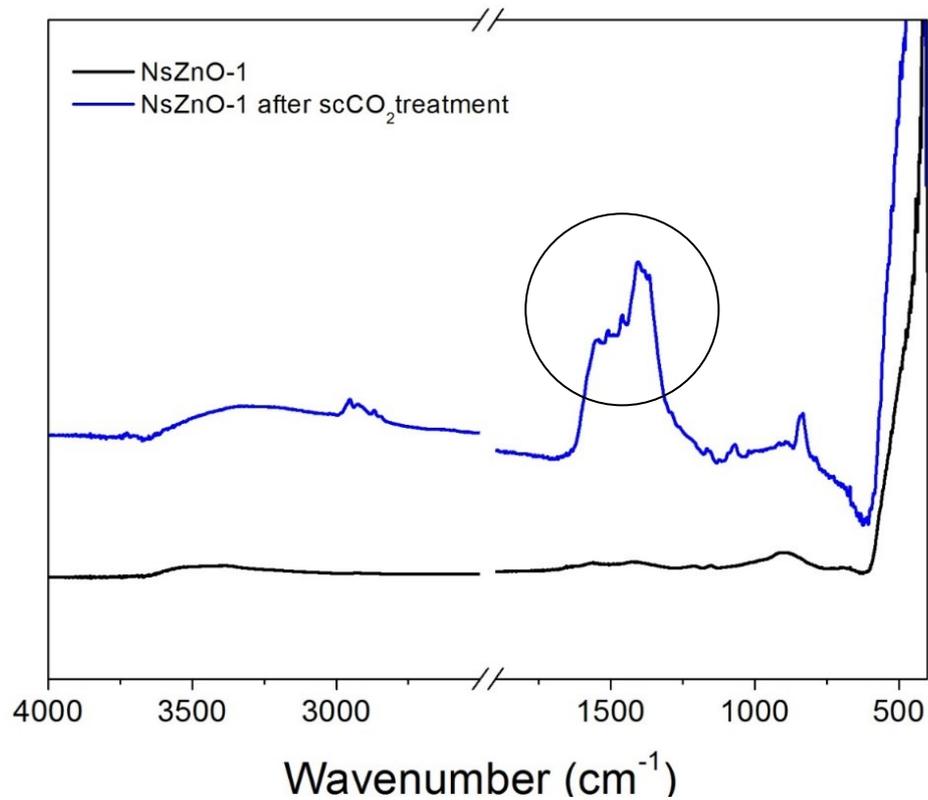


Figura 6.5 Spettri IR di: NsZnO-1(nero), NsZnO-1 dopo scCO_2 (blu)

Come mostrato in figura, nella banda di assorbimento compresa tra 1200 e 1600 cm^{-1} sono presenti carbonati superficiali.

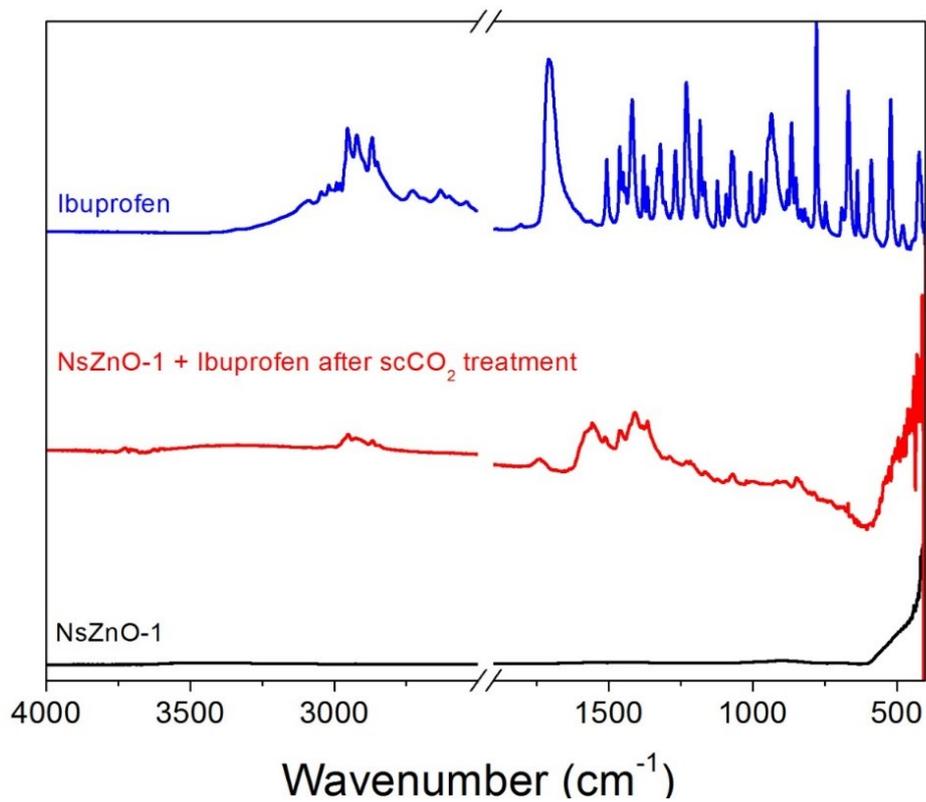


Figura 6.6 Spettri IR di: NsZnO-1(nero), IBU@NsZnO-1 dopo scCO_2 (rossa), ibuprofene (blu)

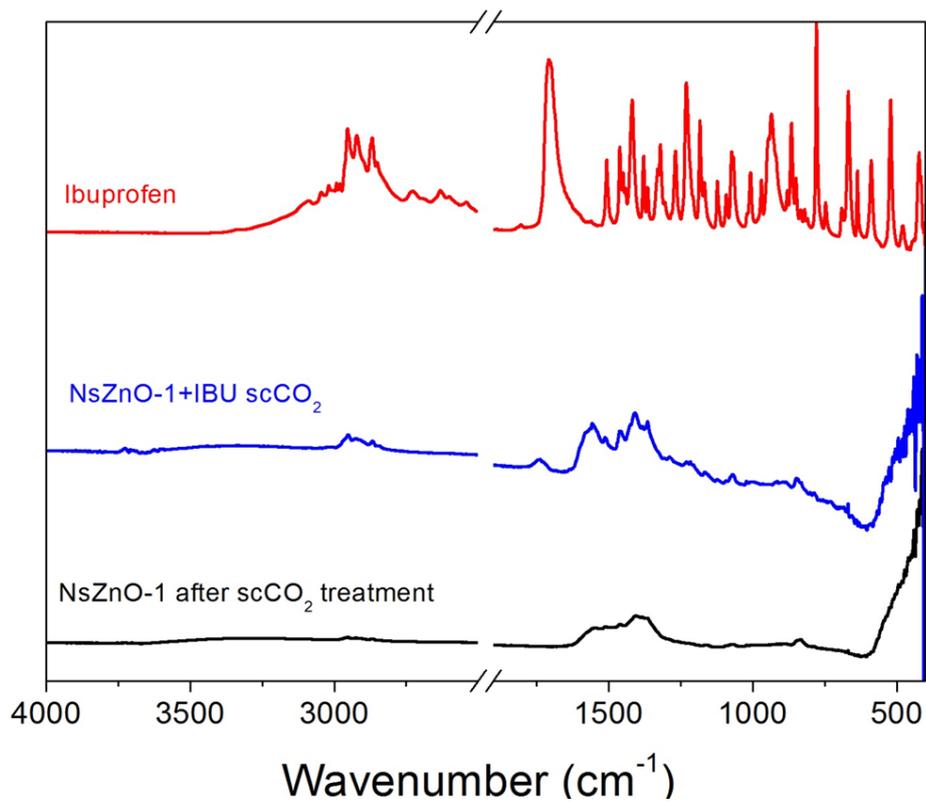


Figura 6.7 Spettri IR di: IBU@NsZnO-1(blu), NsZnO-1 dopo scCO_2 (nera), ibuprofene (rossa)

NsZnO-1 dopo scCO₂ presenta picchi di idrocarburi derivanti dalla linea dell'impianto e carbonati. Il farmaco si vede bene e in particolare si nota il picco a 1710 cm⁻¹ tipico dell'ibuprofene.

La fase in seguito a trattamento in scCO₂ si è trasformata in carbonati.

In presenza del farmaco il materiale non adsorbe tanti carbonati coerentemente con il fatto che la molecola di ibuprofene sta andando in superficie e in qualche modo lo protegge dalla carbonatazione. Infatti si innescano meccanismi competitivi tra il farmaco e la CO₂.

Lo spettro ossidrilico dopo incorporazione non è cambiato.

L'assorbimento di carbonati superficiali si registra nella zona intorno a 1500 cm⁻¹.

6.1.2 NsZnO-2

Diffrazione a raggi X

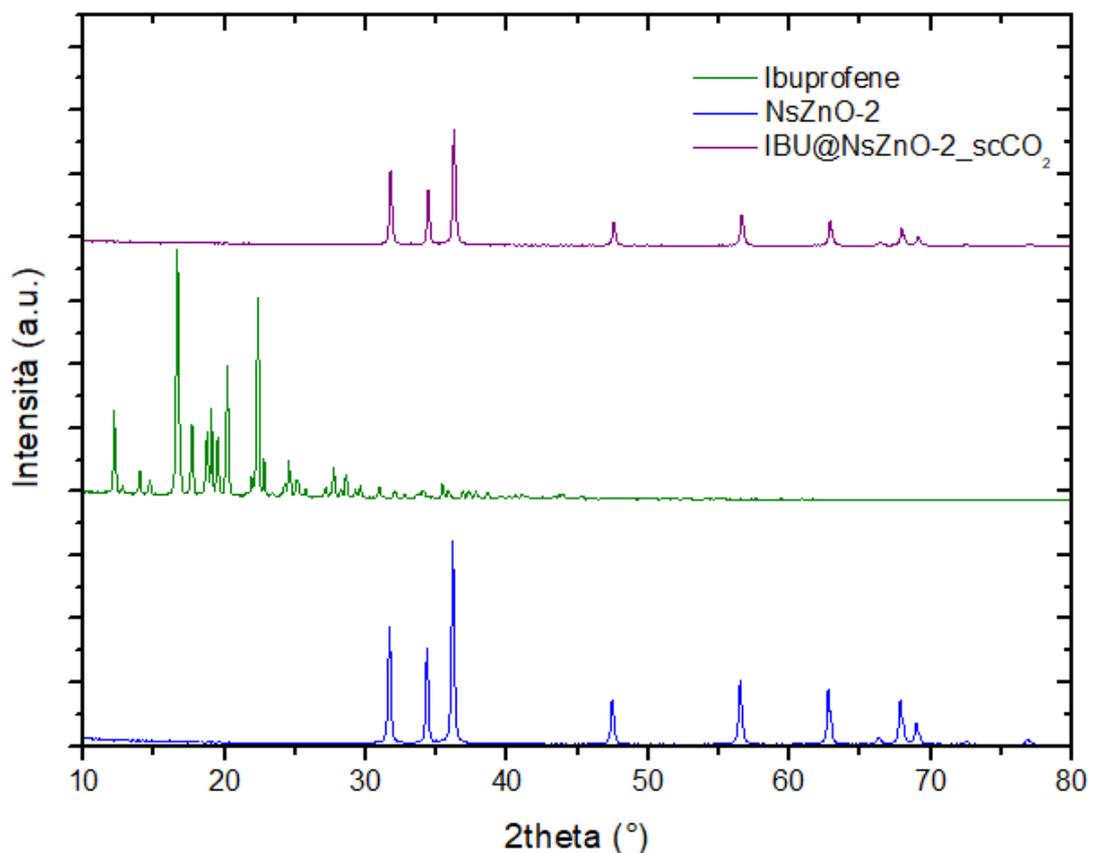


Figura 6.8 Spettri XRD di: NsZnO-2(blu), IBU@NsZnO-2 dopo scCO₂ (viola), ibuprofene (verde)

Il campione NsZnO-2, al pari di NsZnO-1, mostra un *pattern* di diffrazione congruente con quello del materiale bianco. Sono infatti presenti gli stessi picchi ai medesimi angoli, indice del fatto che il farmaco si trovi in forma amorfa, il che, come è stato già detto, rappresenta un enorme vantaggio per i *carrier* farmaceutici.

Anche in questo caso non si è verificata reazione tra l'ossido di zinco e la CO₂ poiché non sono presenti picchi relativi alla presenza di carbonato di zinco.

Analisi di adsorbimento di azoto

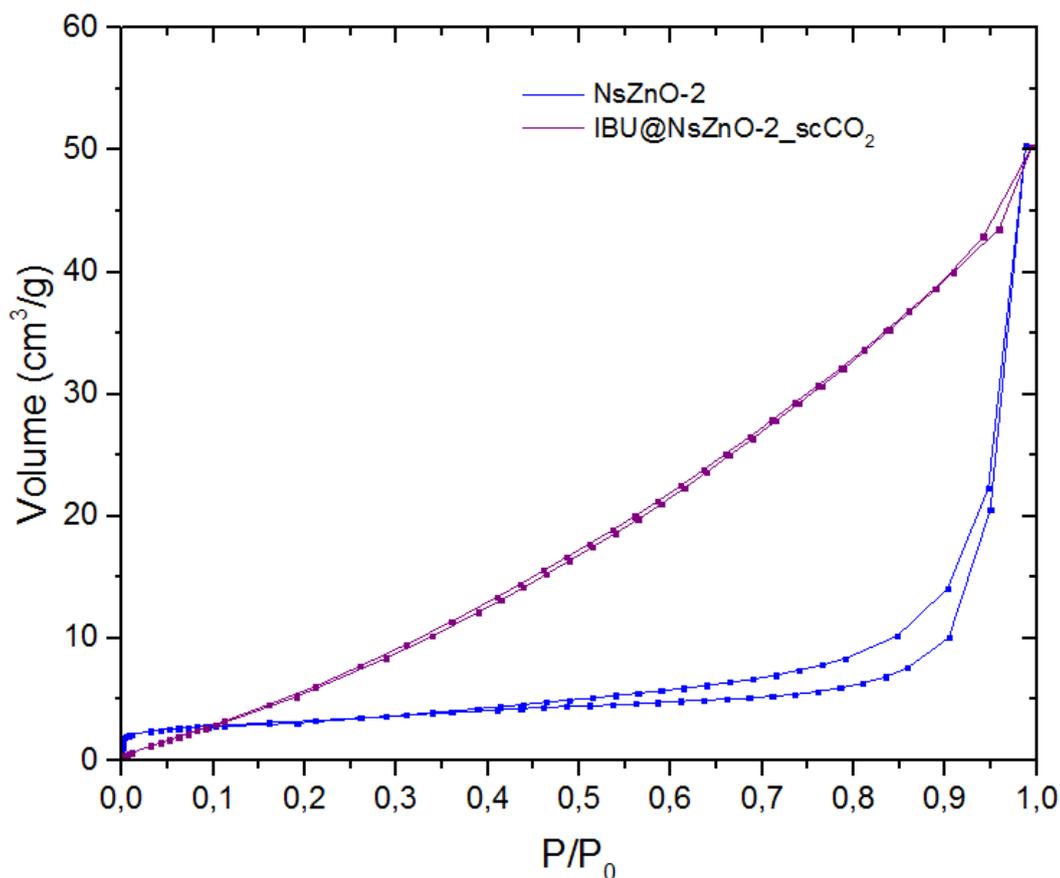


Figura 6.9 Confronto delle isoterme di: NsZnO-2(blu), IBU@NsZnO-2 dopo trattamento in scCO₂ (viola)

Tabella 6.2 Dati ottenuti dall' analisi di fisisorbimento per i campioni NsZnO-2

Campione	Area superficiale specifica	Volume dei pori
NsZnO-2	11,62 m ² /g	0,03257 cc/g
NsZnO-2+IBU dopo scCO ₂	38,87 m ² /g	0,06335 cc/g

L'isoterma di IBU@NsZnO-2 dopo trattamento in scCO₂ presenta un andamento lineare crescente non riconducibile a nessuna isoterma secondo la classificazione IUPAC. Anche l'area superficiale e i volumi dei pori sono aumentati. Questo può essere dovuto a un

errore di misura del peso del campione durante la prova; tuttavia, a causa della mancanza di altro campione utilizzabile, non è stato possibile effettuare un'ulteriore prova.

Analisi termogravimetrica

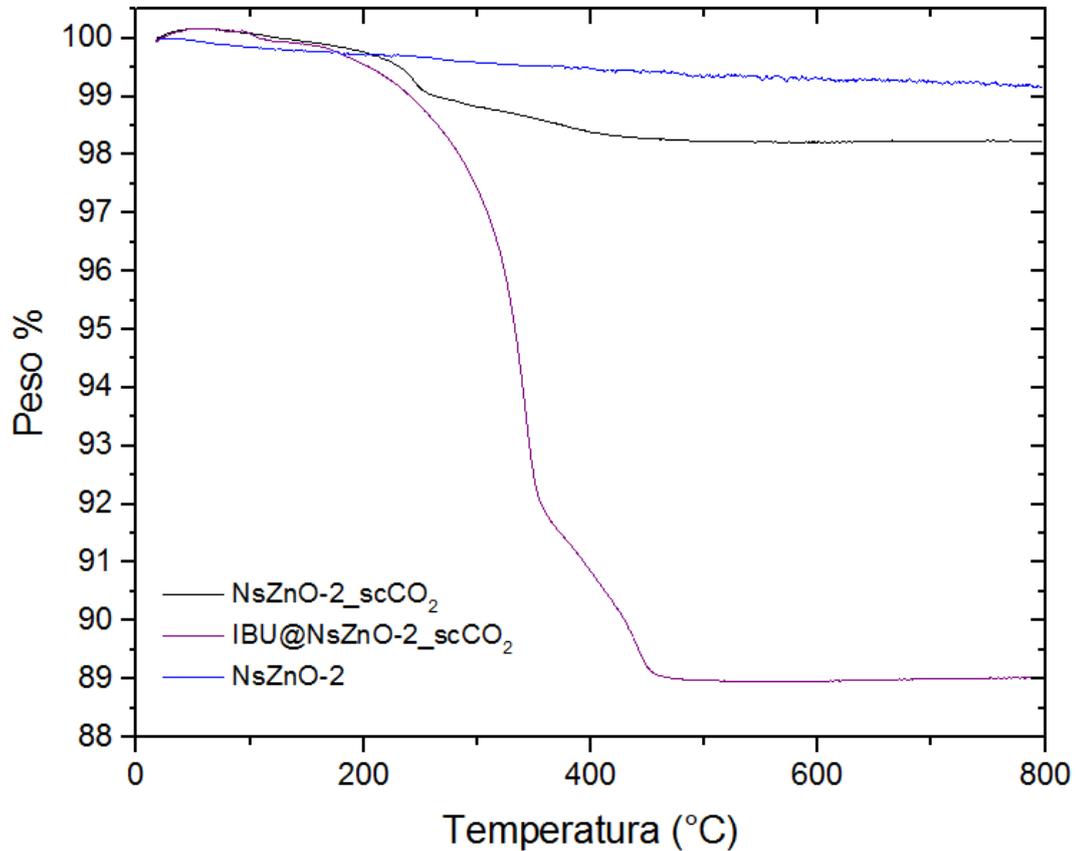


Figura 6.10 Confronto delle curve TGA di: NsZnO-2(blu), NsZnO-2 dopo scCO₂ (nera), IBU@NsZnO-2 dopo trattamento in scCO₂ (viola)

Le curve TGA mostrano come NsZnO-2 si sia carbonato relativamente molto poco dopo trattamento in CO₂ supercritica; si vede che alla temperatura di circa 300°C si ha una notevole perdita di peso per quanto riguarda il materiale impregnato, dovuta alla sola decomposizione del farmaco.

Effettuando una sottrazione tra la curva di NsZnO-2 dopo scCO₂ e quella di IBU@NsZnO-2 dopo scCO₂, si ricava un valore di circa il 9%. Allora si può dire che il farmaco presente nel campione è almeno il 9%.

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

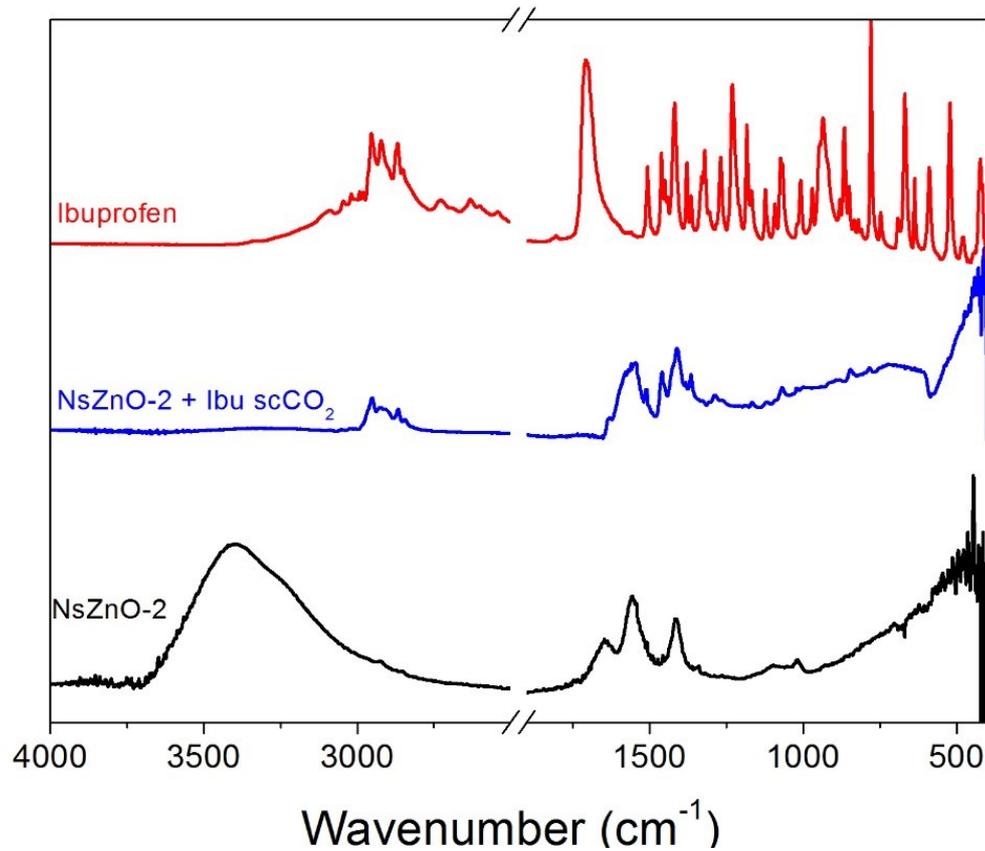


Figura 6.11 Spettri IR di: IBU@NsZnO-2(blu), NsZnO-2 (nera), ibuprofene (rossa)

NsZnO-2 sembra meno carbonatato di NsZnO-1. Presenta un andamento tipico di un materiale semiconduttore; infatti quando passano le cariche, la banda intorno ai 3500 cm⁻¹ sale perché si ha assorbimento della reazione dovuta a transizioni di tipo elettronico. Lo spettro poi diventa normale come se non ci fossero più quei fenomeni e si vede bene il farmaco soprattutto a una lunghezza d'onda di circa 3000 cm⁻¹.

6.2 Adsorbimento da etanolo

L'incorporazione dell'ibuprofene nell'ossido di zinco è stata ottenuta anche mediante adsorbimento da soluzione. In particolare, ci si è basati sull'articolo di Mortera et al. [69], utilizzando come solvente l'etanolo puro.

Nell'articolo preso come riferimento, l'adsorbimento del farmaco veniva effettuato mediante contatto con una soluzione di pentano per 2h a temperatura ambiente sotto continua agitazione magnetica. A causa dell'elevata volatilità dell'alcano, in questo caso si è preferito utilizzare l'etanolo come solvente con agitazione magnetica sia per 2h che per 24h e visto che il quantitativo di farmaco usato risultava eccessivo si è preferito dimezzare due volte i grammi richiesti.

La metodologia di impregnazione consiste nel pesare 100 mg di materiale (NsZnO-1 ed NsZnO-2) e 160 mg di farmaco; successivamente vengono aggiunti al farmaco 5 ml di etanolo puro al fine di creare in questo modo una soluzione di ibuprofene in etanolo, che verrà poi dimezzata e aggiunta a ciascun campione. Si ottengono in questo modo due provette contenenti materiale, farmaco e solvente; queste vengono sottoposte ad agitazione magnetica per 2h e per 24h. In seguito le soluzioni vengono centrifugate permettendo la separazione del materiale precipitato e del surnatante.

La quantità di farmaco incorporata sarà poi determinata mediante analisi del surnatante con spettroscopia UV-VIS.

Da una prima analisi dell'assorbanza i primi valori risultavano troppo elevati quindi si è effettuata una diluizione 1:40, ottenendo dei valori relativamente accettabili sia per il surnatante dei due campioni dopo impregnazione per 2h, sia dopo quella di 24h.

Per poter calcolare il valore di *drug loading*, è stato necessario costruire una retta di taratura partendo da una soluzione madre di ibuprofene in etanolo con concentrazione di 1,6 mg/ml ovvero pesando 0,04 mg di farmaco in un matraccio da 25 ml portato a volume con etanolo puro. Dalla soluzione madre sono state poi effettuate delle diluizioni a cascata prelevando da ogni soluzione a monte 5 ml e portando a volume con etanolo in un matraccio da 10 ml.

I valori di concentrazione delle soluzioni figlie sono riassunti nella tabella seguente:

Tabella 6.3 valori di concentrazione delle soluzioni figlie

Soluzione	Concentrazione
Soluzione MADRE	1,6 mg/ml
Soluzione 1	800 µg/ml
Soluzione 2	400 µg/ml
Soluzione 3	200 µg/ml
Soluzione 4	100 µg/ml

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

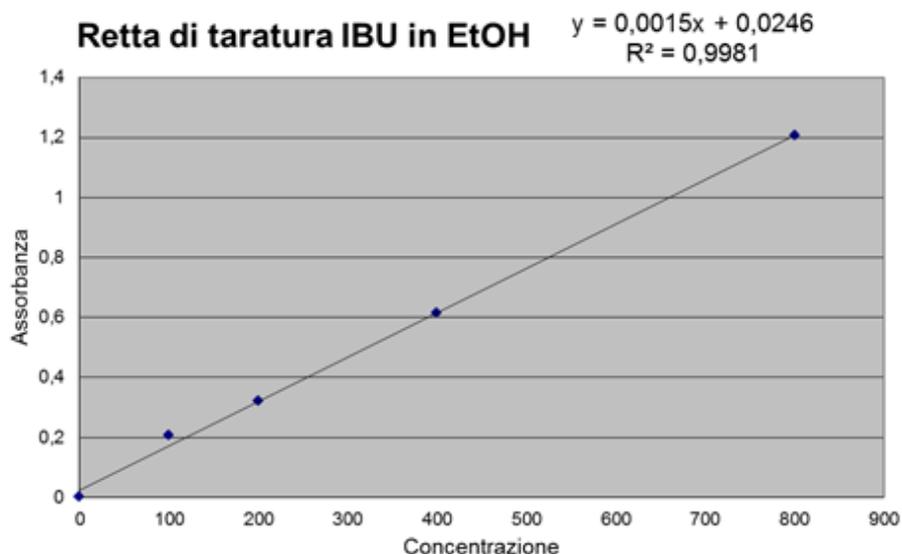


Figura 6.12 Retta di taratura dell'ibuprofene in etanolo

Per calcolare la quantità di farmaco incorporato bisogna introdurre il concetto di *Loading Capacity*

$$LC\% = \frac{\text{Quantità di farmaco incorporato}}{\text{Quantità di materiale totale}}$$

Andando a sostituire l'assorbanza dei due materiali con l'utilizzo dello spettrofotometro, nella retta di taratura ricavata e misurando il volume di surnatante ricavato dopo centrifugazione, si è arrivati ad ottenere dei precisi valori di LC %, che vengono riportati nella tabella seguente:

Tabella 6.4 Valori di loading capacity per i campioni NsZnO-1 e NsZnO-2 dopo loading di 2h e 24h

Loading Capacity (LC%) 2 ORE	
NsZnO-1	14%
NsZnO-2	23%

Loading Capacity (LC%) 24 ORE	
NsZnO-1	18%
NsZnO-2	16%

6.2.1 Caratterizzazione

6.2.1.1 NsZnO-1

Diffrazione a raggi X

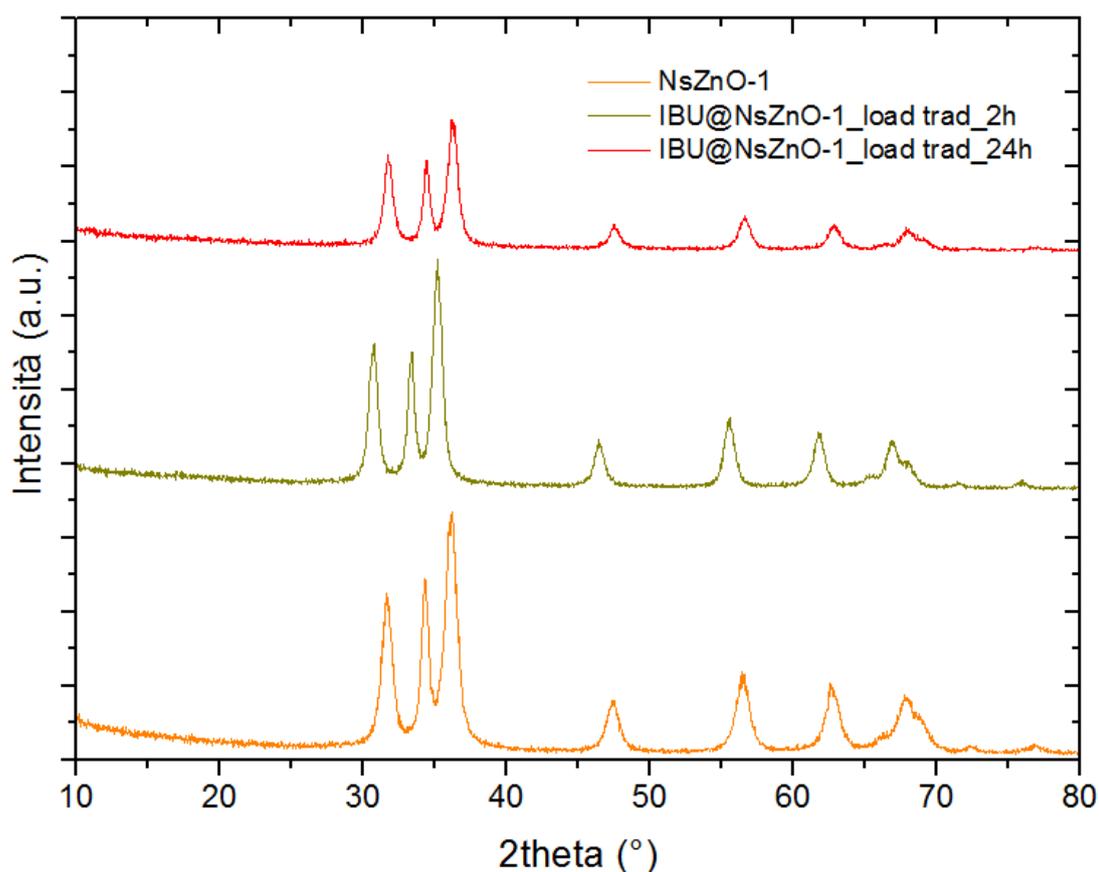


Figura 6.13 Spettri XRD di: NsZnO-1(arancione), IBU@NsZnO-1 dopo 2h(verde), IBU@NsZnO-1 dopo 24h (rossa)

Dopo il loading tradizionale da etanolo in 2h e 24h il campione NsZnO-1 continua a mostrare un pattern di diffrazione tipico di un materiale con struttura wurtzite. Sono presenti i medesimi picchi del materiale bianco associabili ai piani cristallografici già citati precedentemente. Picchi relativi al farmaco non sono presenti, indice del grande vantaggio di avere ottenuto il farmaco incorporato in forma amorfa.

La differenza tra i tre diversi spettri risiede semplicemente in una minore intensità dei picchi dei materiali impregnati; si vede infatti che l'intensità diminuisce all'aumentare del tempo di permanenza in etanolo.

Analisi termogravimetrica

Questa analisi permette di ricavare il quantitativo di farmaco incorporato partendo dal materiale tal quale (curva arancione).

Le curve TGA presentano differenti stadi di perdita di peso a differenti intervalli di temperatura.

Per NsZnO-1 si nota uno step iniziale di perdita di peso, relativamente di piccola entità, dovuto alla perdita di acqua superficiale che si riscontra anche nei due materiali incorporati.

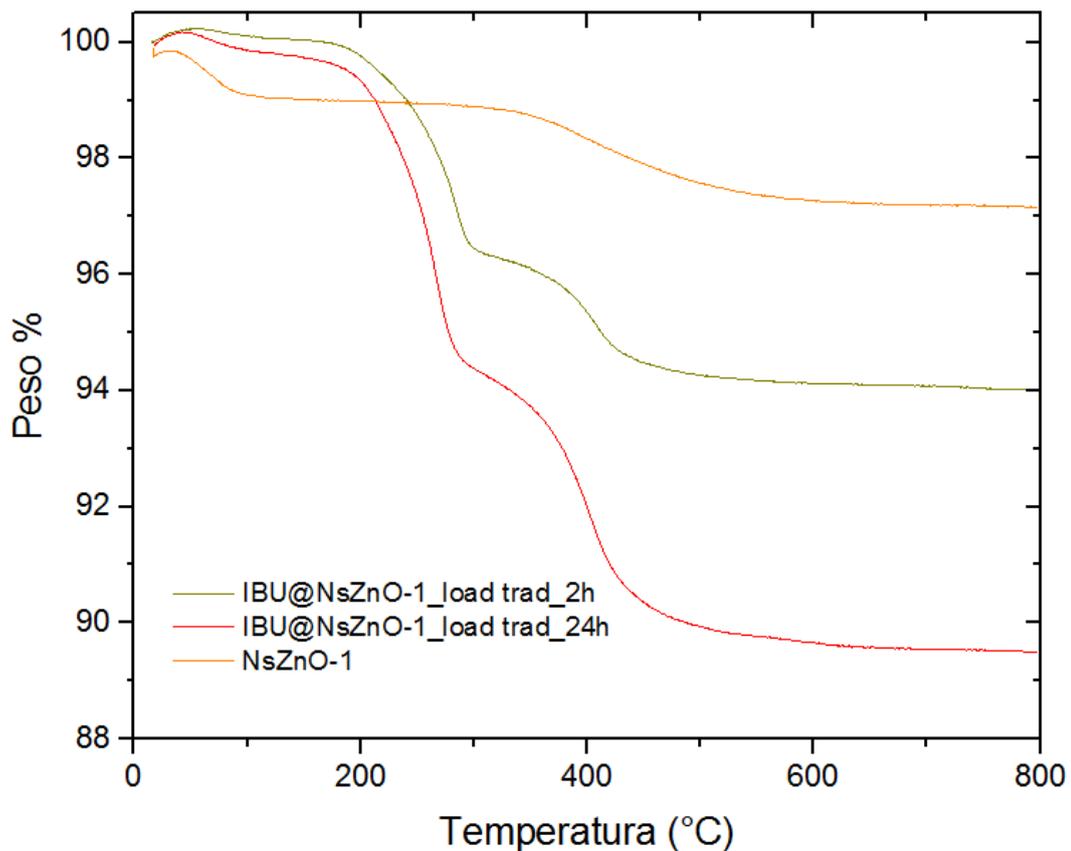


Figura 6.14 Confronto delle curve TGA di: NsZnO-1(arancione), IBU@NsZnO-1 2h (verde), IBU@NsZnO-2 24h (rossa)

Dalle curve TGA è possibile notare che i materiali impregnati presentano un uguale andamento di perdita di peso, suddiviso in tre principali cadute di peso. La prima, da 17°C a circa 100°C, rappresenta la percentuale di acqua residua persa durante il trattamento termico. Successivamente si ha una perdita di peso nell'intorno di 100-300°C, più marcata nel caso del campione impregnato per 24 ore. L'ultima è quella presente da 300°C a circa 400°C.

La percentuale di ibuprofene incorporato viene stimata facendo la differenza tra il materiale impregnato (curva verde e curva rossa) e il bianco (curva arancione).

I valori di farmaco all'interno del materiale sono riassunti nella tabella sotto.

Tabella 6.5 Percentuale di ibuprofene incorporato da analisi TG per NsZnO-1

Campione	% IBUPROFENE incorporato
NsZnO-1+IBU_ load trad in EtOH (2h)	3 %
NsZnO-1+IBU_ load trad in EtOH (24h)	8 %

Il campione IBU@NsZnO-1 dopo loading tradizionale di 24h ha incorporato una maggiore quantità di farmaco. Nonostante le percentuali siano decisamente inferiori a quelle ottenute dall'analisi precedente, i due valori risultano coerenti dal punto di vista che la % di farmaco incorporato sia più elevata nel caso di un loading più lungo.

6.2.1.2 NsZnO-2

Diffrazione a raggi X

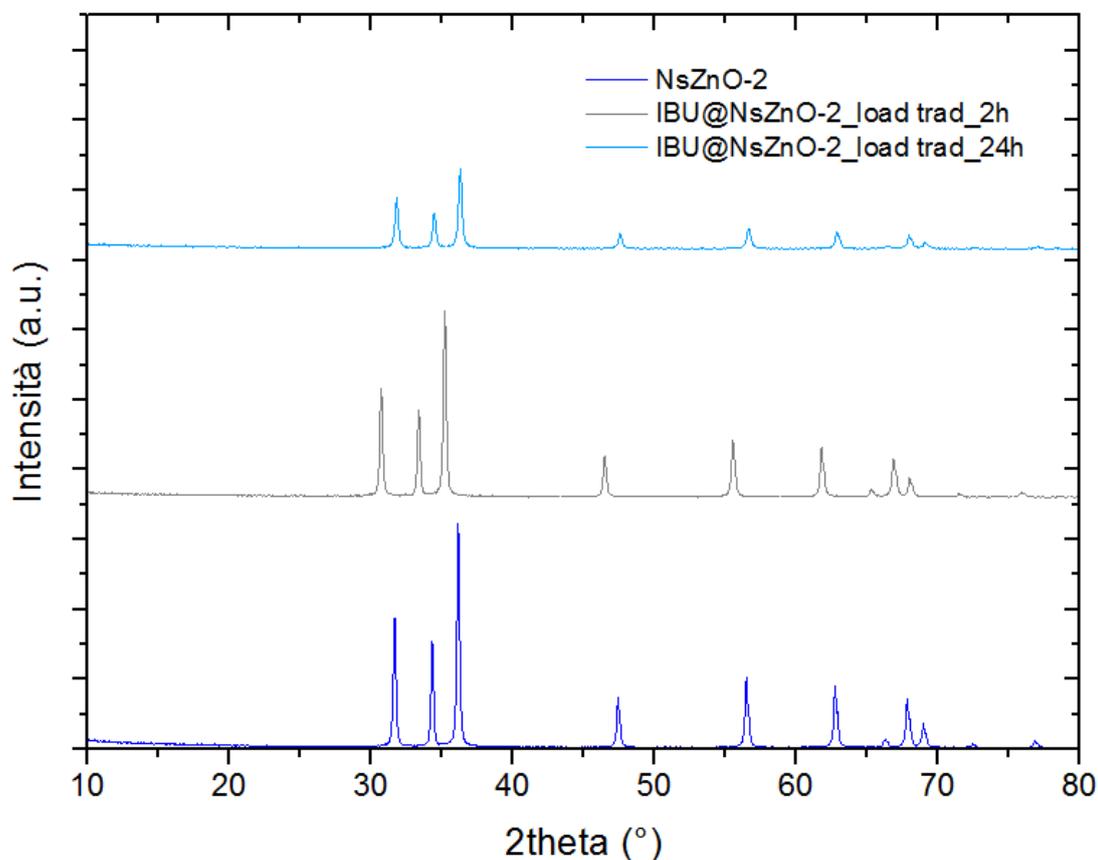


Figura 6.15 Spettri XRD di: NsZnO-2(blu), IBU@NsZnO-2 dopo 2h(grigia), IBU@NsZnO-2 dopo 24h (azzurra)

Dopo il loading tradizionale da etanolo anche il campione NsZnO-2 continua a mostrare un pattern di diffrazione congruente con la struttura wurtzite dell'ossido di zinco, con la presenza di un farmaco in forma amorfa. I picchi di questo materiale continuano ad essere decisamente più stretti del campione NsZnO-1; anche in questo caso l'intensità dei picchi diminuisce all'aumentare del tempo di contatto con il solvente organico.

Analisi termogravimetrica

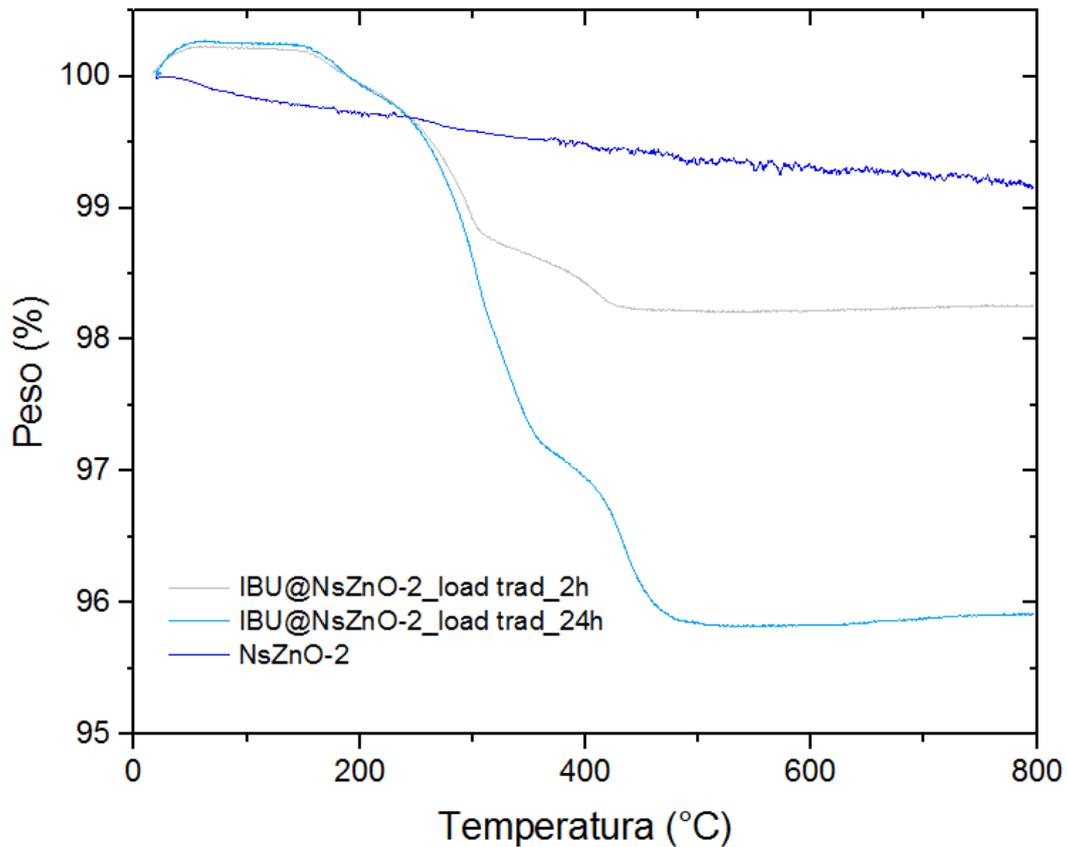


Figura 6.16 Confronto delle curve TGA di: NsZnO-2(blu), IBU@NsZnO-2 dopo 2h (grigia), IBU@NsZnO-2 dopo 24h (azzurra)

Dalle curve TGA è possibile notare che i materiali impregnati inizialmente presentano lo stesso andamento, il quale, con l'aumentare della temperatura, risulta un po' spostato ma sempre suddiviso in tre principali scalini di perdita di peso. La prima, da 17°C a circa 100°C, rappresenta la percentuale di acqua residua persa durante il trattamento termico. Successivamente si ha una perdita di peso nell'intorno di 200-400°C, più marcata nel caso del campione impregnato per 24 ore. L'ultima è quella presente da 350°C a circa 500°C.

La percentuale di ibuprofene incorporato viene stimata facendo la differenza tra il materiale impregnato (curva grigia e curva azzurra) e il bianco (curva blu).

I valori di farmaco all'interno del materiale sono riassunti nella tabella 6.6.

Tabella 6.6 Percentuale di ibuprofene incorporato da analisi TG per NsZnO-2

Campione	% IBUPROFENE incorporato
IBU@NsZnO-2_ load trad in EtOH (2h)	2 %
IBU@NsZnO-2_ load trad in EtOH (24h)	5 %

Il campione IBU@NsZnO-2 dopo loading tradizionale di 24h ha incorporato una maggiore quantità di farmaco. Nonostante le percentuali siano decisamente inferiori a quelle ottenute dall'analisi precedente, i due valori risultano coerenti dal punto di vista che la % di farmaco incorporato sia più elevata nel caso di un loading più lungo.

6.3 Stabilità dei supporti

L'ossido di zinco può essere soggetto a corrosione atmosferica se in presenza di umidità, inquinanti gassosi e di piccole percentuali di CO₂.

Nell'articolo di Pan et al.[70] è stata studiata l'instabilità dell'ossido di zinco in condizioni ambientali normali (70% RH, ~350 ppm di CO₂) dimostrando come questo composto tenda a reagire con il biossido di carbonio formando carbonato di zinco secondo la reazione:



Per verificare la stabilità dei materiali dopo il trattamento con CO₂ supercritica e, in particolar modo, investigare sulla possibilità di formazione di carbonati, è stata quindi eseguita un'ulteriore analisi diffrattometrica dopo un periodo di tempo di tre mesi dall'incorporazione.

Si riportano di seguito gli spettri XRD dei materiali in figura 6.17 e 6.18.

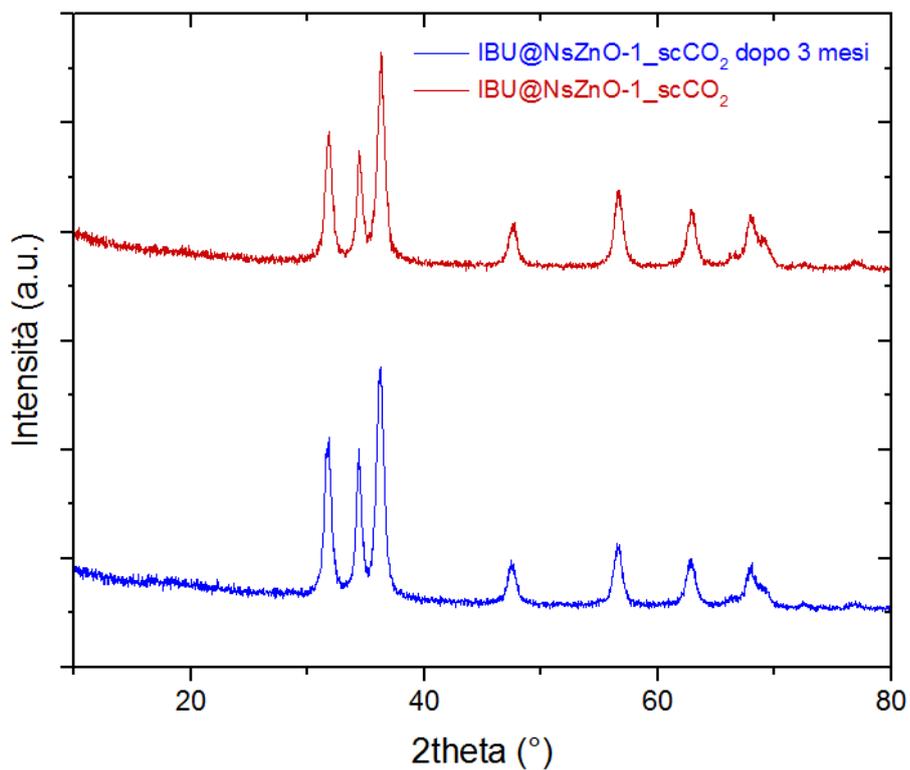


Figura 6.17 Spettri XRD di: IBU@NsZnO-1(rossa), IBU@NsZnO-1 dopo 3 mesi(blu)

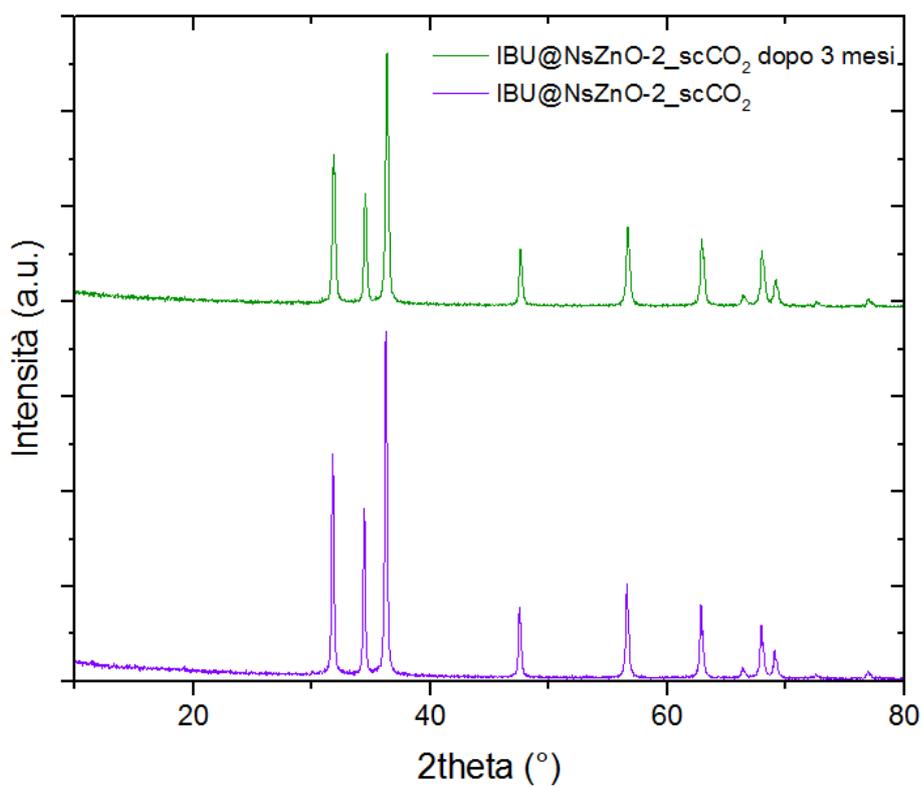


Figura 6.18 Spettri XRD di: IBU@NsZnO-2(viola), IBU@NsZnO-2 dopo 3 mesi(verde)

Gli spettri XRD dei due campioni dopo 3 mesi presentano sempre lo stesso *pattern* di quelli iniziali, con la sola presenza della fase cristallina wurtzite dell'ossido di zinco. Non sono infatti presenti altri picchi dovuti alla presenza di carbonati di zinco indice quindi del fatto che l'ossido di zinco non abbia reagito con il biossido di carbonio dopo questo lasso di tempo.

6.4 Determinazione del drug loading in UV-VIS

Visti i risultati diversi del drug loading tradizionale ottenuti con l'analisi termogravimetrica rispetto al calcolo della *Loading Capacity*, si è deciso di eseguire un'ulteriore prova al fine di determinare quale metodo fosse più corretto utilizzare per capire la quantità di farmaco incorporata.

Nella parte sperimentale di questo test sono stati pesati 5 mg di materiale impregnato con il farmaco (nello specifico IBU@NsZnO-1_Load Trad e IBU@NsZnO-2_Load Trad per mancanza di campioni dopo trattamento in scCO_2), successivamente posti in un matraccio da 10 ml e portati a volume con etanolo. Dopo la dissoluzione del materiale nel solvente, velocizzata attraverso sonicazione, la prova vera e propria è stata effettuata il giorno successivo.

Al fine di misurarne l'assorbanza allo spettrofotometro, è stata costruita la retta di taratura di ibuprofene in etanolo di concentrazione pari a 1 mg/ml. Le successive diluizioni sono riportate in tabella, dove è presente anche il valore di assorbanza misurato con spettrofotometro. Soluzioni con concentrazione inferiore a 50 $\mu\text{g/ml}$ hanno rilevato un valore di assorbanza troppo basso e per questo motivo non sono state prese in considerazione.

Viene di seguito riportata anche la retta di taratura in etanolo.

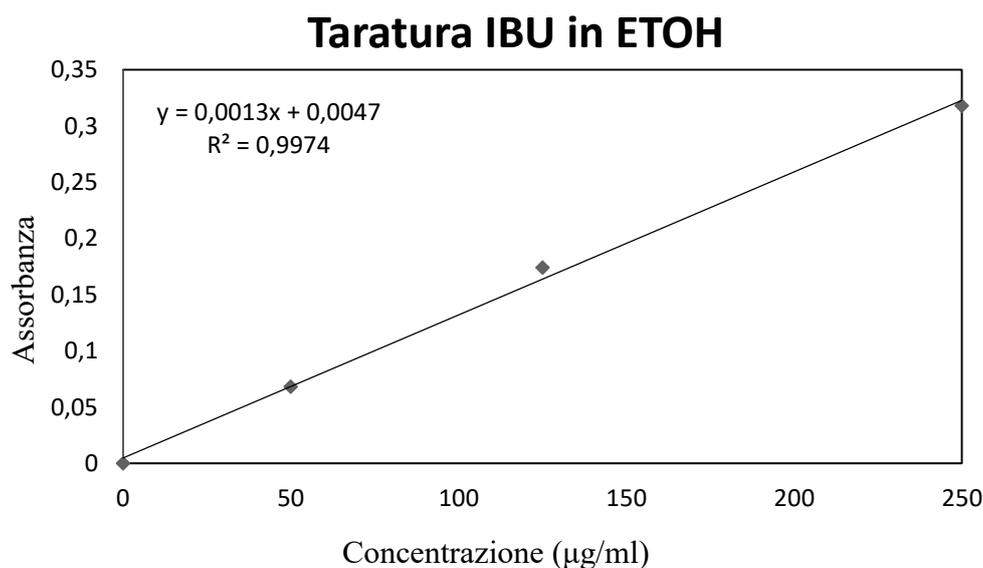


Figura 6.19 Retta di taratura dell'ibuprofene in etanolo

Tabella 6.7 Valori di concentrazione e assorbanza della retta di taratura

Soluzione	Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	Assorbanza (263 nm)
0	0	0
1	50	0,068
2	125	0,174
3	250	0,318

I materiali sono stati filtrati con filtri da siringa in modo da eliminare eventuali particelle rimaste sospese. Misurando il valore di assorbanza delle soluzioni di materiale in etanolo, con semplici calcoli matematici, si sono potute identificare le rispettive concentrazioni; da queste, conoscendo il volume iniziale (ml) di solvente aggiunto, si è arrivati a calcolare la quantità di farmaco presente nei due campioni. Infine si è proceduto al calcolo della percentuale di farmaco incorporato conoscendo il peso iniziale dei due materiali. In tabella si sono riassunti i valori finali ottenuti.

Tabella 6.8 Valori di mg di ibuprofene incorporato e relativa percentuale

	Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	Quantità farmaco totale (μg)	Percentuale %
NsZnO-1_Load Trad	85	848	>14 %
NsZnO-2_Load Trad	103	1025	>17 %

Come si può notare le % ottenute sono relativamente alte per entrambi i campioni analizzati. Allo scopo di comprendere meglio tale risultato si riporta un confronto tra i tre metodi utilizzati per il calcolo del Drug Loading:

Tabella 6.9 Confronto tra le percentuali di farmaco incorporato con le diverse tecniche di analisi

	Loading Capacity	TGA	Analisi in UV-VIS
NsZnO-1_Load Trad	18%	9%	14 %
NsZnO-2_Load Trad	16%	4%	17 %

Le percentuali ottenute evidenziano una particolare somiglianza tra il valore di LC e quello derivante dall'analisi in UV-VIS. I valori da TGA sono decisamente più bassi, soprattutto per il campione NsZnO-2 che una percentuale di incorporazione di quasi tre volte inferiore agli altri due.

Da questo si evince che per l'ossido di zinco l'analisi termogravimetrica non è la misura più adatta per valutare la quantità di farmaco poiché durante il trattamento in $scCO_2$ si verifica una carbonatazione che può essere diversa da quella che si verifica durante l'incorporazione del farmaco e quindi non si ha un vero bianco per permettere il calcolo della quantità di ibuprofene incorporato. Non si può escludere, infatti, che durante la TGA il farmaco non venga trasformato in un composto in grado di reagire con la matrice e che la CO_2 che si forma non reagisca con l'ossido di zinco per dare carbonato di zinco.

7. Rilascio del farmaco

La parte sperimentale di rilascio consiste nel verificare l'effettiva capacità di rilascio dell'ibuprofene da parte dei campioni sintetizzati precedentemente. Questo è di fondamentale importanza poiché permette di capire se il sistema utilizzato per incorporare il farmaco presenti un comportamento reversibile di desorbimento, oltre che adsorbimento, nei confronti di quest'ultimo.

Tra i materiali a disposizione si è deciso di utilizzare quelli con il farmaco incorporato dopo trattamento con CO₂ supercritica e quelli derivati dal loading tradizionale dopo 24h.

Il rilascio di ibuprofene è stato eseguito alla facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Torino, nel Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco.

Tale esperimento è stato effettuato *in vitro* utilizzando una cella rotante multi-compartimentale costituita da una parte ricevente e una donatrice separate da una membrana e formate da pozzetti di forma sferica. La membrana, inizialmente messa a bagno, è stata adagiata al comparto donatore; su ogni pozzetto è stata posta una guarnizione necessaria all'isolamento. Le due rotelle sono state poi chiuse con viti in modo incrociato per permettere una maggiore adesione.

I pozzetti della parte donatrice sono stati riempiti con circa 20 mg di materiale a cui poi è stato aggiunto 1 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline) in ciascuno.

Quelli della parte ricevente sono stati riempiti semplicemente con 1 ml di soluzione PBS; ogni ora si è prelevata la soluzione ricevente, sostituendola di volta in volta con un pari quantitativo di soluzione "fresca".

L'esperimento è stato condotto per una durata di 6 ore.

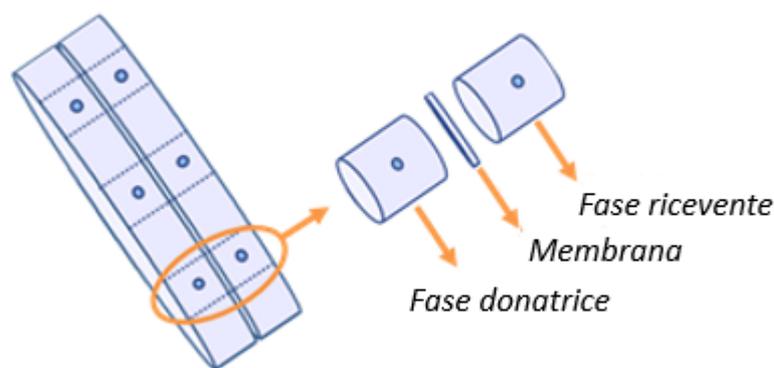


Figura 7.1 Rappresentazione schematica di una rotella multicompartimentale

Per costruire la curva di rilascio sono state analizzate le soluzioni prelevate con spettrofotometro UV-Vis BECKMAN COULTER DU730.

Per procedere all'analisi è stato necessario innanzitutto costruire la retta di taratura del farmaco; a tal proposito 0,02 g di ibuprofene sono stati pesati e aggiunti in un matraccio di 20 ml, portato a volume con etanolo puro, creando così una soluzione madre con concentrazione di 1 mg/ml.

Per la costruzione della retta, le soluzioni successive sono state diluite con il tampone fosfato ottenendo cinque concentrazioni man mano più basse. Si riportano nella tabella sottostante le assorbanze misurate con spettrofotometro UV-VI:

Tabella 7.1 Valori di concentrazione e assorbanza delle soluzioni preparate

SOLUZIONE	CONCENTRAZIONE	ASSORBANZA (263 nm)
Soluzione 1	500 µg/ml	1,003
Soluzione 2	250 µg/ml	0,433
Soluzione 3	125 µg/ml	0,245
Soluzione 4	50 µg/ml	0,102
Soluzione 5	25 µg/ml	0,036

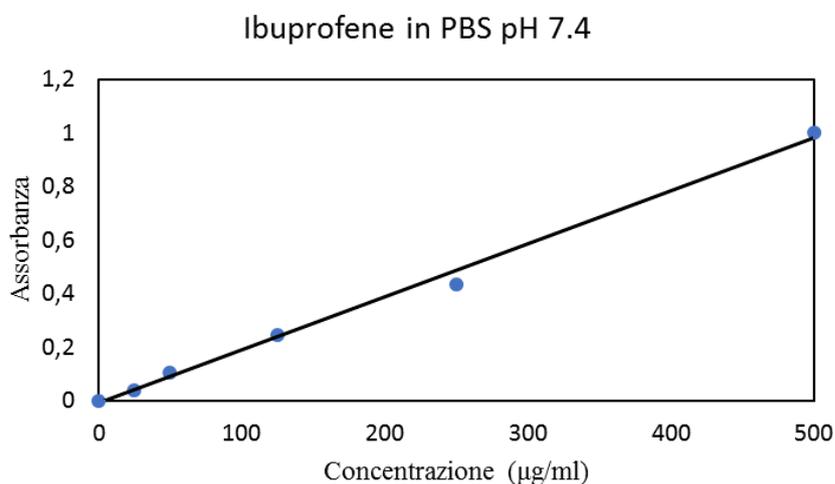


Figura 7.2 Retta di taratura dell'ibuprofene in PBS a pH=7.4

Tabella 7.2 Risultati del rilascio di NsZnO-1 dopo trattamento con scCO₂

TEMPO	µgrammi CUMULATIVI
0	0
1	379,2
2	640,7
3	827,1
4	1066,9
5	1178,9
6	1297,6

Tabella 7.3 Risultati del rilascio di NsZnO-2 dopo trattamento con scCO₂

TEMPO	µgrammi CUMULATIVI
0	0,00
1	563,7
2	861,88
3	1015,4
4	1152,4
5	1251,1
6	1309,8

Tabella 7.4 Risultati del rilascio di NsZnO-1 dopo loading tradizionale

TEMPO	µgrammi CUMULATIVI
0	0,00
1	598,7
2	940,1
3	1232,1
4	1383
5	1540,6
6	1617

Tabella 7.5 Risultati del rilascio di NsZnO-2 dopo loading tradizionale

TEMPO	µgrammi CUMULATIVI
0	0
1	447,6
2	590,1
3	648,2
4	699,7
5	740
6	771,4

Vengono riportati gli andamenti di ibuprofene rilasciato nel tempo, in termini di mg rilasciati.

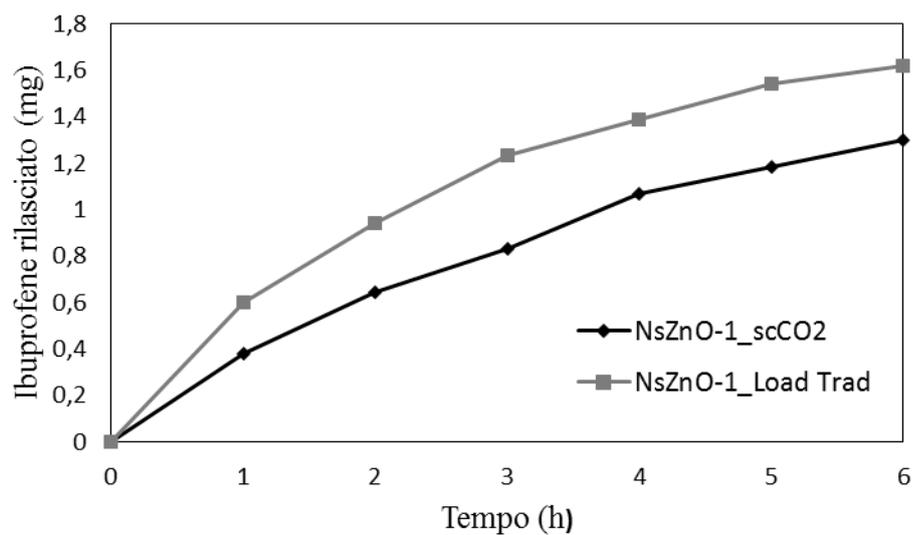


Figura 7.3 Andamento di mg di ibuprofene rilasciato in funzione del tempo per il campione NsZnO-1: dopo scCO₂ (nera), dopo loading tradizionale (grigia)

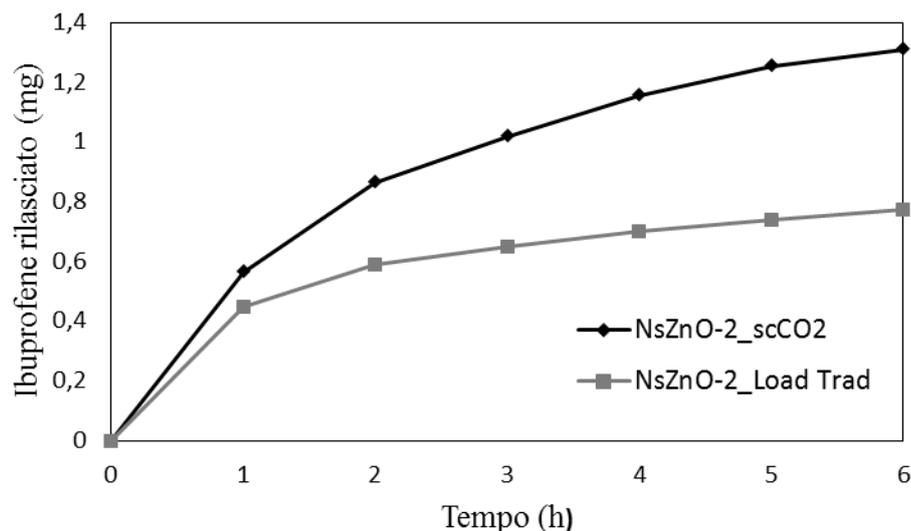


Figura 7.4 Andamento di mg di ibuprofene rilasciato in funzione del tempo per il campione NsZnO-2: dopo scCO₂ (nera), dopo loading tradizionale (grigia)

Dai grafici riportati si evince che i materiali siano in grado di rilasciare il farmaco e che quindi l'ibuprofene non sia irreversibilmente confinato nel supporto.

Mettendo a confronto lo stesso materiale impregnato con le due diverse tecniche, non si nota una congruenza sul vantaggio di utilizzare un metodo o l'altro. Si ricorda infatti che nell'adsorbimento da etanolo il contatto tra farmaco e materiale ha avuto durata di 24 ore, mentre nel caso della scCO₂ di 12 ore.

Inoltre non si può escludere che la reattività con la CO₂ possa aver dato una carbonatazione tale da aver intrappolato in qualche misura il farmaco.

I profili di ibuprofene rilasciato mostrano un veloce e continuo rilascio durante tutto l'intervallo di tempo esaminato. Le percentuali, calcolate conoscendo il quantitativo di farmaco incorporato mediante analisi termogravimetrica, risultano alquanto elevate per tutti i campioni esaminati con particolare riferimento a quello di NsZnO-1 derivante dal loading tradizionale.

La capacità di rilascio è largamente dovuta alla presenza del farmaco in forma amorfa all'interno delle porosità del materiale.

Questi risultati hanno quindi dimostrato che l'ibuprofene può essere rilasciato dai due materiali di sintesi (NsZnO-1 e NsZnO-2) ma il comportamento evidenziato è preferibile nel caso si voglia un rilascio rapido di farmaco.

Dai dati ricavati sopra, con particolare riferimento ai mg rilasciati, si possono valutare le cinetiche di rilascio per ogni campione e per ogni tecnica di incorporazione utilizzata. Queste vengono riportate confrontando ogni singolo materiale in funzione del metodo usato al fine di valutare quale tecnica presenti una maggiore velocità in termini di rilascio.

Tabella 7.6 Risultati del rilascio di NsZnO-1 dopo loading tradizionale

IBU@NsZnO-1 load trad		
Tempo	mg rilasciati	%
0	0	0
1	0,6	37
2	0,94	58
3	1,23	76,2
4	1,38	85,5
5	1,54	95,3
6	1,62	100

Tabella 7.7 Risultati del rilascio di NsZnO-1 dopo trattamento con scCO₂

IBU@NsZnO-1 scCO ₂		
Tempo	mg rilasciati	%
0	0	0
1	0,38	29,2
2	0,65	49,4
3	0,83	63,7
4	1,07	82,2
5	1,18	90,9
6	1,3	100

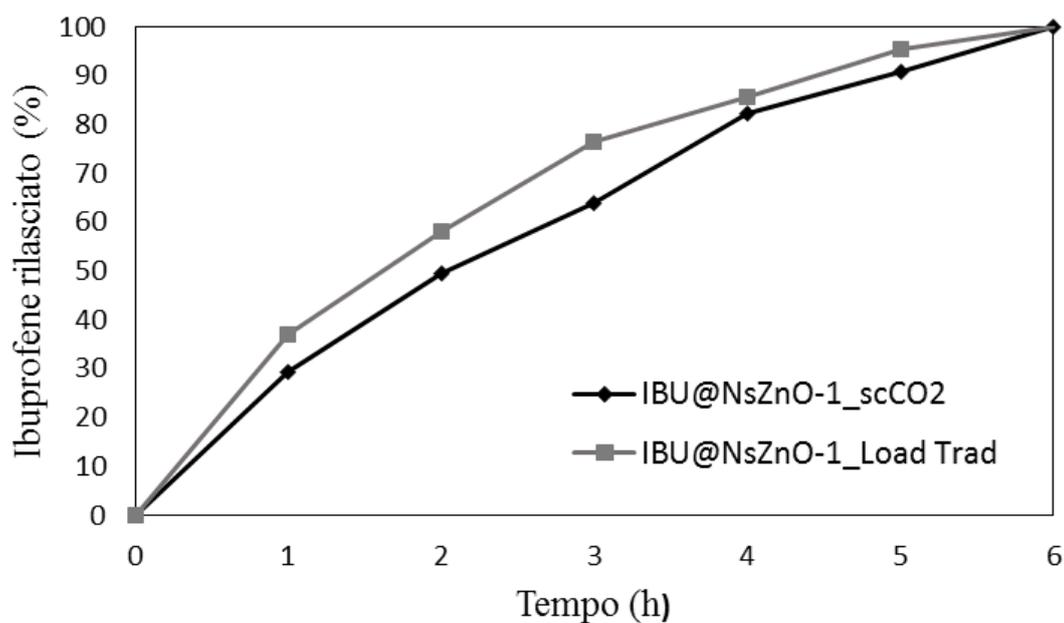


Figura 7.5 Andamento della % di ibuprofene rilasciato in funzione del tempo, per il campione NsZnO-1: dopo scCO₂ (nera), dopo loading tradizionale (grigia)

Tabella 7.8 Risultati del rilascio di NsZnO-2 dopo loading tradizionale

IBU@NsZnO-2 load trad		
Tempo	mg rilasciati	%
0	0	0
1	0,447556	58,0153
2	0,590111	76,49435
3	0,648222	84,02713
4	0,699667	90,69572
5	0,74	95,92401
6	0,771444	100,0001

Tabella 7.9 Risultati del rilascio di NsZnO-2 dopo trattamento con scCO₂

IBU@NsZnO-2 scCO ₂		
Tempo	mg rilasciati	%
0	0	0
1	0,56	43
2	0,86	65,8
3	1,02	77,5
4	1,15	88
5	1,25	95,5
6	1,31	100

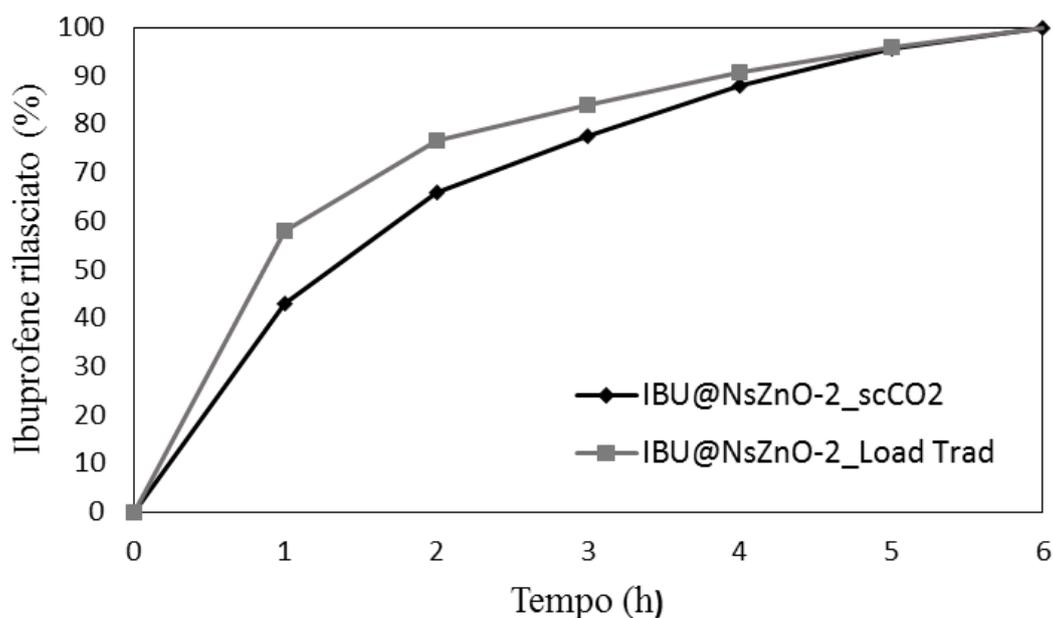


Figura 7.6 Andamento della % di ibuprofene rilasciato in funzione del tempo, per il campione NsZnO-2: dopo scCO₂ (nera), dopo loading tradizionale (grigia)

Dai due grafici sopra riportati si evince che la cinetica di rilascio nel caso di incorporazione con scCO₂ sia più lenta rispetto a quella derivante dal metodo di loading tradizionale.

8. Conclusioni

Il lavoro di questa tesi è stato incentrato sullo studio e l'attuazione di un sistema per il rilascio di farmaci in applicazioni topiche.

Il materiale preso in considerazione da utilizzare come riserva di farmaco è stato l'ossido di zinco nanostrutturato il quale presenta delle interessanti caratteristiche antibatteriche, una elevata area superficiale e una morfologia adatta ad applicazioni dermatologiche. Come farmaco, invece, è stato scelto l'ibuprofene, noto anti -infiammatorio.

In particolare, l'attenzione è stata rivolta alla realizzazione di un metodo "green", senza utilizzo di solventi organici, sia per la sintesi che per l'incorporazione del farmaco. A tal proposito sono stati sintetizzati due diversi materiali da usare come carrier, entrambi ottenuti senza l'utilizzo di solventi organici con due processi chimici diversi: *chemical bath deposition* e *soft-template sol-gel method*. Il primo materiale (NsZnO-1) è stato preparato usando cloruro di zinco e urea, mentre il secondo (NsZnO-2) è stato preparato utilizzando acetato di zinco e Pluronic 127 come agente templante per la crescita dell'ossido di zinco; quest'ultimo, inoltre, è stato sottoposto durante la sintesi a tre diversi trattamenti di evaporazione.

In seguito i campioni sono stati caratterizzati con diverse tecniche di analisi: diffrazione di raggi X, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, analisi di adsorbimento di azoto, analisi termogravimetrica e microscopia elettronica a scansione.

La prima analisi che è stata effettuata è quella relativa a informazioni riguardanti la morfologia, la quale ha permesso di escludere dalle altre caratterizzazioni i due materiali ottenuti con trattamento termico in stufa e in muffola, poiché presentavano una morfologia prevalentemente di natura conica, non ideale per applicazioni dermatologiche. I due campioni originali, invece, presentavano rispettivamente una morfologia lamellare e una sferica che hanno il grande vantaggio di non danneggiare le cellule cutanee.

La diffrazione a raggi X ha dimostrato la presenza della fase cristallina di tipo wurtzite dell'ossido di zinco per entrambi i materiali, con *pattern* congruente a quelli riportati in letteratura. L'unica differenza tra i due campioni risiedeva nella presenza di picchi leggermente più allargati di NsZnO-1 rispetto a NsZnO-2.

L'analisi di adsorbimento di azoto ha mostrato una maggiore area superficiale per il campione NsZnO-1 con valore di 68 m²/g rispetto ai 12 m²/g di NsZnO-2, confermata dai raggi X e dal feseem.

Per incorporare il farmaco si è deciso di utilizzare CO₂ supercritica, poiché risulta un composto non tossico, economico e di facile recupero, in accordo con la scelta di un processo non inquinante.

Tuttavia, al fine di effettuare un ulteriore confronto, si è deciso di impregnare il farmaco anche per via tradizionale attraverso adsorbimento da soluzione; a tal proposito si è scelto l'etanolo come solvente con un tempo di loading di 2h e 24h.

In seguito sono state eseguite ulteriori caratterizzazioni, come la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier che ha evidenziato la presenza del farmaco nei materiali in seguito all'incorporazione e la diffrazione di raggi X che ha mostrato invece la presenza dell'ibuprofene negli stessi in forma amorfa. Questo ricordiamo essere un vantaggio per il fine di tale lavoro poiché determina una migliore dissoluzione del farmaco.

È stata anche investigata la possibile reazione dell'ossido di zinco con l'anidride carbonica che tende a formare carbonati di zinco; dopo tre mesi dal trattamento in scCO₂ è stata nuovamente eseguita un'analisi diffrattometrica che non ha evidenziato alcun nuovo picco inducibile alla presenza di carbonati ma un uguale *pattern* XRD.

Un test di rilascio del farmaco è stato indispensabile poiché ha reso possibile capire se il supporto fosse un candidato ideale come riserva di ibuprofene e se avesse quindi un comportamento reversibile di adsorbimento/desorbimento del farmaco. La fase sperimentale di questa valutazione è stata svolta presso l'Università degli Studi di Torino, nel Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, andando a quantificare, nell'arco di sei ore quanti fossero i mg di farmaco effettivamente rilasciati dai materiali.

I risultati visibili dagli andamenti di rilascio hanno confermato la possibilità dei supporti scelti di rilasciare un elevato quantitativo di ibuprofene in un tempo relativamente limitato.

Poiché l'ossido di zinco deve la sua attività antibatterica al rilascio di ioni Zn⁺⁺ è stato effettuato un ulteriore test sperimentale su entrambi i materiali di sintesi per 8h, 24h, 48h per capirne l'effettiva efficienza; a tal proposito è stata utilizzata la cella di Franz in grado di simulare la pelle. Le curve di rilascio di ioni nel tempo hanno mostrato un andamento crescente per tutta la durata dell'esperimento, con una pendenza decisamente maggiore per le prime sei ore.

In conclusione si può affermare, in linea con lavori precedenti questo, relativi ad altri principi attivi, che l'ossido di zinco nanostrutturato sia un eccellente candidato come riserva di farmaci.

Bibliografia

- [1] J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, and D. G. Wingett, "Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications.," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 7, no. 9, pp. 1063–77, 2010.
- [2] M. T. Amin, a a Alazba, and U. Manzoor, "A Review of Removal of Pollutants from Water / Wastewater Using Different Types of Nanomaterials," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2014, pp. 1–25, 2014.
- [3] O. V Salata, "Journal of Nanobiotechnology," vol. 6, pp. 1–6, 2004.
- [4] V. J. Mohanraj and Y. Chen, "Nanoparticles – A Review," vol. 5, no. June, pp. 561–573, 2006.
- [5] T. Skorjanc, F. Benyettou, J.-C. Olsen, and A. Trabolsi, "Design of Organic Macrocyclic-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Drug Delivery," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 23, no. 35, pp. 8333–8347, 2017.
- [6] M. Nešić *et al.*, "Light controlled metallo-drug delivery system based on the TiO₂-nanoparticles and Ru-complex," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 347, pp. 55–66, 2017.
- [7] W. H. De Jong, "Drug delivery and nanoparticles : Applications and hazards," vol. 3, no. 2, pp. 133–149, 2008.
- [8] A. S. Fu and H. A. von Recum, "Affinity-Based Drug Delivery," *Eng. Polym. Syst. Improv. Drug Deliv.*, pp. 429–452, 2013.
- [9] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, and P. Chowdhury, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems.," *Acta Pol. Pharm.*, vol. 67, no. 3, pp. 217–23, 2010.
- [10] A. M. Nawar, N. A. Aal, N. Said, F. El-Tantawy, and F. Yakuphanoglu, "Improving the optical and electrical properties of Zinc Oxide thin film by Cupric Oxide dopant," *IOSR J. Appl. Phys.*, vol. 6, no. 4, pp. 17–22, 2014.
- [11] M. Laurenti and V. Cauda, "ZnO Nanostructures for Tissue Engineering Applications," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 11, p. 374, 2017.
- [12] A. Singh, N. B. Singh, S. Afzal, T. Singh, and I. Hussain, "Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants," *J. Mater. Sci.*, vol. 53, no. 1, pp. 185–201, 2018.
- [13] M. Laurenti, A. Verna, M. Fontana, M. Quaglio, and S. Porro, "Selective growth of ZnO nanowires on substrates patterned by photolithography and inkjet printing," *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 117, no. 2, pp. 901–907, 2014.
- [14] M. Abd-Ellah *et al.*, "Plasmonic gold nanoparticles for ZnO-nanotube photoanodes in dye-sensitized solar cell application," *Nanoscale*, vol. 8, no. 3, pp. 1658–1664, 2016.
- [15] Z. L. Wang, "Zinc oxide nanostructures: Growth, properties and applications," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 16, no. 25, 2004.
- [16] L. F. Koao, F. B. Dejene, and H. C. Swart, "Properties of flower-like ZnO nanostructures synthesized using the chemical bath deposition," *Mater. Sci. Semicond. Process.*, vol. 27, no. 1, pp. 33–40, 2014.

- [17] V. Cauda *et al.*, *Handbook of Nanomaterials Properties*. 2014.
- [18] A. Sirelkhatim *et al.*, “Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism,” *Nano-Micro Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 219–242, 2015.
- [19] P. J. P. Espitia, N. de F. F. Soares, J. S. dos R. Coimbra, N. J. de Andrade, R. S. Cruz, and E. A. A. Medeiros, “Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, no. 5, pp. 1447–1464, 2012.
- [20] Y. Xie, Y. He, P. L. Irwin, T. Jin, and X. Shi, “Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 7, pp. 2325–2331, 2011.
- [21] S. S. Bhat, A. Qurashi, and F. A. Khanday, “ZnO nanostructures based biosensors for cancer and infectious disease applications: perspectives, prospects and promises,” *Trends Anal. Chem.*, 2016.
- [22] A. Kolodziejczak-Radzimska and T. Jesionowski, “Zinc oxide—from synthesis to application: A review,” *Materials (Basel)*, vol. 7, no. 4, pp. 2833–2881, 2014.
- [23] M. Ibănescu, V. Muşat, T. Textor, V. Badilita, and B. Mahltig, “Photocatalytic and antimicrobial Ag/ZnO nanocomposites for functionalization of textile fabrics,” *J. Alloys Compd.*, vol. 610, pp. 244–249, 2014.
- [24] P. K. Mishra, H. Mishra, A. Ekielski, S. Talegaonkar, and B. Vaidya, “Zinc oxide nanoparticles: A promising nanomaterial for biomedical applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 6446, no. 17, 2017.
- [25] X. Huang, X. Zheng, Z. Xu, and C. Yi, “ZnO-based nanocarriers for drug delivery application: From passive to smart strategies,” *Int. J. Pharm.*, vol. 534, no. 1–2, pp. 190–194, 2017.
- [26] S. Mitra *et al.*, “Porous ZnO nanorod for targeted delivery of doxorubicin: in vitro and in vivo response for therapeutic applications,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 45, p. 24145, 2012.
- [27] M. Zamani, M. Rostami, M. Aghajanzadeh, H. Kheiri Manjili, K. Rostamizadeh, and H. Danafar, “Mesoporous titanium dioxide@ zinc oxide–graphene oxide nanocarriers for colon-specific drug delivery,” *J. Mater. Sci.*, vol. 53, no. 3, pp. 1634–1645, 2018.
- [28] J. Wei, J. Hu, M. Li, and Y. Chen, “RSC Advances composite nano fibers encapsulated with mesoporous ZnO nanospheres for potential postsurgical cancer treatment †,” pp. 28011–28019, 2014.
- [29] F. Leone *et al.*, “A green organic-solvent-free route to prepare nanostructured zinc oxide carriers of clotrimazole for pharmaceutical applications,” *J. Clean. Prod.*, vol. 172, pp. 1433–1439, 2018.
- [30] M. Olbert, J. Gdula- Argasińska, G. Nowak, and T. Librowski, “Beneficial effect of nanoparticles over standard form of zinc oxide in enhancing the anti-inflammatory activity of ketoprofen in rats,” *Pharmacol. Reports*, vol. 69, no. 4, pp. 679–682, 2017.
- [31] J. Irvine, A. Afrose, and N. Islam, “Formulation and delivery strategies of ibuprofen: Challenges and opportunities,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–28, 2017.
- [32] P. I. Morgado, S. P. Miguel, I. J. Correia, and A. Aguiar-Ricardo, “Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 159, pp. 136–145, 2017.

- [33] M. Mohiti-Asli *et al.*, “Ibuprofen loaded PLA nanofibrous scaffolds increase proliferation of human skin cells in vitro and promote healing of full thickness incision wounds in vivo,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 105, no. 2, pp. 327–339, 2017.
- [34] P. Price, K. Fogh, C. Glynn, D. L. Krasner, J. Osterbrink, and R. G. Sibbald, “Why combine a foam dressing with ibuprofen for wound pain and moist wound healing?,” *Int. Wound J.*, vol. 4, no. SUPPL.1, pp. 1–3, 2007.
- [35] H. Li *et al.*, “Preparation, characterization, antibacterial properties, and hemostatic evaluation of ibuprofen-loaded chitosan/gelatin composite films,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 134, no. 42, pp. 1–9, 2017.
- [36] A. Naveed Ul Haq, A. Nadhman, I. Ullah, G. Mustafa, M. Yasinzai, and I. Khan, “Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles: The Dilemma of Ecotoxicity,” *J. Nanomater.*, vol. 2017, no. Table 1, 2017.
- [37] a. Kathalingam, N. Ambika, M. Kim, J. Elanchezhian, Y. Chae, and J. Rhee, “Chemical bath deposition and characterization of nanocrystalline ZnO thin films,” *Mater. Sci.*, vol. 28, no. 2, pp. 513–522, 2010.
- [38] K. Kakiuchi, E. Hosono, T. Kimura, H. Imai, and S. Fujihara, “Fabrication of mesoporous ZnO nanosheets from precursor templates grown in aqueous solutions,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 39, no. 1 SPEC. ISS., pp. 63–72, 2006.
- [39] R. M. Alwan *et al.*, “Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles via Sol – Gel Route and Their Characterization,” *Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–6, 2015.
- [40] P. Girotra, S. K. Singh, and K. Nagpal, “Supercritical fluid technology: a promising approach in pharmaceutical research,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 18, no. 1, pp. 22–38, 2013.
- [41] M. Herrero, A. Cifuentes, and E. Ibañez, “Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review,” *Food Chem.*, vol. 98, no. 1, pp. 136–148, 2006.
- [42] S. H. Alavi, S. S. H. Rizvi, and P. Harriott, “Process dynamics of starch-based microcellular foams produced by supercritical fluid extrusion . I : model development,” vol. 36, pp. 309–319, 2003.
- [43] I. Pasquali, R. Bettini, and F. Giordano, “Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 27, no. 4, pp. 299–310, 2006.
- [44] H. Peker, M. P. Srinivasan, J. M. Smith, and B. J. McCoy, “Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide,” *AIChE J.*, vol. 38, no. 5, pp. 761–770, 1992.
- [45] E. Reverchon and F. Senatore, “Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 7, no. 4, pp. 227–230, 1992.
- [46] C. Marrone, M. Poletto, E. Reverchon, and a. Stassi, “Almond oil extraction by supercritical CO₂: experiments and modelling,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 53, no. 21, pp. 3711–3718, 1998.
- [47] J. Lorenzen *et al.*, “Extraction of microalgae derived lipids with supercritical carbon dioxide in an industrial relevant pilot plant,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 40, no. 6,

- pp. 911–918, 2017.
- [48] S. B. Hawthorne and D. J. Miller, “Extraction and recovery of organic pollutants from environmental solids and tenax-gc using supercritical CO₂,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 24, no. 6, pp. 258–264, 1986.
- [49] S. Pump and A. Note, “Supercritical Fluid Applications in Manufacturing and Materials,” pp. 3–5.
- [50] D. L. Tomasko *et al.*, “A Review of CO₂ Applications in the Processing of Polymers,” pp. 6431–6456, 2003.
- [51] A. A. Barros *et al.*, “ScienceDirect Green solvents for enhanced impregnation processes in biomedicine,” *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 5, pp. 82–87, 2017.
- [52] 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.
- [53] L. Manna, M. Banchemo, D. Sola, A. Ferri, S. Ronchetti, and S. Sicardi, “Impregnation of PVP microparticles with ketoprofen in the presence of supercritical CO₂,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 42, no. 3 SPEC. ISS., pp. 378–384, 2007.
- [54] P. Alessi, I. Kikic, A. Cortesi, A. Fogar, and M. Moneghini, “Polydimethylsiloxanes in supercritical solvent impregnation (SSI) of polymers,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 27, no. 3, pp. 309–315, 2003.
- [55] M. Banchemo, S. Ronchetti, and L. Manna, “Characterization of Ketoprofen/Methyl- β -Cyclodextrin Complexes Prepared Using Supercritical Carbon Dioxide,” *J. Chem.*, vol. 2013, pp. 1–8, 2013.
- [56] E. N. Antonov, S. A. Minaeva, and V. K. Popov, “A Study of Ibuprofen Solubility in Supercritical Carbon Dioxide by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy,” *Russ. J. Phys. Chem.*, vol. 7, no. 7, pp. 849–853, 2013.
- [57] S. A. Shojaei, A. Z. Hezave, S. Aftab, M. Lashkarbolooki, and F. Esmaeilzadeh, “Solubility of gabapentin in supercritical carbon dioxide,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 78, no. 7, pp. 1–6, 2013.
- [58] M. Charoenchaitrakool, F. Dehghani, and N. R. Foster, “Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl-beta-cyclodextrin,” *Int. J. Pharm.*, vol. 239, pp. 103–112, 2002.
- [59] K. Hussein, M. Türk, and M. A. Wahl, “Comparative evaluation of ibuprofen/ β -cyclodextrin complexes obtained by supercritical carbon dioxide and other conventional methods,” *Pharm. Res.*, vol. 24, no. 3, pp. 585–592, 2007.
- [60] Y. A. Hussain and C. S. Grant, “Ibuprofen impregnation into submicron polymeric films in supercritical carbon dioxide,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 71, pp. 127–135, 2012.
- [61] D. Velasco, L. Benito, M. Fernández-Gutiérrez, J. San Román, and C. Elvira, “Preparation in supercritical CO₂ of porous poly(methyl methacrylate)-poly(l-lactic acid) (PMMA-PLA) scaffolds incorporating ibuprofen,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 54, no. 3, pp. 335–341, 2010.
- [62] M. Ni, Q.-Q. Xu, and J.-Z. Yin, “Preparation of controlled release nanodrug ibuprofen supported on mesoporous silica using supercritical carbon dioxide,” *J. Mater. Res.*, vol. 27, no. 22, pp. 2902–2910, 2012.

- [63] S. G. Kazarian and G. G. Martirosyan, "Spectroscopy of polymer / drug formulations processed with supercritical fluids : in situ ATR – IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP," vol. 232, pp. 81–90, 2002.
- [64] P. W. Labuschagne, S. G. Kazarian, and R. E. Sadiku, "Supercritical CO₂-assisted preparation of ibuprofen-loaded PEG-PVP complexes," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 57, no. 2, pp. 190–197, 2011.
- [65] K. Kakiuchi, E. Hosono, T. Kimura, H. Imai, and S. Fujihara, "Fabrication of mesoporous ZnO nanosheets from precursor templates grown in aqueous solutions," pp. 63–72, 2006.
- [66] N. Ueno, B. Dwijaya, Y. Uchida, Y. Egashira, and N. Nishiyama, "Synthesis of mesoporous ZnO, AZO, and BZO transparent conducting films using nonionic triblock copolymer as template," *Mater. Lett.*, vol. 100, pp. 111–114, 2013.
- [67] R. J. Ahern, J. P. Hanrahan, J. M. Tobin, K. B. Ryan, and A. M. Crean, "Comparison of fenofibrate-mesoporous silica drug-loading processes for enhanced drug delivery," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 50, no. 3–4, pp. 400–409, 2013.
- [68] A. Gignone, L. Manna, S. Ronchetti, M. Banchero, and B. Onida, "Incorporation of clotrimazole in Ordered Mesoporous Silica by supercritical CO₂," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 200, pp. 291–296, 2014.
- [69] 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," vol. 156, pp. 184–192, 2010.
- [70] Z. Pan, J. Tao, Y. Zhu, J. F. Huang, and M. Parans Paranthaman, "Spontaneous growth of ZnCO₃ nanowires on ZnO nanostructures in normal ambient environment: Unstable ZnO nanostructures," *Chem. Mater.*, vol. 22, no. 1, pp. 149–154, 2010.