

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 mesoporoso come carrier di
Ibuprofene**



Relatori

Prof.ssa Barbara Onida

Correlatori

Prof. Mauro Banchemo

Dr. Federica Leone

Candidato

Francesca Lopez

Luglio 2018

*A mamma e papà,
sempre forti anche nelle debolezze.*

Sommario

Acronimi	I
Introduzione	III
Capitolo 1	1
Ossido di Zinco: un promettente nanomateriale per applicazioni biomediche	1
1.1 Ossido di zinco: generalità e proprietà.....	1
1.2 Metodi di Sintesi di ZnO nanostrutturato	3
1.2.1 Metodi fisici	4
1.2.2 Metodi chimici.....	5
1.2.3 Metodi biologici.....	5
1.3 Applicazioni delle NPs di ZnO in ambito biomedico.....	6
1.3.1 Attività antitumorale	6
1.3.2 Attività antibatterica	7
1.3.3 Attività antidiabetica	8
1.3.4 Attività antifunginea.....	8
1.3.5 Attività anti-infiammatoria.....	8
1.3.6 Bioimaging	9
1.4 ZnO come carrier per il trasporto di farmaci.....	9
1.5 ZnO come sistema di veicolazione di farmaci per la pelle	10
1.5.1 ZnO per la cura delle ferite.....	10
Capitolo 2	13
Metodo innovativo per l'incorporazione di Ibuprofene in Ossido di Zinco: l'utilizzo di CO₂ supercritica	13
2.1 Introduzione	13
2.2 Anidride carbonica supercritica: le proprietà.....	13
2.2.1 Vantaggi e svantaggi della scCO ₂	15
2.3 Applicazioni industriali della scCO ₂	15
2.4 Impregnazione di farmaci attraverso scCO ₂	16
2.4.1 I vantaggi dell'impregnazione mediata da scCO ₂ rispetto ai metodi di impregnazione tradizionali.....	17
2.4.2 Amorfizzazione di farmaci	18
2.5 Influenza del tempo di contatto sull'efficienza di incorporazione.....	19
2.6 Ibuprofene: un farmaco modello	20
Capitolo 3	21
Materiali e metodi	21

3.1	Materiali	21
3.2	Sintesi dell'Ossido di Zinco mesoporoso	21
3.3	Incorporazione con CO ₂ supercritica	22
3.3.1	Studio degli effetti del processo con CO ₂ supercritica sull' Ossido di mesoporoso (Meso-ZnO)	23
3.4	Determinazione della quantità di farmaco incorporata	23
3.5	Metodi di caratterizzazione	24
3.5.1	Analisi di fisisorbimento di azoto	24
3.5.2	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	25
3.5.3	Diffrazione a raggi X	25
3.5.4	Spettroscopia Ultravioletto-Visibile	25
3.5.5	Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo	25
Capitolo 4	27
Risultati	27
4.1	Caratterizzazione dell'Ossido di Zinco mesoporoso	27
4.1.1	Analisi di fisisorbimento di Azoto	27
4.1.2	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	29
4.1.3	Diffrazione a Raggi X:	30
4.1.4	Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo	31
4.2	Caratterizzazione dell'Ibuprofene	32
4.2.1	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	32
4.2.2	Diffrazione a Raggi X	33
4.3	Caratterizzazione di Ibu @Meso-ZnO	34
4.3.1	Prova di incorporazione di 24 ore	34
4.3.1.1	Analisi di fisisorbimento di Azoto	34
4.3.1.2	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	36
4.3.1.3	Diffrazione a Raggi X	37
4.3.2	Prova di incorporazione di 8 ore	38
4.3.2.1	Analisi di fisisorbimento di Azoto	38
4.3.2.2	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	39
4.3.2.3	Diffrazione a Raggi X	41
4.3.2.3	Microscopia a Scansione elettronica a emissione di campo	42
4.3.3	Prova di incorporazione 3 ore	42
4.3.3.1	Analisi di fisisorbimento di Azoto	42
4.3.3.2	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	44
4.3.4	Confronto delle incorporazioni a 24, 8 e 3 ore	45

4.3.5	Trattamento dell'Ossido di Zinco con CO ₂ supercritica: il "bianco"	46
4.3.5.1	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	46
4.3.5.2	Diffrazione a raggi X.....	47
4.4	Quantificazione dell'Ibuprofene incorporato.....	47
4.4.1	Rette di taratura	47
4.4.2	Valutazione della " <i>Drug Loading Capacity</i> "	50
4.5	Confronto degli spettri XRD delle tre incorporazioni	51
4.6	Valutazione del grado di ricoprimento.....	52
4.6.1	Determinazione del numero di molecole per unità di superficie e di volume.....	52
4.6.2	Organizzazione del farmaco sulla superficie	53
4.6.3	Organizzazione del farmaco all'interno del volume del carrier	53
	Conclusioni	55
	Bibliografia	57
	Ringraziamenti	61

Acronimi

Ossido di Zinco	ZnO
Nanoparticelle di ossido di zinco	NPs ZnO
Ossido di Zinco mesoporoso	Meso-ZnO
Ibuprofene	Ibu
Etanolo	EtOH
Tampone fosfato salino	PBS
Anidride carbonica supercritica	scCO ₂
Ibuprofene incorporato tramite scCO ₂	Ibu@Meso-ZnO
Ibuprofene incorporato tramite scCO ₂ -24h	Ibu@Meso-ZnO-24h
Ibuprofene incorporato tramite scCO ₂ -8h	Ibu@Meso-ZnO-8h
Ibuprofene incorporato tramite scCO ₂ -3h	Ibu@Meso-ZnO-3h
Ossido di Zinco mesoporoso trattato tramite scCO ₂	Meso-ZnO_scCO ₂
Diffrazione a raggi X	XRD
Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	FT-IR
Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo	FESEM

Introduzione

Negli ultimi decenni, le nanoparticelle a base di ossidi inorganici sono state ampiamente studiate per la loro applicazione in ambito biomedicale. Alcuni ossidi metallici risultano interessanti non solo per le loro proprietà chimico-fisiche, ma anche per la loro stabilità, non tossicità e per le loro proprietà intrinseche [1]. Tra questi materiali, l'ossido di zinco è stato studiato maggiormente, grazie alle sue proprietà chimico-fisiche uniche. Infatti, la "Food and Drug Administration" (FDA) ha riconosciuto l'Ossido di Zinco come una sostanza sicura (GRAS), grazie alla sua bassa tossicità, biocompatibilità e biodegradabilità [2]. Di conseguenza, i materiali a base di Ossido di Zinco sono utilizzati enormemente anche in campo biomedico.

L'ossido di zinco è un materiale versatile perché può essere ottenuto con diverse procedure di sintesi e diverse morfologie, è biocompatibile, non tossico ed economicamente vantaggioso. Queste caratteristiche permettono che l'ossido di zinco mesoporoso con elevata area superficiale sia utilizzato come sistema per il rilascio di farmaci.

In questo contesto si inserisce il lavoro di tesi. L'obiettivo della tesi è lo studio di un sistema per la veicolazione e il rilascio di un farmaco in ambito topico. In particolare, è stato scelto l'ossido di zinco mesoporoso come carrier di ibuprofene. L'aspetto innovativo consiste nella combinazione delle proprietà antibatteriche dell'ossido di zinco e delle proprietà antinfiammatorie dell'ibuprofene, al fine di ottenere un sistema nuovo, di possibile utilizzo nella cura delle ferite.

Lo scopo del lavoro è quello di investigare il processo, osservando gli effetti della variabile tempo sull'efficienza di incorporazione. Infatti, sono state eseguite tre prove di incorporazione con durata differente (24 h, 8 h e 3 h), al fine di osservare se esistesse una correlazione tra il tempo di contatto farmaco-materiale e il *drug loading*.

Infine, è stata studiata la reattività dell'ossido di zinco mesoporoso con la $scCO_2$ nelle condizioni di incorporazione di ibuprofene.

Questo elaborato si articola in quattro capitoli. Il capitolo uno è focalizzato sulle proprietà dell'ossido di zinco, sulle sue applicazioni in ambito biomedicale e sui differenti metodi per la sua sintesi. Inoltre, è stata focalizzata l'attenzione su ossido zinco come sistema per il rilascio di farmaci in ambito topico.

Il secondo capitolo ha rivolto l'attenzione al metodo di incorporazione del farmaco mediante anidride carbonica supercritica, presentando vantaggi e svantaggi della $scCO_2$ e le sue applicazioni industriali.

Nel terzo capitolo inizia la parte sperimentale. In esso vengono descritte tutte le prove che sono state effettuate: la sintesi dell'ossido di zinco, l'incorporazione del farmaco e la sua quantificazione.

Il quarto capitolo presenta i risultati ottenuti dalle prove effettuate, discutendo le evidenze sperimentali che mostrano i grafici illustrati.

Capitolo 1

Ossido di Zinco: un promettente nanomateriale per applicazioni biomediche

1.1 Ossido di zinco: generalità e proprietà

Negli ultimi decenni, le nanotecnologie sono emerse come una promettente strategia tecnologica per diverse applicazioni, fornendo innumerevoli soluzioni nel campo della biomedicina, scienza dei materiali, ottica ed elettronica. L'osservazione e la manipolazione di materiali su nanoscala è diventata possibile dal 1931, quando Knoll e Ruska inventarono il microscopio elettronico, e ancor di più dal 1959, quando ci fu la famosa conferenza di Richard P. Feynman (*There's Plenty of Room at the Bottom*) [3].

Le nanotecnologie trovano applicazione praticamente in tutti i settori produttivi e il settore biomedico ne rappresenta uno dei maggiormente coinvolti. Infatti, in questo contesto è collocata la formulazione di nuovi sistemi per la somministrazione di farmaci. Tra i materiali attualmente disponibili, le nanoparticelle sono state esplorate come agenti biomedicali, ma anche come carriers per il trasporto controllato di agenti terapeutici per una varietà di disturbi [2]. Dal confronto con i materiali di bulk, esse sono caratterizzate da eccellenti proprietà ottiche, magnetiche, elettriche e chimiche. Inoltre, risultano interessanti grazie ai miglioramenti relativi alla loro dimensione, ma anche alla loro struttura innovativa, che presenta un'evoluzione riguardo la distribuzione e la morfologia rispetto ai precursori molecolari. Infatti, esse vengono sintetizzate con un elevato rapporto superficie-volume e con morfologie che possono essere facilmente funzionalizzate con gruppi chimici per nuove applicazioni. Uno dei nanomateriali più interessanti e promettenti è l'Ossido di Zinco, le cui proprietà lo hanno reso un eccellente sistema di *drug delivery*.

L'Ossido di Zinco, con le sue proprietà fisiche e chimiche uniche, tra cui la sua elevata stabilità chimica, alto coefficiente di accoppiamento elettrochimico, ampio raggio di assorbimento di radiazione e alta fotostabilità, è un materiale multifunzionale. In ambito scientifico, l'Ossido di Zinco è classificato come un semiconduttore di tipo wurtzite (nel gruppo II-VI) e un materiale piezoelettrico. Esso è caratterizzato, inoltre, da elevata energia (3.37 eV), alta energia di legame ed elevata stabilità termica e meccanica a temperatura ambiente; tutte queste proprietà lo rendono attrattivo per essere usato anche in tecnologia elettronica, optoelettronica e laser [4].

ZnO esibisce tre strutture cristalline, denominate *wurtzite*, zinco-blenda e sale di roccia, mostrate nella figura 1.1 [5]. La struttura termodinamicamente più stabile in condizioni ambientali è la *wurtzite*, che possiede una struttura esagonale, caratterizzata dai seguenti parametri reticolari: $a = 0,325$ nm e $c = 0,521$ nm, per cui il rapporto c/a è molto prossimo al valore ideale caratteristico di una cella esagonale, ovvero $c/a = 1,633$. La struttura presenta una disposizione tetraedrica in cui ogni atomo di Zinco è circondato da quattro atomi di Ossigeno e viceversa [6]. Questa struttura è solitamente illustrata schematicamente come un numero di piani alternati, costituiti da ioni Zn e O impilati accanto l'asse c. Invece, la struttura zinco-blenda è metastabile e può essere resa stabile mediante apposite tecniche di crescita.

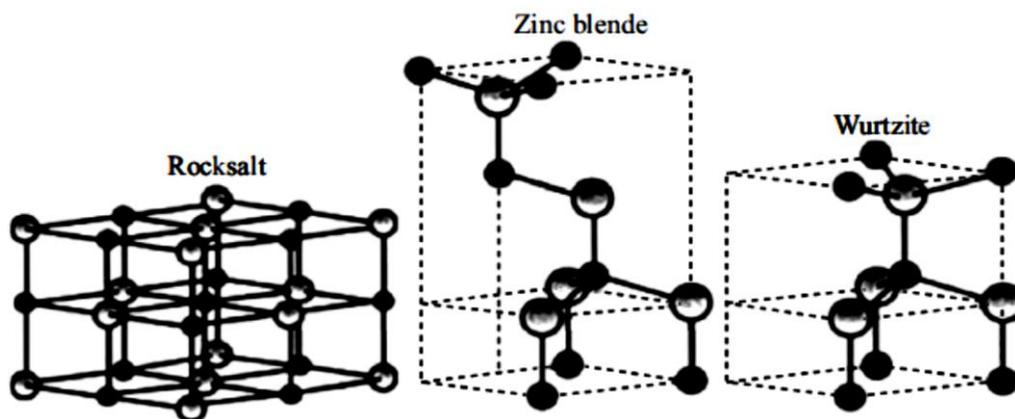


Figura 1.1 Strutture cristalline di ZnO [5]

L'esistenza delle innumerevoli nanostrutture di ZnO disponibili consente la sua applicazione nell'ambito delle nanotecnologie. Infatti, confrontandolo con i materiali di bulk, ZnO nanostrutturato è caratterizzato da proprietà innovative che possono essere sfruttate in ambiente industriale per la realizzazione di biosensori, semiconduttori, dispositivi piezoelettrici, display ad emissione di campo, degradazione fotocatalitica di inquinanti, trattamenti antimicrobici, materiali che bloccano i raggi UV in ambito cosmetico [7]. Applicazioni relative ai nanomateriali a base di ZnO vengono riassunte nella Tabella 1.1.

Tabella 1.1 Applicazioni delle nanoparticelle di ZnO [3], immagine modificata

Campi di applicazione	Esempio
Biologia e Medicina	Bioimaging Rilascio di farmaci Attività antitumorale e antimicrobica
Industria cosmetica	Filtri UV nelle protezioni solari Cosmetici minerali
Produzione e materiali	Confezionamento antimicrobico di alimenti Protezione dall'esposizione ai raggi UV Tessuti antimicrobici
Energia ed elettronica	Sensori chimici basati su ossido di zinco Celle solari a basso costo Sensori nanogeneratori

Le nanostrutture di ZnO possono essere classificate in strutture con una, due o tre dimensioni. Le strutture monodimensionali rappresentano il gruppo più allargato, comprendente per esempio *nanorods*, *nanohelices*, *nanospring*, *nanorings* ecc.. Le strutture bidimensionali sono ad esempio *nanoplate* o *nanopellets*, invece tra le strutture tridimensionali, ovviamente di maggior ingombro, sono situati i *nanoflowers*, *nanomesosphere* e *nanourchins*.

1.2 Metodi di Sintesi di ZnO nanostrutturato

Ci sono due differenti strategie utilizzate per sintetizzare i nanomateriali: l'approccio *bottom-up* e l'approccio *top-down*. Il primo utilizza atomi e molecole per creare nanostrutture che possono essere ottenute da sintesi chimica, metodi biologici o metodo di deposizione e crescita controllate. Al contrario, l'approccio *top-down* si riferisce al taglio di materiale di bulk per ottenere nanoparticelle. Entrambi i metodi sono utilizzati per preparare nanostrutture su scala industriale. Ciascun approccio presenta i propri vantaggi e svantaggi: per esempio le tecniche *top-down* possono causare gravi danni alla struttura cristallina dei nanomateriali, che influisce direttamente sulle loro proprietà fisico-chimiche [3]. Oltre alla conoscenza dei metodi di sintesi, una nuova sfida è quella di trovare un metodo che permetta di controllare la forma e la dimensione delle nanostrutture. Questi parametri influenzano le proprietà ottiche delle NPs, perciò è fondamentale scegliere il metodo di sintesi più appropriato. Inoltre, è preferibile scegliere il metodo più semplice, più economico, più efficiente e il più ecologico (chiamato *Green chemistry*). ZnO è stato al centro dell'attenzione in un'ampia gamma di campi di ricerca e, di conseguenza, è stato sviluppato un numero crescente di metodi di sintesi. Le nanoparticelle metalliche dovrebbero avere una dimensione specifica e la loro forma e il livello di aggregazione dovrebbe essere il più piccolo possibile. Poiché il percorso di sintesi determina le proprietà del materiale appena menzionate, la scelta del metodo di preparazione è veramente importante nel design delle NPs di ZnO per un'applicazione specifica. Negli ultimi decenni, differenti approcci sono stati utilizzati per preparare ZnO nanostrutturato con differenti morfologie. Tutti questi metodi possono essere distinti in tre gruppi principali: metodi fisici, chimici e biologici. (Figura 1.2)

Methods of Zn/ZnO NPs synthesis

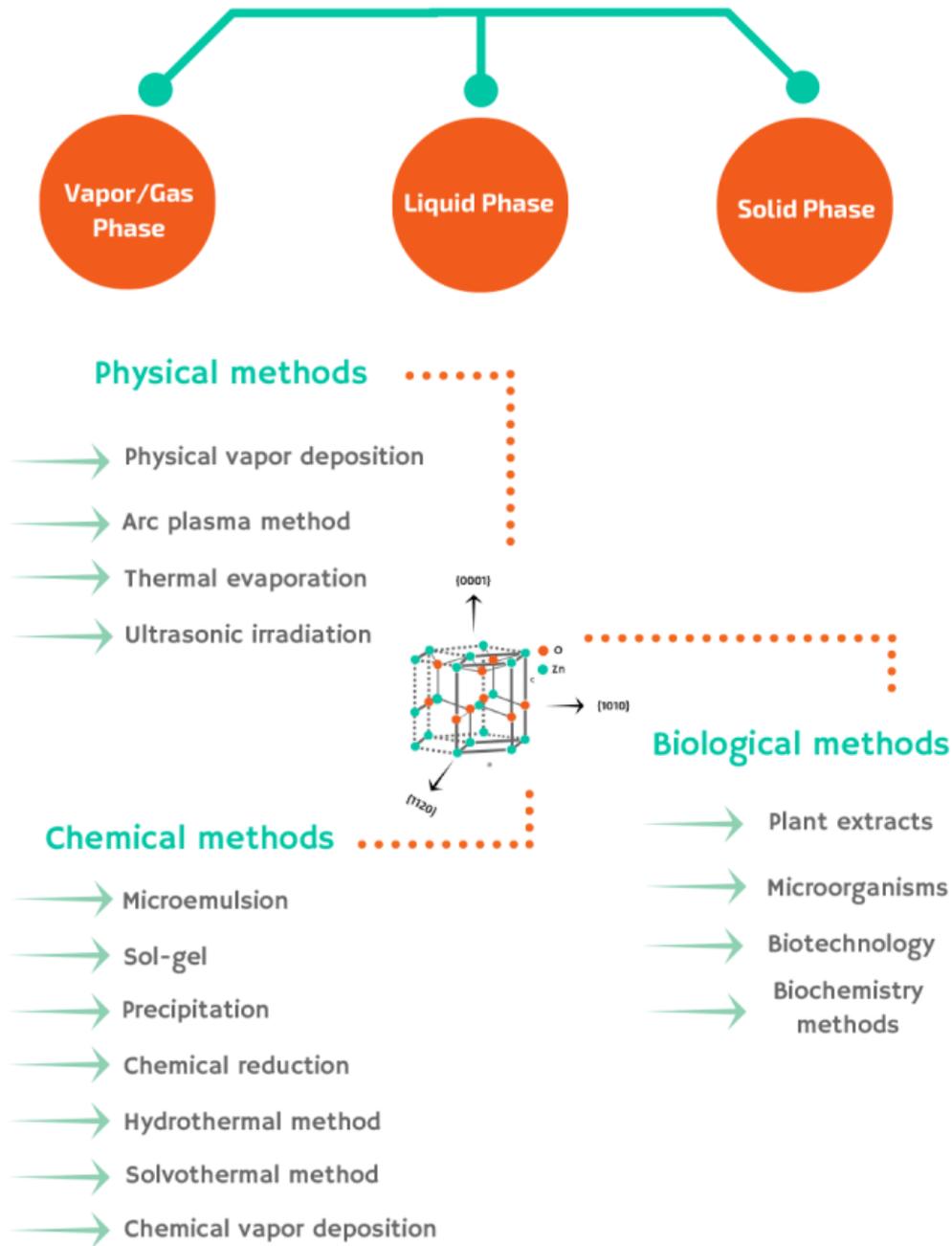


Figura 1.2 Metodi di sintesi delle nanoparticelle di ZnO [3]

1.2.1 Metodi fisici

I metodi fisici sono solitamente usati per i processi industriali. Tra i metodi fisici per la sintesi di NPs ZnO è situato il metodo di deposizione fisica del vapore, evaporazione termica, irradiazione ultrasonica o ablazione laser. Quest'ultimo processo è un metodo noto grazie alla sua capacità di offrire differenti vantaggi, quali la semplicità della tecnica e la purezza chimica.

L'efficienza della sintesi e le caratteristiche delle NPs ZnO dipendono da molti parametri del processo, tra cui il tempo di ablazione e la lunghezza d'onda del laser [3].

1.2.2 Metodi chimici

I metodi chimici utilizzati per la sintesi di nanomateriali sono classificati in base allo stato fisico, ovvero fase solida, fase liquida (i cosiddetti metodi chimici bagnati) o fase vapore.

Sintesi in fase liquida

I metodi di precipitazione e coprecipitazione sono basati sulla reazione di un agente riducente (ad esempio alcali inorganici) con un sale di Zinco. Il prodotto tipicamente consiste in un precipitato solubile o insolubile che viene lavato e calcinato al fine di ottenere le nanoparticelle con la morfologia e le caratteristiche desiderate.

Le tecniche sol-gel appartengono all'approccio della chimica colloidale. I *sols* sono soluzioni colloidali che consistono in nanoparticelle solide sospese in una fase liquida, mentre i *gels* sono per lo più formati mediante metodi di policondensazione seguiti da una fase di invecchiamento, atta a raggiungere le fasi di trasformazione e maturazione di Ostwald. I *gels* sono disidratati ad alta temperatura e, infine, addensati per ottenere nanoparticelle di Ossido di metallo. Il metodo sol-gel assicura l'ottenimento della purezza e l'uniformità dell'ZnO nanostrutturato [8]. Nei processi termali, i precursori sono dissolti in solventi caldi o in acqua in condizioni di medio-alta pressione (da 1 a 10000 atm) e medio-alta temperatura (da 100 a 1000 °C). Questi processi sono usati per sintetizzare differenti nanostrutture di Zinco come films sottili, polveri, sfere ecc..

I metodi sopra menzionati offrono innumerevoli vantaggi, quali semplicità, basso costo e condizioni operative modeste, che li rendono particolarmente adatti per la sintesi di ZnO nanostrutturato per applicazioni biomediche, così come la sintesi di sistemi basati su ZnO utili per il *drug delivery*.

Sintesi in fase gas

Nel metodo di spray-pirolisi, un precursore del sale di Zinco è formulato in goccioline di aerosol mediante una fiamma di riscaldamento. Le goccioline sono disperse nel gas, determinando una riduzione delle loro dimensioni.

I metodi di condensazione dei gas inerti sono divisi in deposizione fisica del vapore (senza interazione catalitica) e deposizione chimica del vapore (con interazione catalitica). Sostanzialmente, queste tecniche includono l'evaporazione di una fonte di Zinco all'interno di una camera mediante calore resistivo. Poi, i vapori sono costretti a migrare in una camera di raffreddamento riempita con gas inerte, da cui sono raccolti per un ulteriore consolidamento.

1.2.3 Metodi biologici

La tendenza emergente di sviluppare nuovi metodi di sintesi *green*, più eco-compatibili e sostenibili, ha coinvolto sempre di più il campo degli ossidi metallici, tra cui l'Ossido di Zinco. Il metodo di sintesi *green* di ZnO ha attirato molta attenzione grazie alla possibilità di utilizzare un ridotto numero di prodotti chimici, risultando un processo più efficiente dal punto vista dei costi ed energetico. È possibile classificare i metodi di sintesi biologici in metodi mediati da piante e metodi mediati da microrganismi. Nel primo caso citato, il meccanismo è dipendente dai metaboliti secondari della pianta, che giocano un ruolo fondamentale come agenti riducenti per la conversione dei sali metallici (precursori) in metallo o nanoparticelle di ossido di metallo. Nel secondo caso, i microrganismi sono abili a trasformare ioni in metallo o in nanoparticelle di ossido di metallo attraverso enzimi generati dall'attività delle cellule.

1.3 Applicazioni delle NPs di ZnO in ambito biomedico

Le nanoparticelle di Ossido di Zinco (d'ora in poi denominate NPs ZnO) sono state ampiamente studiate per varie applicazioni biomediche, grazie alle loro proprietà anti-cancro, anti-diabetiche, antibatteriche, antifunginee e anti-infiammatorie, e per applicazioni di *drug delivery* (Fig. 1.3).

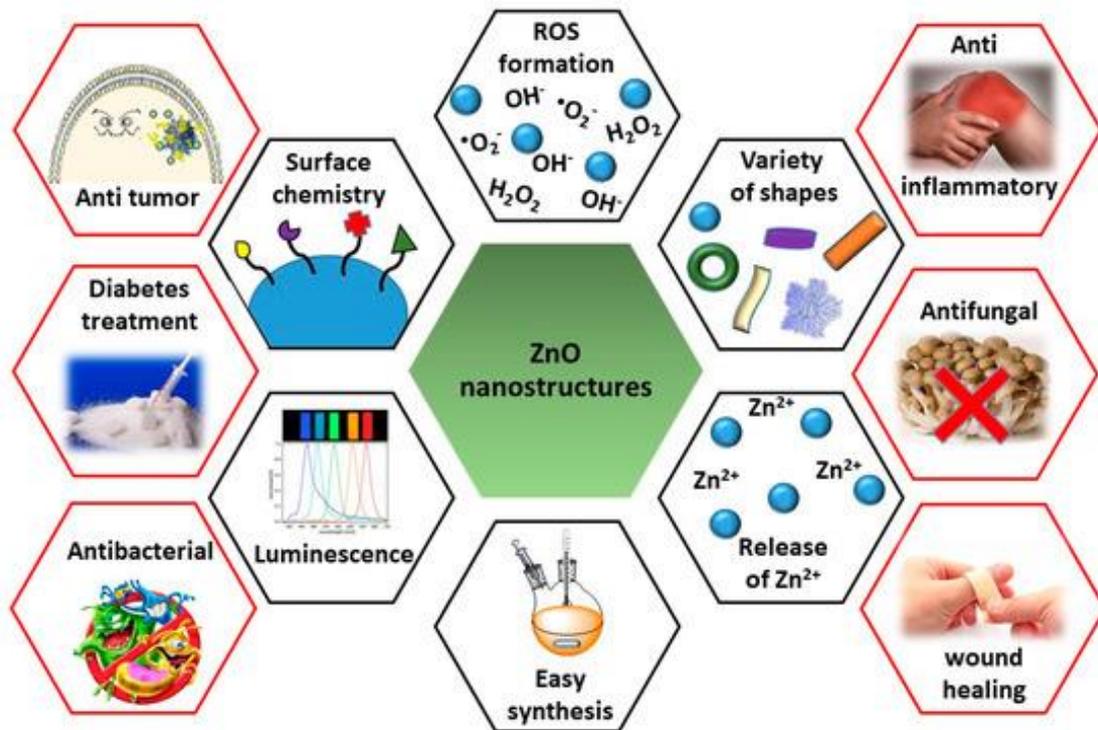


Figura 1.3 Diagramma riassuntivo delle principali caratteristiche delle nanostrutture di ZnO (esagoni neri) e le loro principali applicazioni in biomedicina (esagoni rossi) [9]

1.3.1 Attività antitumorale

Nell'ambito della biomedicina, è stata esplorata l'applicazione delle NPs ZnO contro il cancro. Esse esibiscono la loro attività antitumorale mediante la generazione di specie ROS e inducendo l'apoptosi delle cellule. In aggiunta, un'altra loro proprietà interessante che può essere utilizzata per l'attività anti-cancro è rappresentata dalla loro proprietà elettrostatica. Infatti, le NPs ZnO presentano un diverso comportamento da parte della carica superficiale, a causa dei gruppi ossidrilici chemisorbiti sulla loro superficie. I protoni (H^+) si muovono dalla superficie della particella in un mezzo acquoso a pH elevato, lasciando una superficie caricata negativamente con atomi di Ossigeno parzialmente legati (ZnO^-). A basso pH, i protoni vengono trasferiti dall'ambiente acquoso alla superficie della particella, determinando una superficie carica positivamente (ZnOH_2^+). Il punto isoelettrico delle NPs ZnO è 9-10; quindi, in condizioni fisiologiche, queste nanoparticelle trasportano una forte carica positiva. Al contrario, le cellule tumorali contengono un'alta concentrazione di fosfolipidi anionici sulle loro membrane esterne e possiedono potenziali di membrana negativi. Quindi, l'interazione delle cellule tumorali con le NPs ZnO caricate positivamente è guidata da interazioni elettrostatiche, promuovendo l'assorbimento cellulare, la fagocitosi e la citotossicità di queste NPs (Figura 1.4) [2].

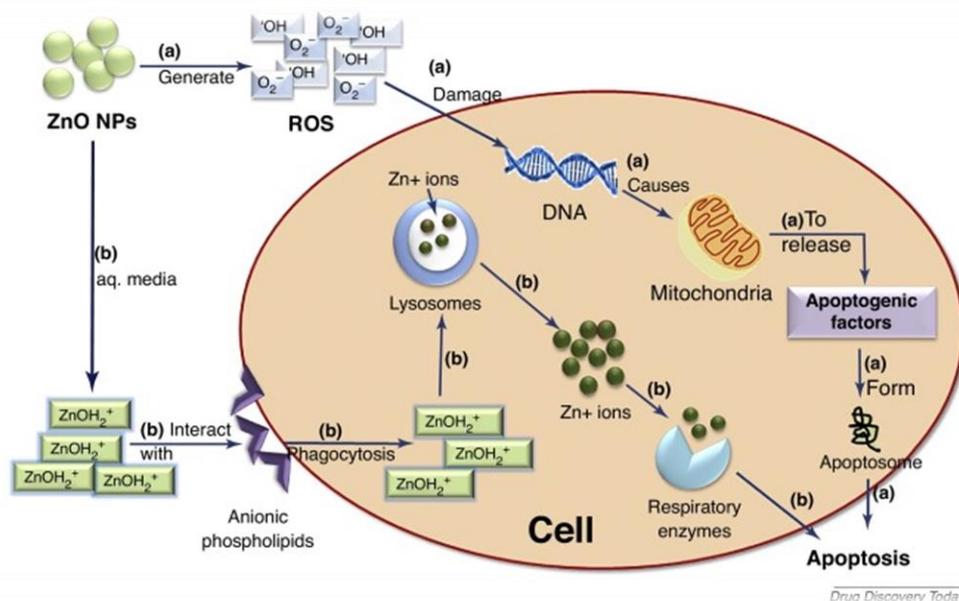


Figura 1.4 Meccanismo di azione delle NPs di ZnO [2]

Queste proprietà dell'ZnO lo rendono un buon candidato come agente autonomo o come agente sinergico con altri chemioterapici. Inoltre, le NPs ZnO sono state esplorate anche per la veicolazione di farmaci, al fine di avere un miglior assorbimento cellulare e una attività sinergica. Negli anni sono state intraprese delle modifiche superficiali delle NPs ZnO al fine di migliorare ulteriormente la loro stabilità e aumentare la loro selettività. Gli studi di ricerca hanno dimostrato che la modifica della superficie usando PEG, Triton X-100 o acido ialuronico non pregiudica l'azione antitumorale delle NPs, anzi migliora ulteriormente la loro sicurezza per le cellule normali grazie al loro rivestimento biocompatibile. Le NPs ZnO sono state testate anche in combinazione con doxorubicina (DOX), cisplatino (CPT) e paclitaxel (PTX). Diversi studi hanno dimostrato che la citotossicità di questi agenti chemioterapici è aumentata significativamente quando essi sono combinati con le NPs ZnO.

Viste le proprietà antitumorali intrinseche, i ricercatori hanno utilizzato le NPs ZnO per il trasporto di farmaci. È stato ipotizzato che l'attività terapeutica degli agenti chemioterapici potrebbe aumentare incorporando i farmaci nelle nanoparticelle. I risultati hanno rivelato che l'incorporazione con DOX e PTX ha mostrato tossicità più elevata rispetto ai singoli agenti. Per aumentare ulteriormente l'identificabilità e la selettività per cellule tumorali, la superficie delle NPs ZnO è stata decorata con "bersagli mirati", tra cui l'acido folico, al fine di indirizzare i recettori sulle membrane delle cellule tumorali [2].

1.3.2 Attività antibatterica

L'attività antibatterica delle NPs ZnO risiede anche nella loro abilità ad indurre stress ossidativo. Gli ioni Zn^{2+} , rilasciati da ZnO, interagiscono con il gruppo tiolico degli enzimi respiratori, inibendo la loro azione. È stato dimostrato che le NPs ZnO influenzano la membrana cellulare e portano alla formazione di ROS. Quindi, quando le cellule batteriche vengono in contatto con le NPs ZnO, esse assorbono gli ioni Zn^{2+} , che poi inibiscono l'azione degli enzimi respiratori, generano ROS e producono radicali liberi, causando stress ossidativo. I ROS danneggiano irreversibilmente le membrane batteriche, il DNA e i mitocondri, determinando la morte delle cellule [2].

La risposta antibatterica è significativamente affetta da diversi parametri, tra cui la morfologia, dimensione e concentrazione delle nanostrutture di ZnO [5]. L'attività dipendente dalla forma è spiegata in termini di percentuale di facce attive nelle nanoparticelle, che conducono ad un'attività antibatterica potenziata. La dimensione e la concentrazione delle nanostrutture di ZnO giocano un ruolo chiave nell'attività antibatterica. Un'area superficiale elevata e un'alta concentrazione determinano una risposta battericida elevata. Le NPs ZnO con dimensioni piccole sono state segnalate come NPs più attive contro i batteri, grazie all'elevata superficie specifica esposta.

1.3.3 Attività antidiabetica

L'attività antidiabetica delle NPs ZnO è stata esplorata sulla base del fatto che lo Zinco ha un importante ruolo nella sintesi dell'insulina, nella sua conservazione e secrezione. In uno studio recente, l'attività antidiabetica delle NPs ZnO è stata investigata in topi diabetici e comparata con quella di ZnSO₄. I risultati ottenuti hanno mostrato un'attività antidiabetica delle NPs più elevata rispetto a ZnSO₄. Wahba e colleghi hanno scoperto che le NPs ZnO hanno contribuito al miglioramento del danno del pancreas indotto dal diabete, come dimostrato dal progresso strutturale e ultrastrutturale e confermato dalla normalizzazione biochimica della glicemia e dell'insulina sierica. In altri studi, le NPs ZnO sono state testate in combinazione con i farmaci antidiabetici, sandalo rosso e vildagliptin, per potenziare la loro efficienza [2].

1.3.4 Attività antifungina

Il potere antimicrobico dell'ZnO non è solo limitato ai batteri ma anche ad altri tipi di microrganismi come i funghi. Il vantaggio di questo materiale è che la sua efficacia può essere applicata per il trattamento di differenti problemi causati dai microrganismi come infezioni, malattie, biocontaminazione e corrosione. L'effetto antifungino delle NPs ZnO è stato dimostrato anche contro patogeni vegetali [9].

Differenti gruppi hanno riportato l'efficacia antifungina delle NPs ZnO contro i microrganismi patogeni. Ad esempio, Surendra e colleghi hanno preparato NPs ZnO da *M. oleifera*, dimostrando la tossicità contro due specie patogene. Gunalan e colleghi, invece, hanno studiato l'attività antifungina delle NPs ZnO in differenti tipi di funghi [2].

1.3.5 Attività anti-infiammatoria

Gli effetti benefici dell'ZnO sono noti da diverso tempo e le sue proprietà hanno permesso l'applicazione per scopi terapeutici, tra cui l'efficacia anti-infiammatoria contro dermatosi e ferite di ulcere. [9] Date le sue proprietà anti-infiammatorie, Ilves e colleghi hanno comparato l'efficacia delle NPs ZnO e dell'ZnO di bulk, trovando che solo le NPs erano abili a penetrare gli strati profondi della pelle. Le NPs ZnO erano abili anche a sopprimere meglio l'infiammazione locale della pelle e ad indurre la produzione sistemica degli anticorpi IgE. Gli autori suggerirono che questo effetto è il risultato di reazioni non specifiche causate dal rilascio di ioni Zn²⁺ che influenzano l'abilità delle cellule B di produrre gli IgE [2].

1.3.6 Bioimaging

Le nanostrutture di ZnO, in particolare nella forma di Punti Quantici, risultano essere i candidati adatti per le applicazioni di *bioimaging*, ad esempio l'analisi di cellule vive e il monitoraggio in tempo reale dei tessuti. La possibilità di utilizzare questo nanomateriale nel *bioimaging* deriva dalle sue proprietà, migliorate negli anni rispetto a quelle possedute da coloranti organici tradizionali. Queste caratteristiche innovative includono l'attività fotoluminescente, tra cui l'assorbimento di banda larga, una banda di emissione stretta e simmetrica, alta stabilità contro fotobleaching e la sua natura di semiconduttore [10]. Inoltre, i Punti Quantici di ZnO sono caratterizzati da eccellente biocompatibilità, buona biodegradabilità, basso costo e compatibilità ambientale [11].

1.4 ZnO come carrier per il trasporto di farmaci

I nanomateriali multifunzionali sono stati utilizzati nella diagnosi del cancro e nelle applicazioni terapeutiche rispetto al trattamento chemioterapico che presenta effetti collaterali negativi. Un nanomateriale *smart* capace di esibire alta capacità di *drug loading*, rilascio di farmaci reattivi al pH, che non ha un rilascio prematuro e che è ovviamente a basso costo, è altamente desiderabile per applicazioni terapeutiche. Pertanto, i nanomateriali porosi con alta superficie specifica, alta porosità e bassa densità sono privilegiati nell'applicazione di *drug delivery*.

I materiali mesoporosi sono stati sviluppati circa dall'anno 2000, dopo il successo che ebbero nel campo le silici MCM-41 e SBA-15 [12].

Sebbene l'ZnO sia stato un materiale su cui è stato investigato moltissimo, la sua applicazione come sistema di *drug delivery* ha iniziato ad attrarre molta attenzione solo nell'ultimo decennio. In particolare, negli ultimi anni, molti lavori di ricerca sono stati dedicati allo sviluppo di materiali basati sull'Ossido di Zinco come carrier di farmaci grazie alle sue caratteristiche, tra cui la biocompatibilità. In precedenza Ostrovsky e colleghi hanno affrontato la distruzione selettiva delle cellule tumorali mediante l'utilizzo delle NPs ZnO; Zhang e colleghi hanno dimostrato un trattamento contro il cancro mediante NPs caricate con daunorubicina per mezzo di una terapia fotodinamica. Comunque, la mancanza di un'adeguata specificità per le cellule tumorali limita le loro applicazioni perché la non-specificità potrebbe distruggere anche le cellule normali. Barick e colleghi hanno riportato l'alta efficienza di *drug loading* di Meso-ZnO tridimensionale, che può essere efficace nei *drug delivery systems*.

Da un'attenta analisi di letteratura, è emerso che ZnO potrebbe essere classificato principalmente in due categorie: carrier ZnO puro e carrier ZnO composito.

Nel primo caso, alta area superficiale, volume dei pori significativo e distribuzione dei pori influenzano la capacità del carrier di incorporare le molecole di farmaco e di rilasciarle in un secondo momento.

Negli ultimi 5 anni, una nuova branca della ricerca correlata all'uso di materiali basati sull'ZnO come sistema per il *drug delivery* è stata impegnata nello sviluppo di *carriers* atti alla veicolazione di farmaci. Essa consiste nello sviluppo di carriers atti alla veicolazione di farmaci basati sulla combinazione di ZnO e altri materiali, come i polimeri, al fine di migliorare le proprietà complessive del sistema. Ad esempio, Zhao e collaboratori hanno proposto nanoparticelle a base di ZnO- polimero per il rilascio di molecole anticancro [11].

1.5 ZnO come sistema di veicolazione di farmaci per la pelle

Mediante un'indagine in letteratura, è emerso che sono presenti pochi studi dedicati alla valutazione di ZnO come materiale utilizzato per il rilascio di farmaci sulla pelle. Durante una conferenza in Giappone nel 2017, Markus e colleghi hanno presentato un lavoro di ricerca focalizzato sullo sviluppo di un carrier di farmaci per applicazioni topiche composto da ZnO nanocomposito funzionalizzato con acido ialuronico e carbossimetil chitosano. Il sistema risultante è stato ampiamente caratterizzato, risultando un promettente carrier per il rilascio a livello topico di sostanze attive per il trattamento dei disturbi della pelle e per prevenire i cancri della pelle.

Lo studio di ricerca di Huang e colleghi è l'unico esempio dell'utilizzo delle NPs ZnO come carrier di farmaci sulla pelle. A tal proposito, è stato sviluppato un sistema di rilascio di farmaco UV per la protezione della pelle, basato su NPs ZnO come carrier per il benzofenone-3, una molecola di assorbimento dei raggi UV. Le dimensioni delle particelle di ZnO risultavano essere 30-40 nm ed erano assemblate in aggregati più grandi, tra 500 nm e 1400 nm. L'efficienza di incapsulamento e la capacità di incorporazione del benzofenone-3 furono rispettivamente 53,68 % e 133,61%. Il benzofenone-3 era rilasciato quasi completamente dal carrier, sotto due ore di raggi UV.

Nayak e colleghi hanno sviluppato dei *nanorods* di ZnO per un rilascio di farmaco non distruttivo sulla pelle, al fine di accrescere la penetrazione di Albumina-Fluoresceina-Isotiocianato (FITC) attraverso la pelle. I *nanorods* di ZnO (di lunghezza 30-35 μm e diametro 200-300 nm) hanno facilitato con successo la penetrazione di FITC mediante la pelle, attraverso i canali formati dai *nanorods*. Questo lavoro è un chiaro esempio di rilascio di farmaco non invasivo e indolore raggiunto attraverso le nanostrutture a base di ZnO [13].

1.5.1 ZnO per la cura delle ferite

Per quel che concerne le applicazioni dell'ZnO sulla pelle, una nascente e interessante applicazione consiste nell'utilizzo di ZnO nella cura delle ferite. Una ferita è definita come un'interruzione della continuità del tessuto epiteliale della pelle, risultante da un danno fisico o termico [14]. Una ferita è generalmente considerata acuta o cronica in base alla durata. Una lesione cutanea acuta generalmente guarisce in un tempo fisso e prevedibile (8-12 settimane) che dipende dall'estensione del danno apportata agli strati della pelle. Al contrario, una ferita cronica è una lesione che non può guarire in un tempo prefissato.

Oggi, molti ricercatori hanno focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di sistemi atti alla cura delle ferite, abili ad interagire con la sezione della cute ferita, promuovendo la sua guarigione. Un materiale adatto per la cura delle ferite dovrebbe possedere proprietà antimicrobiche, dovrebbe essere biodegradabile, biocompatibile, non tossico e non allergenico. Inoltre, una medicazione ideale dovrebbe essere in grado di preservare un ambiente umido sulla superficie della ferita per permettere lo scambio gassoso, difendere la ferita contro i microrganismi, assorbire gli eccessi di sudorazione evitando la macerazione e ridurre la formazione di cicatrici. Tra i differenti tipi di materiali per la cura delle ferite, sintetici e polimeri naturali, alginato, chitina e chitosano sono i maggiori investigati [10]. Durante il processo della cura delle ferite, la possibilità che possano insorgere delle infezioni è il pericolo più grande, perché determina conseguenze negative. Inoltre, i microrganismi possono ricercare i tessuti più profondi attraverso la ferita sulla pelle, causando infezioni interne. Per esempio, *S.aureus* e *E. coli* sono noti per la peculiarità di provocare infezioni.

I materiali bionanocompositi rappresentano un gruppo emergente di materiali che risultano dalla combinazione di biopolimeri con componenti inorganici. In particolare, l'aggiunta delle nanostrutture di ZnO nella matrice polimerica è stata studiata al fine di impartire nuove

funzionalità, come l'attività antibatterica. Inoltre, è stato dimostrato che ZnO applicato per uso topico funge da risorsa di ioni Zinco e ciò potrebbe migliorare la cura delle ferite. Infatti, lo Zinco è un elemento essenziale nel corpo umano. Tra le diverse funzionalità possedute, esso agisce come un cofattore nelle metalloproteinasi della matrice zinco-dipendente. Lo Zinco conferisce citoprotezione contro le specie di Ossigeno reattivo e contro le tossine batteriche. Le NPs ZnO sono state usate con successo nella cura delle lesioni cutanee grazie alle loro elevate proprietà antimicrobiche. Recentemente, le NPs ZnO sono state incorporate in idrogel a base di sodio alginato - gomma d'acacia (SAGA) al fine di avere un effetto curativo a basse concentrazioni di NPs ZnO in cellule di fibroblasti di pecora. Alte concentrazioni di NPs ZnO erano tossiche per la cellula, mentre l'utilizzo del sistema SAGA-NPs ZnO riduceva la tossicità e preservava gli effetti benefici antibatterici e curativi. Kumar e colleghi hanno preparato un idrogel di chitosano-NPs ZnO, mostrando un aumento della coagulazione del sangue e dell'attività antibatterica. Valutazioni *in vivo* nei ratti hanno rivelato un miglioramento della guarigione delle ferite e una più veloce ri-epitelizzazione e deposizione di collagene [2].

Capitolo 2

Metodo innovativo per l'incorporazione di Ibuprofene in Ossido di Zinco: l'utilizzo di CO₂ supercritica

2.1 Introduzione

Oggigiorno, il consumo di solventi organici nelle industrie farmaceutiche sta diventando un problema quotidiano, poiché la quantità di rifiuti prodotta aumenta anno dopo anno. I due problemi principali che derivano dall'uso di solventi organici nelle tecnologie farmaceutiche sono: 1) la tossicità dei solventi organici residua nei prodotti finali, 2) l'impatto ambientale. I solventi organici sono utilizzati in abbondanza nella sintesi dei Principi Attivi, tuttavia essi sono adoperati anche nella produzione dei *drug delivery systems*. Dunque, con il passare degli anni, è stato necessario utilizzare dei processi chimici eco-compatibili e sostenibili per sviluppare sistemi per il rilascio controllato di farmaci, senza l'uso di solventi organici [15].

Molti farmaci cristallini possiedono una permeabilità molto elevata nel tratto gastroenterico, ma bassissima solubilità e velocità di dissoluzione in soluzioni acquose e ciò si traduce in un basso valore di biodisponibilità orale: il Sistema di Classificazione Biofarmaceutica li classifica come farmaci di "classe II". Il loro tasso di dissoluzione potrebbe essere aumentato disperdendolo in un carrier biocompatibile (solubile in acqua) che può inibire la cristallizzazione del farmaco. Ciò può essere ottenuto comunemente con il metodo del solvente dove si producono dispersioni solide che sciolgono sia il farmaco che il carrier in un solvente, il quale evapora. La rimozione del solvente è eseguita con diverse tecniche come essiccazione spray, evaporazione del solvente sottovuoto o liofilizzazione. La maggior parte dei solventi comunemente impiegati ha, però, problemi di tossicità e tutte le tecniche di rimozione del solvente non possono impedire che alcune tracce restino intrappolate nella matrice. L'utilizzo, quindi, di un solvente non tossico e facilmente rimovibile dal prodotto potrebbe essere interessante per l'industria farmaceutica [16].

Per questa ragione, negli ultimi decenni, la tecnologia che opera con fluidi supercritici è emersa come una valida alternativa alle tecniche convenzionali di *drug loading*, come l'adsorbimento o l'impregnazione da una soluzione composta da solventi organici. L'anidride carbonica supercritica (scCO₂) è attualmente il solvente supercritico più utilizzato grazie alle sue proprietà chimico-fisiche uniche [16].

2.2 Anidride carbonica supercritica: le proprietà

I fluidi supercritici sono definiti come sostanze che presentano valori di pressione e temperatura superiori a quelli "critici" [17]. Superato il punto critico, esiste un'unica fase che presenta proprietà uniche: la densità e le caratteristiche di solvatazione sono simili a quelle di una sostanza liquida, ma le proprietà di trasferimento di massa sono simili a quelle dei gas.

L'anidride carbonica supercritica (scCO₂) è uno dei fluidi supercritici maggiormente utilizzato per diverse ragioni. Innanzitutto, essa risulta essere inodore, incolore, altamente pura, sicura, economicamente vantaggiosa, non infiammabile, non tossica e riciclabile. In aggiunta, essa presenta condizioni critiche basse e, quindi, facilmente raggiungibili. Infatti, la temperatura critica è molto vicina alla temperatura ambiente (31,1 °C) e la pressione è mediamente alta (73,8 bar). Al di sopra del punto critico, la CO₂ è considerata essere in uno stato supercritico. Nella seguente figura 2.1 è rappresentato il diagramma di fase dell'anidride carbonica in un diagramma pressione-temperatura:

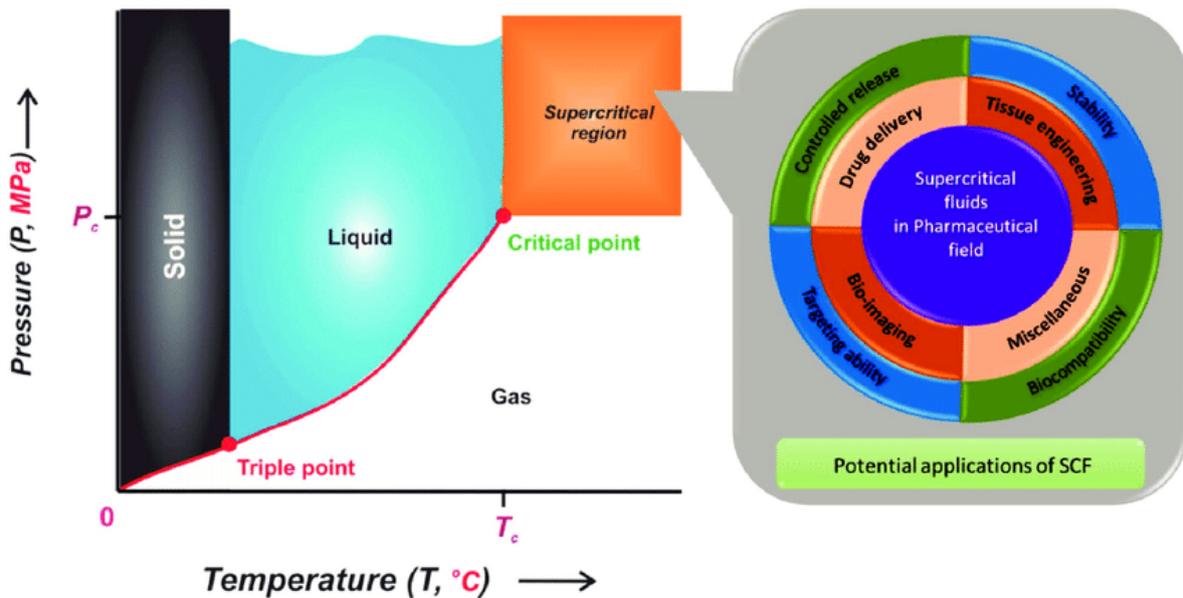


Figura 2.1 Diagramma di fase dell'anidride carbonica (sinistra). Illustrazione grafica delle principali applicazioni di SCF (destra) [18].

La CO₂ può esistere in fase solida, liquida o gassosa e, variando la pressione e la temperatura, può avvenire qualsiasi modifica di stato. Seguendo il confine della fase liquido-gas, se vengono aumentate la pressione e la temperatura si verifica una riduzione della densità della fase liquida e un incremento della densità del vapore. Raggiunto il "punto critico", le due densità si eguagliano e le fasi di liquido e vapore si combinano in un'unica fase.

Come tutti i fluidi supercritici, scCO₂ ha caratteristiche fisiche (densità, diffusività, viscosità) comprese tra quelle tipiche di un gas e quelle tipiche di un liquido; in particolare, essa ha un potere solvente simile ad un liquido e una diffusività simile ad un gas [19]. La densità di scCO₂ è molto simile a quella dello stato liquido, che è compresa tra 0,2 e 1,5 g/cm³ e le sue proprietà di trasporto sono analoghe con quelle dello stato gas [20]. La sua densità e il suo potere solvente sono facilmente regolabili grazie ad un minimo cambiamento della temperatura o della pressione.

Per i motivi sopra citati, quindi, il biossido di carbonio può essere considerato un sostituto ideale di molti solventi organici grazie alla sua manipolabilità, al suo costo altamente competitivo rispetto ai tradizionali solventi organici e soprattutto perché in condizioni ambientali è un gas, condizione che lo rende facilmente separabile dal soluto [21].

2.2.1 Vantaggi e svantaggi della scCO₂

Come descritto nel paragrafo precedente, l'utilizzo di scCO₂ offre innumerevoli vantaggi: essa è facilmente disponibile, economica, non tossica, non infiammabile e facile da rimuovere dal prodotto. Inoltre, è considerata una tecnologia eco-compatibile e altamente versatile, utilizzabile per la produzione di materiali di consumo come ad esempio prodotti farmaceutici e alimentari, nonché per altri numerosi processi quali le estrazioni, la produzione e la modifica delle nanoparticelle e la lavorazione dei polimeri [22].

Questa tecnologia che opera con scCO₂ non presenta, a differenza delle tecniche di impregnazione tradizionali, alcuna traccia residua del solvente organico. In aggiunta, le condizioni operative vantaggiose, tra cui la temperatura operativa moderata, rende questa tecnica utile e applicabile anche con materiali termo-sensibili.

D'altra parte però, la scCO₂ presenta alcuni inconvenienti, legati alle sue proprietà fisico-chimiche e alla sua configurazione. Ad esempio, uno dei fattori limitanti è rappresentato dalla scarsa abilità della scCO₂ di dissolvere specie polari e ioniche, perché essa è una molecola lineare con nessun momento dipolo netto. Di conseguenza, non è utilizzabile con tutti i composti, ma questo inconveniente può essere superato aggiungendo un co-solvente al fine di aumentare la sua polarità. Per tale scopo, l'etanolo è uno dei maggiori co-solventi utilizzati [20]. Inoltre, l'elevata pressione richiesta e i costi di manutenzione alti possono rappresentare una limitazione nell'uso di questa tecnologia supercritica [22].

2.3 Applicazioni industriali della scCO₂

Le applicazioni tradizionali della CO₂ includono l'estrazione, l'essiccamento e la pulizia [23]. Attualmente, la scCO₂ è impiegata per le estrazioni che avvengono su larga scala nell'industria alimentare per la decaffeinizzazione del caffè o l'estrazione del luppolo. Questa tecnologia prevede che il materiale che deve essere sottoposto all'estrazione sia inserito all'interno di un vessel ad alta pressione, in cui la temperatura e la pressione risultano essere al di sopra del punto critico. La circolazione della scCO₂ permette di estrarre i composti desiderati dal materiale solido, che sono raccolti in un altro vessel, dove possono essere separati dal gas CO₂ riducendo la pressione.

Inoltre, la scCO₂ è anche utilizzata per l'essiccazione e per la rimozione di residui di solventi organici [24]. Grazie alla tensione superficiale nulla della scCO₂, si riesce a pulire anche le porosità più strette del materiale, rimuovendo completamente i residui organici mediante la loro dissoluzione.

La CO₂ supercritica può essere utilizzata ampiamente anche nella lavorazione dei materiali [23]. Per esempio, può essere utilizzata nella micronizzazione di materiali in polvere (ad esempio farmaci) [25], elaborazione di aerogels 3D [18] e rivestimenti [26].

Per quanto concerne le applicazioni della tecnologia basata su scCO₂ in ambito farmaceutico, essa gioca un ruolo chiave in una vasta gamma di processi di produzione. In particolare, la scCO₂ è stata studiata nel design di sistemi per il rilascio di farmaci micro/nanostrutturati, nello studio di molte tecniche al fine di raggiungere l'aumento della solubilità del farmaco e come un metodo innovativo per eseguire l'impregnazione del farmaco di differenti materiali [27].

2.4 Impregnazione di farmaci attraverso $scCO_2$

La micronizzazione di farmaci, la formazione di particelle e l'incorporazione di farmaci in matrici, sono solo alcuni degli esempi di processi in cui trova applicazione la $scCO_2$ in ambito farmaceutico. In particolare, tale tecnologia rappresenta un metodo innovativo per incorporare un Principio Attivo in un supporto, al fine di ottenere un sistema per il rilascio controllato di farmaco [18].

La figura 2.2 riporta una rappresentazione schematica di un impianto tipico:

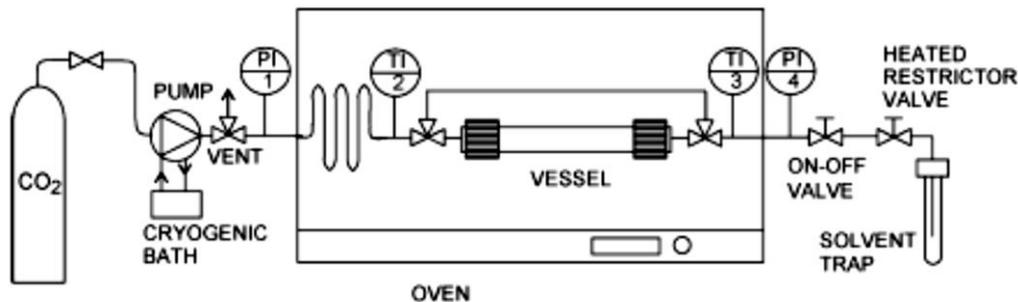


Figura 2.2 Rappresentazione schematica dell'impianto sperimentale in cui può essere eseguita l'impregnazione del farmaco mediata da $scCO_2$ [16]

Il sistema consiste in un vessel in cui sono inseriti simultaneamente il farmaco e il materiale. È presente un controllo di temperatura e la CO_2 è pompata fino a raggiungere la pressione desiderata. L'impregnazione può essere condotta in condizioni statiche o dinamiche. Il meccanismo del processo di impregnazione mediato da $scCO_2$ è basato sulle caratteristiche di densità e diffusività della stessa. Infatti, grazie alla combinazione di queste proprietà, è possibile raggiungere l'impregnazione del materiale con un soluto (ad esempio un farmaco), quando sono inseriti nello stesso vessel ed entrambi sono soggetti a $scCO_2$. Un aspetto peculiare dell'anidride carbonica supercritica è che essa possiede un buon potere solvente, grazie alla sua alta densità, che permette di raggiungere la solubilizzazione di molti composti. Inoltre, l'alta diffusività implica un alto tasso di diffusione della soluzione supercritica in qualsiasi supporto inserito nel vessel.

Fondamentalmente, il processo di impregnazione coinvolge tre componenti: la CO_2 come solvente, il farmaco e il materiale. Il processo può essere illustrato riassumendo i tre passaggi principali, come illustrato in figura 2.3:

1. Dissoluzione del soluto in un'atmosfera di $scCO_2$;
2. Contatto tra la soluzione [CO_2 + soluto] e il materiale;
3. Stadio di depressurizzazione [20]

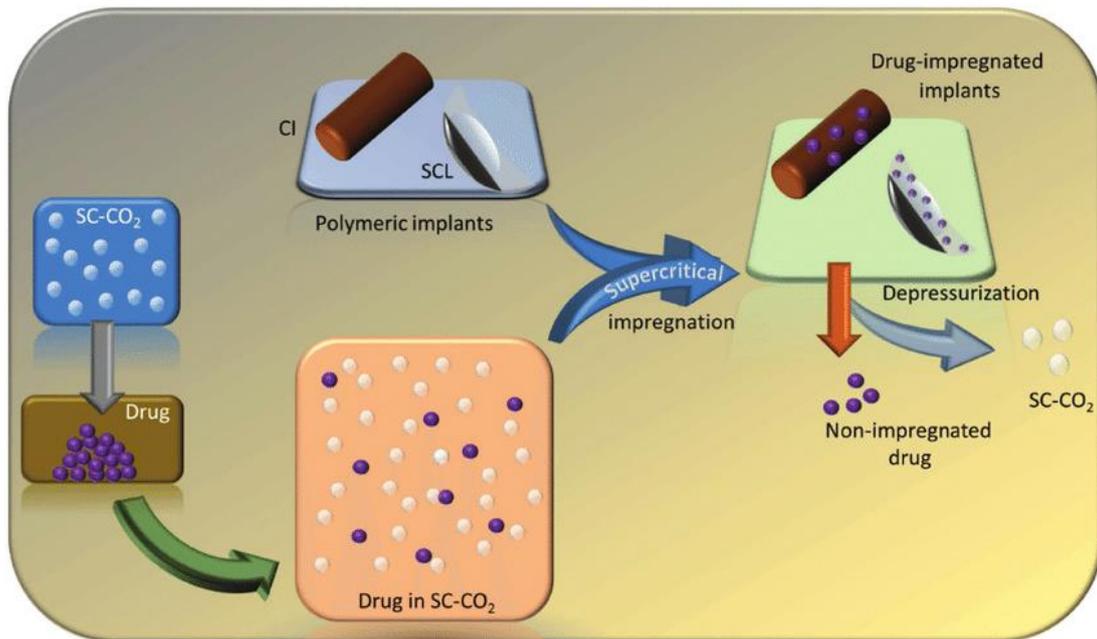


Figura 2.3 Esempio della rappresentazione schematica del processo di impregnazione mediato da scCO₂ in impianti polimerici [18]

È necessario considerare alcuni aspetti fondamentali della scCO₂. La CO₂ è una molecola non polare, quindi essa rappresenta un buon solvente per soluti non polari e a basso peso molecolare [28]. Dopo la solubilizzazione del farmaco in scCO₂, si ha l'incorporazione del farmaco nel materiale attraverso la diffusione della soluzione nella matrice. La dissoluzione del farmaco e l'impregnazione della matrice avvengono contemporaneamente, alle stesse condizioni di pressione e temperatura. Al termine del processo il sistema viene depressurizzato e la CO₂ ritorna ad essere gassosa. Questa tecnologia, come detto, presenta un valore aggiunto: il materiale in cui è stato incorporato il farmaco non presenta alcuna traccia di solvente; infatti, esso può essere utilizzato immediatamente come sistema di rilascio di farmaco, non richiedendo alcun processo di purificazione.

Dopo l'impregnazione, l'interazione farmaco-materiale può essere classificata in due differenti tipi di interazioni. La prima consiste in un semplice meccanismo di deposizione, che è determinato dalla scarsa interazione tra il farmaco e il materiale. L'altra interazione, invece, è basata su una maggiore affinità tra il farmaco e il materiale, in seguito ad interazioni di tipo Van der Waals o legami idrogeno che sono in grado di determinare un'elevata efficienza di *drug loading* [28].

2.4.1 I vantaggi dell'impregnazione mediata da scCO₂ rispetto ai metodi di impregnazione tradizionali

La tecnologia basata sull'utilizzo della scCO₂, come detto, si presenta come un metodo alternativo e innovativo rispetto ai metodi tradizionali che, sebbene siano facili da eseguire e riproducibili, presentano differenti svantaggi. Uno dei problemi principali relativo all'uso di solventi organici consiste nella tossicità dei solventi organici residui che può condurre a problemi di salute e problemi ambientali.

L'impregnazione mediata da scCO₂ presenta degli aspetti innovativi:

- Il metodo di impregnazione è eco-compatibile. La CO₂ è disponibile, riciclabile, economica, non infiammabile e non tossica. Queste caratteristiche sono fondamentali per il suo utilizzo in ambito farmaceutico.
- scCO₂ è una molecola apolare, quindi risulta un buon solvente anche per i farmaci scarsamente solubili.
- Al termine dell'impregnazione mediata da scCO₂ il sistema in cui è stato incorporato il farmaco è immediatamente disponibile, senza che sia effettuato alcun processo di purificazione.
- La possibilità di agire su parametri operativi quali temperature, pressione e tempo, permette di modificare l'interazione farmaco-materiale. Ciò garantisce l'ottenimento dell'interazione migliore, che prevede che il farmaco sia in condizioni amorfe, perché ciò migliora la sua biodisponibilità [20].

2.4.2 Amorfizzazione di farmaci

Le molecole di farmaco possono esistere in una varietà di forme polimorfiche. Contrariamente alle forme polimorfiche cristalline che sono ordinate su lungo raggio, lo stato amorfo è disordinato, in forma metastabile, il quale tende a minimizzare la sua energia libera e a cristallizzarsi. Nel contesto dei sistemi di rilascio di farmaci, è essenziale che i polimorfi e lo stato amorfo abbiano differenti solubilità e quindi applicazione in differenti attività terapeutiche [27]. Sebbene lo stato amorfo sia stato visto da sempre come uno stato intimamente correlato all'instabilità e quindi non adatto al settore farmaceutico, negli ultimi tempi ha attirato molta attenzione sia in ambito scientifico che nelle industrie. Infatti, sono state commercializzate diverse formulazioni amorfe.

Inizialmente i solidi cristallini venivano trasformati nello stato amorfo in due differenti modi: mediante conversione diretta (ad esempio mediante attivazione meccanica o irradiazione) o trasformazione in una forma termodinamicamente stabile e intrinsecamente non cristallina seguita da un rapido processo o a bassa temperatura o ad alta intensità di interazione (tempra, precipitazione, deposizione o adsorbimento) [29] [30].

La procedura tipica dell'adsorbimento e precipitazione in matrici solide porose (denominato "Metodo di impregnazione con solvente") prevede che una matrice porosa sia immersa nella soluzione di un farmaco in presenza di un solvente organico (solitamente acetone, diclorometano o metanolo). Alternativamente la soluzione può essere spruzzata nella matrice per un determinato periodo di tempo. Il solvente viene poi rimosso mediante evaporazione o liofilizzazione o operando in condizioni di vuoto. Seguendo questo protocollo, l'amorfizzazione del farmaco è stata riportata per molte combinazioni di farmaco-materiale.

L'interesse principale di questo lavoro riguarda specificamente l'uso dell'anidride carbonica nel metodo di impregnazione con solvente. L'uso di soluzioni supercritiche per il confinamento di farmaci amorfi non è molto studiato in letteratura [31].

Indipendentemente dal solvente usato, durante il confinamento di farmaci hanno luogo due fenomeni: l'adsorbimento del farmaco sulla superficie e la precipitazione del farmaco mediante evaporazione del solvente. A seconda delle interazioni farmaco-superficie e della concentrazione globale della soluzione domina uno o l'altro processo [32].

Innanzitutto, è ben stabilito che esiste un diametro dei pori critico d^* , al di sotto del quale la cristallizzazione è completamente soppressa [30]. Il diametro del poro non dovrebbe eccedere la dimensione del soluto di un fattore di 10-20 per assicurare che il rischio della ricristallizzazione sia minimo [32]. Un tipico diametro per piccole molecole di farmaci giace tra 0,3 e 1 nm. Quindi i materiali mesoporosi con pori di 2-50 nm sono i candidati ideali per agire come carriers. Allo stesso tempo, i farmaci in pori più larghi sono più inclini a subire la

nucleazione che dà origine alla fase cristallina [33]. Secondariamente, anche se potrebbe sembrare contro intuitivo, è generalmente osservato che i solidi confinati hanno una conformazione più ampia e una mobilità molecolare migliore [33]. In altre parole, le molecole sulla superficie dimostrano un comportamento simile a quello dei fluidi con una mobilità più elevata rispetto a quella delle molecole al centro dei pori, dove la mobilità è prossima a quella della fase di bulk cristallina. Da un punto di vista pratico, ciò potrebbe implicare una reattività più alta dei solidi amorfi [34].

Il ruolo delle interazioni matrice-farmaco nell'amorfizzazione è generalmente riconosciuto [35]. Le molecole interagenti più forti hanno maggiori probabilità di essere confinate in forma amorfa; inoltre, la quantità complessiva del farmaco aumenta all'aumentare dell'interazione [36].

2.5 Influenza del tempo di contatto sull'efficienza di incorporazione

Il processo di impregnazione mediato da $scCO_2$ è influenzato sia da parametri termodinamici sia da parametri cinetici. Tra i parametri termodinamici, la pressione e la temperatura giocano un ruolo chiave nel processo di incorporazione del farmaco [37]. La letteratura suggerisce che un aumento di temperatura in condizioni isobariche è una buona strategia per aumentare l'efficienza di incorporazione [38]. Allo stesso modo, è stato osservato che aumentare la pressione in condizioni isoterme migliora il grado di incorporazione, grazie all'aumento della solubilità del farmaco in CO_2 [39].

Un altro parametro che influenza enormemente la quantità di farmaco impregnata è il tempo di contatto [40]. Lo stato dell'arte dimostra che lo studio di impregnazione a differenti tempi di contatto non è ancora un argomento molto investigato in letteratura. In particolare, sono stati trovati cinque lavori di ricerca che mostrano lo studio della variazione del tempo di contatto farmaco-materiale, dimostrando gli effetti sperimentali.

Marizza e colleghi hanno studiato l'incorporazione del Ketoprofene in una matrice polimerica, osservando un evidente aumento della *drug loading capacity* all'aumentare del tempo di contatto. Infatti, il loro studio è basato su due prove di incorporazione, una di un'ora e una di quattro ore. I risultati evidenziano una quantità di farmaco incorporata quasi raddoppiata nella prova di 4 ore rispetto alla prova eseguita in un'ora. Inoltre, per investigare l'equilibrio di partizione del farmaco tra la CO_2 e il polimero, è stato condotto un ulteriore esperimento di impregnazione, a parità di tutte le altre condizioni, per 24 ore. La quantità di farmaco incorporata ottenuta da questa prova risulta essere molto simile a quella caratteristica della prova di 4 ore [37].

Duarte e colleghi hanno preparato un sistema di rilascio oftalmico, che utilizza una matrice polimerica impregnata con il flurbiprofene, un agente antiinfiammatorio non steroideo. Anche questo lavoro focalizza l'attenzione sull'influenza del tempo di impregnazione. In tal caso, il campione processato in modalità batch presenta un'efficienza di impregnazione più alta rispetto a quando il campione è preparato col metodo semi-continuo. È probabile che, nel processo semi-continuo, il flusso di CO_2 sia troppo elevato per raggiungere l'equilibrio in un tempo apprezzabile [41].

Anche Mano e colleghi affermano che la quantità di farmaco impregnata può essere regolata fino ad un determinato valore limite, variando il contatto di impregnazione. L'esperimento eseguito consiste nella preparazione di scaffolds di chitosano con desametasone incorporato [42].

Ulteriori lavori di ricerca confermano che il tempo è una variabile con un ruolo chiave nell'impregnazione [43]: un tempo di contatto elevato determina una resa di impregnazione altrettanto alta [44].

2.6 Ibuprofene: un farmaco modello

L'ibuprofene, la cui molecola è rappresentata nella figura 2.4, è uno dei farmaci antinfiammatori non steroidei più utilizzato e più frequentemente prescritto, grazie alle sue proprietà analgesiche e antipiretiche [45].

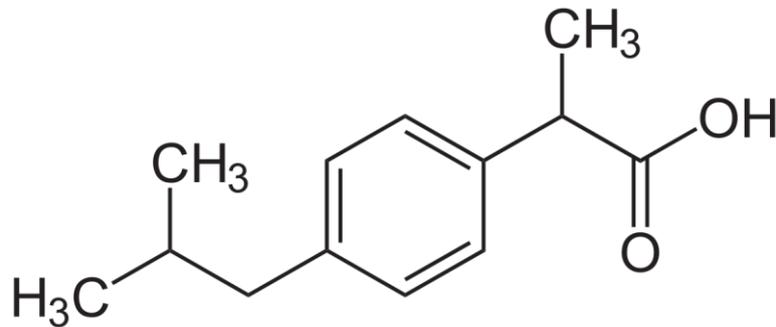


Figura 2.4- Molecola di Ibuprofene [46]

Tra le vie di somministrazione convenzionali, quella orale è la più comune, sotto forma di compresse, capsule, sospensioni e soluzioni. Inoltre, l'applicazione topica dell'ibuprofene offre molte forme di dosaggio (crema, gel, soluzioni spray) utili per la gestione del dolore dell'apparato muscolo-scheletrico, delle articolazioni e dei tessuti molli [47].

Negli ultimi anni, l'uso alternativo dell'ibuprofene per il trattamento di ferite ha attirato molta attenzione in ambito biomedico. Numerosi lavori di ricerca sono stati indirizzati allo sviluppo di medicazioni innovative, in grado di fornire ibuprofene alla ferita, al fine di superare i principali problemi correlati al processo di guarigione [48]. L'ibuprofene e altri farmaci FANS sono degli eccellenti agenti per la riduzione del dolore, infatti una piccola dose di ibu può avere un effetto locale eccellente sulla guarigione della ferita superficiale [47].

Un aspetto cruciale considerato per la scelta di ibu come farmaco modello riguarda la sua solubilità. Esso presenta una bassa solubilità in acqua (0,021 mg/ml) [47]. Grazie alla sua maggiore affinità con gli alcol, lo sviluppo di sistemi per il rilascio di ibu ha spesso richiesto l'uso di solventi organici quali etanolo, metanolo o pentano. Questa scelta può comportare un impatto pericoloso per la salute umana e per l'ambiente, dovuti alla presenza di residui tossici nel prodotto finale.

Per superare il limite dei metodi tradizionali, la tecnologia basata su scCO₂ è stata ampiamente studiata per incorporare l'ibuprofene in differenti materiali. Da un'attenta analisi in letteratura, non risultano esserci ancora lavori riguardo l'incorporazione di ibu all'interno di ossido di zinco mesoporoso.

Marks e Fustenberger nel 2002 iniziarono a studiare l'Ibuprofene (Ibu) all'interno di sistemi di somministrazione di farmaci. Infatti, Ibu è un noto farmaco FANS, un composto efficace, sicuro e ben tollerato. Esso agisce attraverso l'inibizione di due isoforme di cicloossigenasi (COX-1 e COX-2), enzimi responsabili della biosintesi della prostaglandina. Il comportamento antiinfiammatorio è stato particolarmente testato in problematiche osteoarticolari, ulcere venose delle gambe e guarigione muscolare attraverso somministrazione orale. In un recente studio, Pavaloiu e colleghi hanno riportato lo sviluppo di films compositi di PVA/CS che erano rivestiti con multistrati di cellulosa batterica al fine di rilasciare l'Ibu. Il massimo rilascio del farmaco è stato ottenuto dopo 25 ore. I films di polimeri sono stati preparati mediante il metodo del solvente, una tecnologia che richiede l'utilizzo di solventi organici e successivi passaggi di purificazione [48].

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Materiali

I materiali utilizzati sono i seguenti: Acetato di Zinco diidrato ($(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Idrossido di Potassio (KOH) e Metanolo (CH_3OH) per la sintesi dell'Ossido di Zinco, forniti da SIGMA-ALDRICH Italia. Per la prova di incorporazione e di determinazione del quantitativo di farmaco sono stati utilizzati: Ibuprofene ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$), Etanolo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), Tampone fosfato salino (PBS) e Acqua bidistillata, acquistati da SIGMA ALDRICH Italia. L'anidride carbonica con una purezza del 99,5 % è stata fornita da SIAD.

3.2 Sintesi dell'Ossido di Zinco mesoporoso

La sintesi dell'Ossido di Zinco mesoporoso (Meso-ZnO) è stata effettuata seguendo la procedura riportata nell'articolo di Mitra e colleghi, mediante metodo di precipitazione da soluzione [12].

Inizialmente sono stati pesati 14,75 g del precursore Acetato di Zinco diidrato e 7,4 g di Idrossido di Potassio; questi componenti sono stati disciolti rispettivamente in 60 ml e 32 ml di Metanolo. All'interno dei due sistemi è stato inserito un magnete, affinché siano mantenuti in agitazione a temperatura ambiente. Ottenute due sospensioni, esse sono state unite a temperatura ambiente in modo da avere un'unica miscela, che è stata portata a riflusso. Dunque, il dispositivo dentro cui si trovava la miscela è stato collegato ad un tappo condensatore detto "reflux", in cui circola acqua; esso ha lo scopo di evitare l'evaporazione del Metanolo durante la reazione. Il contenitore in vetro è stato inserito in un bagno di oli, in cui è presente una sonda di temperatura del termoregolatore, impostato a 60 °C per 72 ore. In seguito alle 72 ore, sono stati eseguiti tre cicli di centrifugazione a 4000 rpm per 30 minuti ciascuno; in ogni ciclo è stato necessario separare il surnatante (Metanolo) dal precipitato (Meso-ZnO). Successivamente, rimosso il surnatante, è stato effettuato il lavaggio con la stessa quantità di Metanolo fresco, al fine di eliminare ogni traccia di Idrossido di Potassio. Al termine di queste operazioni, il precipitato è stato essiccato in forno ad una temperatura di circa 50 °C, ottenendo Meso-ZnO di interesse sotto forma di polvere bianca. Il processo appena descritto viene illustrato nella figura 3.1:

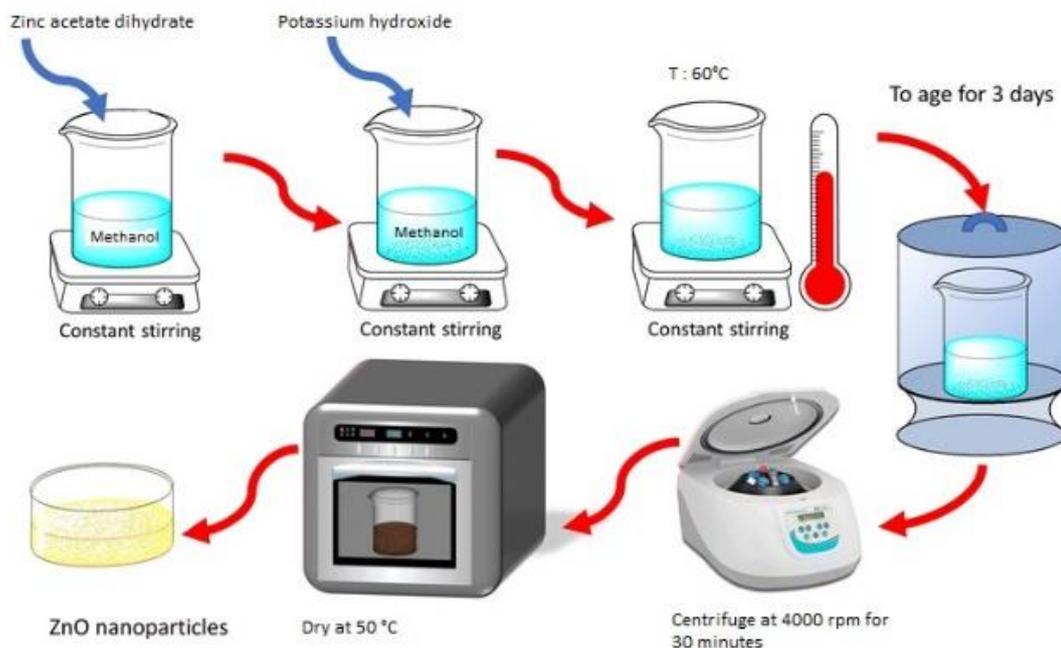


Figura 3.1 Rappresentazione del processo di sintesi di Meso-ZnO [49]

3.3 Incorporazione con CO_2 supercritica

L'incorporazione dell'Ibuprofene nell'Ossido di Zinco mesoporoso (Ibu@Meso-ZnO) è stata effettuata utilizzando la CO_2 supercritica ($scCO_2$).

Inizialmente, sono state preparate una pastiglia di Ibuprofene (100 mg) e una pastiglia di Ossido di Zinco (100 mg), mediante l'utilizzo della pressa idraulica. Successivamente, sono stati utilizzati dei dispositivi in vetro prodotti appositamente dal gruppo di ricerca, a forma cilindrica con diametro di 1 cm, all'interno dei quali sono state inserite le due pastiglie citate, separate da un filtro di carta. Il filtro di carta è stato usato per prevenire il loro contatto e per garantire facilmente il recupero di Ibu@Meso-ZnO, che sarà caratterizzato di seguito. All'estremità di ogni cilindretto è stata inserita la lana di vetro, al fine di impaccare il sistema [15].

Allo scopo di ottenere una maggiore riproducibilità, sono stati preparati 4 cilindretti identici e sono stati inseriti all'interno di un vessel di acciaio inossidabile. Quest'ultimo è stato inserito all'interno di una stufa, che opera in condizioni di temperatura costante. Il reattore è stato riempito con anidride carbonica liquida e riscaldato a 35 °C. Dopo il riscaldamento, l'anidride carbonica è stata pompata nel vessel fino a raggiungere la pressione finale desiderata, ovvero 100 bar. Queste condizioni sono mantenute costanti per tutta la durata della prova e permettono, dunque, al farmaco di dissolversi in $scCO_2$ e diffondere all'interno dell'Ossido di Zinco. Al termine della prova, il sistema è stato depressurizzato e riportato alle condizioni ambientali.

La prova di incorporazione è stata eseguita per 24 ore, 8 ore e 3 ore, nell'impianto raffigurato in figura 3.2.

3.3.1 Studio degli effetti del processo con CO₂ supercritica sull' Ossido di mesoporoso (Meso-ZnO)

In aggiunta, al fine di valutare l'effetto della scCO₂ sul solo materiale di ossido di zinco mesoporoso (Meso-ZnO), è stata effettuata un'ulteriore prova su una pastiglia di Meso-ZnO (100 mg), senza la presenza di farmaco nel cilindretto di vetro. Essa è stata sottoposta ad un processo in scCO₂ a 35°C, 100 bar per 8 ore. Tale campione verrà di seguito definito Meso-ZnO_scCO₂.

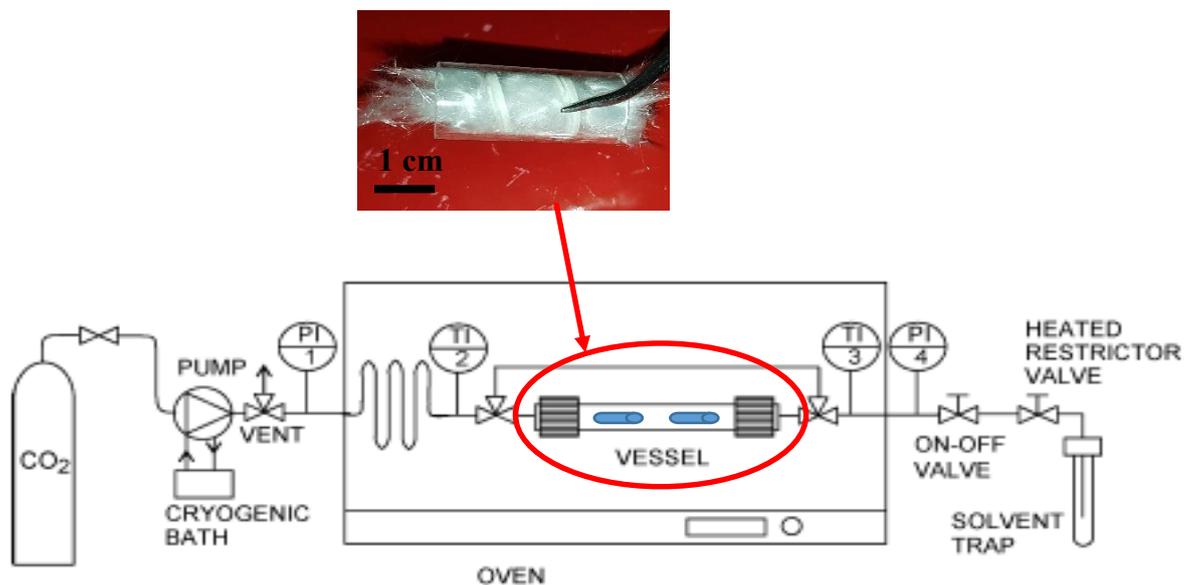


Figura 3.2 Rappresentazione dell'impianto usato per l'incorporazione dell'Ibuprofene [16]
immagine modificata

3.4 Determinazione della quantità di farmaco incorporata

Per stimare la quantità di farmaco incorporata all'interno del materiale, è stato effettuato il rilascio mediante un metodo convenzionale, ovvero disciogliendo l'Ibuprofene supportato (Ibu@Meso-ZnO) in un solvente. Il primo obiettivo consiste nella costruzione delle rette di taratura per l'analisi della soluzione di Ibuprofene. Si è deciso di utilizzare i solventi Etanolo (EtOH), noto per l'elevata capacità di solubilizzare l'ibuprofene, e Tampone Fosfato salino (PBS) a pH pari a 7.4, per simulare un rilascio in condizioni fisiologiche.

Sono stati posti in contatto circa 25 mg di Ibuprofene con 250 ml di Etanolo, creando, quindi, una soluzione madre con concentrazione di 1 mg/ml. Successivamente, a partire da essa, sono state prodotte delle soluzioni più diluite, sia in Etanolo che in PBS. Per quanto riguarda le soluzioni diluite in Etanolo le concentrazioni sono: 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml e 50 µg/ml. In PBS sono state considerate le soluzioni con concentrazioni di 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml e 10 µg/ml. La valutazione

dell'Assorbimento allo spettrofotometro UV-Vis ha permesso la creazione delle rette di taratura, che verranno mostrate nel capitolo successivo ("Risultati").

In seguito, sono state avviate le prove di rilascio nei due solventi. Si tratta di una prova di estrazione del farmaco mediante solvente, presente in quantità elevate rispetto alla massa di farmaco incorporata. La prova di contatto di Ibu@Meso-ZnO con EtOH e PBS è stata svolta disciogliendo circa 50 mg del campione in 30 ml di solvente.

Tutti i sistemi citati sono stati sottoposti ad agitazione (350 rpm) per 2 ore a temperatura ambiente. terminate le due ore, è stato avviato un processo di centrifugazione per 3 volte successive. Lo scopo di questa procedura è separare il surnatante dal precipitato (Ossido di Zinco), al fine di eliminare le particelle di carrier. Infatti, l'Ossido di Zinco assorbe i raggi UV e questo potrebbe essere causa di problemi nella lettura dell'Assorbimento. La centrifugazione è stata eseguita in tutti e tre i casi a 4000 rpm per 30 minuti.

Mediante la retta di taratura, è stata valutata la concentrazione delle soluzioni ottenute dalla prova di estrazione dell'ibuprofene dai campioni di Meso-ZnO impregnati mediante processo supercritico. Dalla concentrazione, moltiplicando per la quantità di solvente iniziale in cui è stato rilasciato Ibu@Meso-ZnO, è stata determinata la massa di farmaco rilasciata e quindi la percentuale in massa di farmaco nel carrier, secondo la seguente equazione:

Equazione 1:

$$\text{Drug Loading Capacity (\%)} = \frac{\text{massa di farmaco rilasciata}}{\text{massa totale di Ibu@Meso - ZnO}} * 100$$

3.5 Metodi di caratterizzazione

I campioni sono stati caratterizzati mediante le tecniche di Analisi di fisisorbimento di azoto (BET), Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIR), Diffrazione a raggi X (XRD), Spettroscopia UV e Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo (FESEM).

3.5.1 Analisi di fisisorbimento di azoto

Questa metodologia di caratterizzazione permette di valutare l'area superficiale specifica, la dimensione media dei pori e il volume dei pori; questi dati sono i parametri fondamentali per caratterizzare la mesoporosità del materiale in esame. L'analisi di adsorbimento di N₂ a 77 K è stata eseguita utilizzando lo strumento Quantachrome AUTOSORB-1. Questa apparecchiatura si affida al software Autosorb, il quale permette di costruire l'isoterma del campione. Le aree specifiche superficiali sono state calcolate nel range di pressione relativa 0,04 e 0,1. La distribuzione dei pori è stata valutata scegliendo il modello "NLDFT equilibrium", assumendo che i pori siano cilindrici. L'area BET è stata ottenuta mediante il modello Brunauer-Emmet-Teller.

Un passaggio preliminare all'adsorbimento di azoto è il degasaggio del campione, effettuato per due ore, tempo utile per rimuovere eventuali sostanze estranee adsorbite sul materiale. La temperatura operativa del degasaggio è 150 °C nel caso di Ossido di Zinco puro, 40 °C

quando si lavora con l'Ossido di Zinco incorporato, nota la temperatura di degradazione del farmaco.

3.5.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

Questa tecnica di analisi spettroscopica permette la rivelazione dei gruppi funzionali caratteristici del campione. Conseguentemente è possibile utilizzare questa metodologia per lo studio delle interazioni farmaco-materiale in seguito al processo di impregnazione. Le misure FTIR sono state effettuate mediante uno spettrometro Bruker Tensor 27, operante ad una risoluzione di 2 cm^{-1} , che è correlato al software Opus. L'oggetto dell'analisi è una pastiglia di materiale da analizzare, ottenuta mediante la pressa idraulica, solitamente utilizzando una pressione di 3 torr per 10 secondi. Al fine di ottenere una pastiglia supportata, è stato utilizzato il Bromuro di Potassio, in percentuali variabili a seconda dei casi, che non apporta alcuna modifica allo spettro del materiale analizzato. Al termine di una prima valutazione, è stato eseguito il degasaggio del campione a temperatura ambiente per 1h.

3.5.3 Diffrazione a raggi X

Questa analisi non distruttiva permette di studiare la struttura di un solido cristallino. Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro PANalytical X'Pert Powder (Cu $K\alpha$ radiation). Mediante il software connesso all'apparecchiatura, è stato possibile impostare le condizioni operative, ovvero 40 kV per la tensione e 40 mA per la corrente. Per tutti i campioni, l'analisi è stata eseguita ad alti angoli, ovvero valori di 2-Theta compresi tra 5° e 80° .

3.5.4 Spettroscopia Ultravioletto-Visibile

La spettroscopia permette la quantificazione del farmaco incorporato, grazie alla lettura dell'Assorbanza. Da letteratura, il picco di assorbimento dell'Ibuprofene si ha in corrispondenza di 263,8 nm, quindi le valutazioni dell'assorbanza sono state ricercate in prossimità di questo valore. La determinazione quantitativa del contenuto di farmaco incorporato nelle nanoparticelle di ossido è stata effettuata mediante lo spettrofotometro UV-Visibile Beckman-Coulter DU 730.

3.5.5 Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo

Questa tecnica permette di visualizzare la morfologia del materiale analizzato. Le immagini FESEM sono state registrate con FESEM ZEISS MERLIN, rappresentando la struttura del materiale su diverse scale.

Capitolo 4

Risultati

In questo capitolo verranno illustrati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione dell'ossido di zinco mesoporoso, prima e dopo incorporazione con il farmaco mediante processo supercritico. In seguito, verranno presentati i calcoli inerenti al rilascio eseguito al fine di individuare la quantità di farmaco incorporata e, infine, saranno esposte delle valutazioni numeriche sulla base dei dati sperimentali ottenuti riguardanti il ricoprimento della superficie.

4.1 Caratterizzazione dell'Ossido di Zinco mesoporoso

4.1.1 Analisi di fisisorbimento di Azoto

Nelle figure 4.1 e 4.2 vengono riportate l'isoterma ottenuta e la curva caratteristica della distribuzione dei pori del materiale sintetizzato:

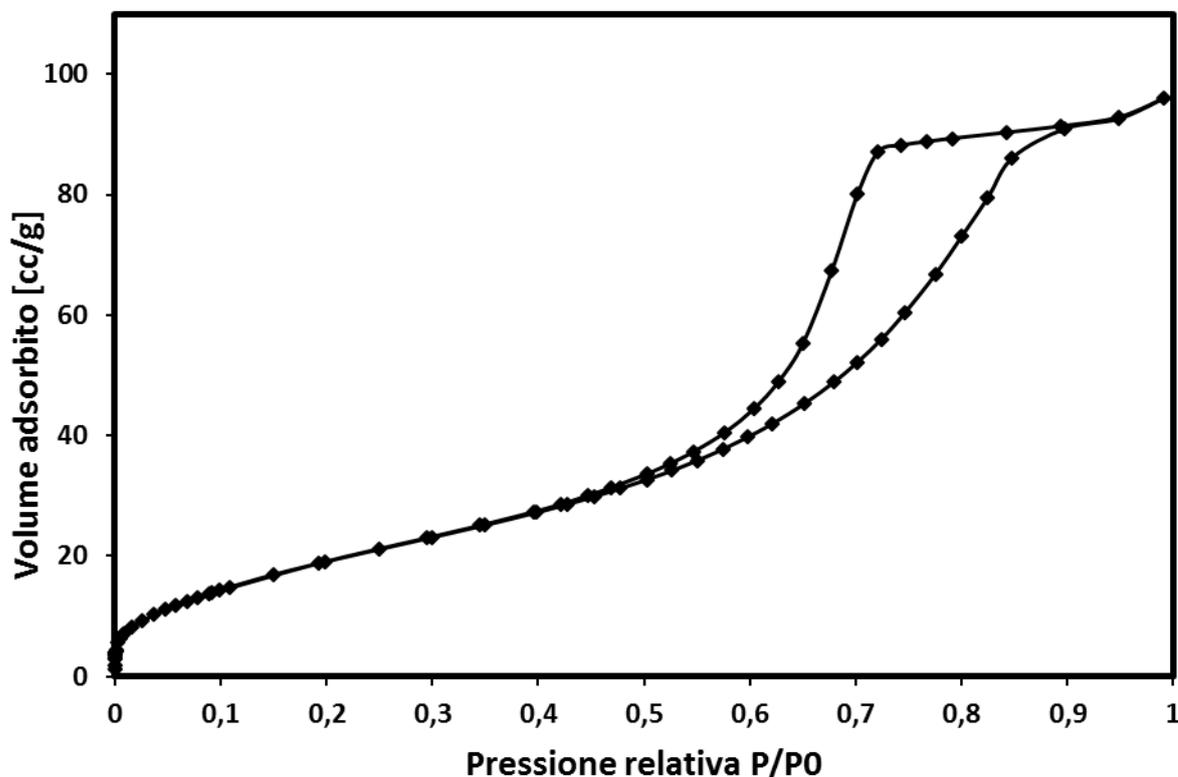


Figura 4.1 Isoterma di adsorbimento di azoto di Meso-ZnO

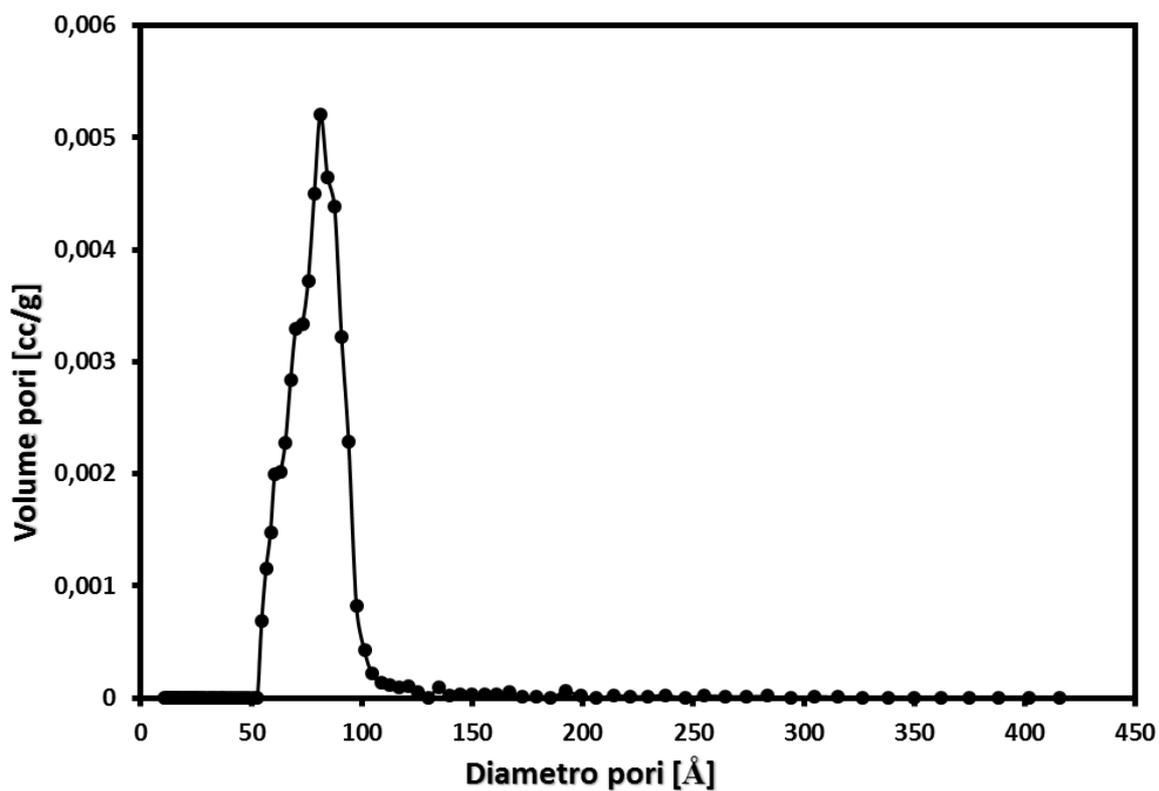


Figura 4.2 Distribuzione porosimetrica di Meso-ZnO

L'isoterma di adsorbimento-desorbimento ottenuta è una curva di tipo IV IUPAC, tipica dei materiali mesoporosi, che esibisce il fenomeno di isteresi. L'area superficiale specifica determinata mediante questa tecnica è di $75 \text{ m}^2/\text{g}$; la distribuzione dei pori è monomodale con un diametro medio dei pori di circa 8 nm. Il volume medio dei pori, ricavato mediante il modello NLDFT, risulta essere $0,14 \text{ cm}^3/\text{g}$.

4.1.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

Nella figura 4.3 viene riportato lo spettro relativo ad una pastiglia supportata di ossido di zinco con Bromuro di Potassio (80% MesoZnO,20%KBr):

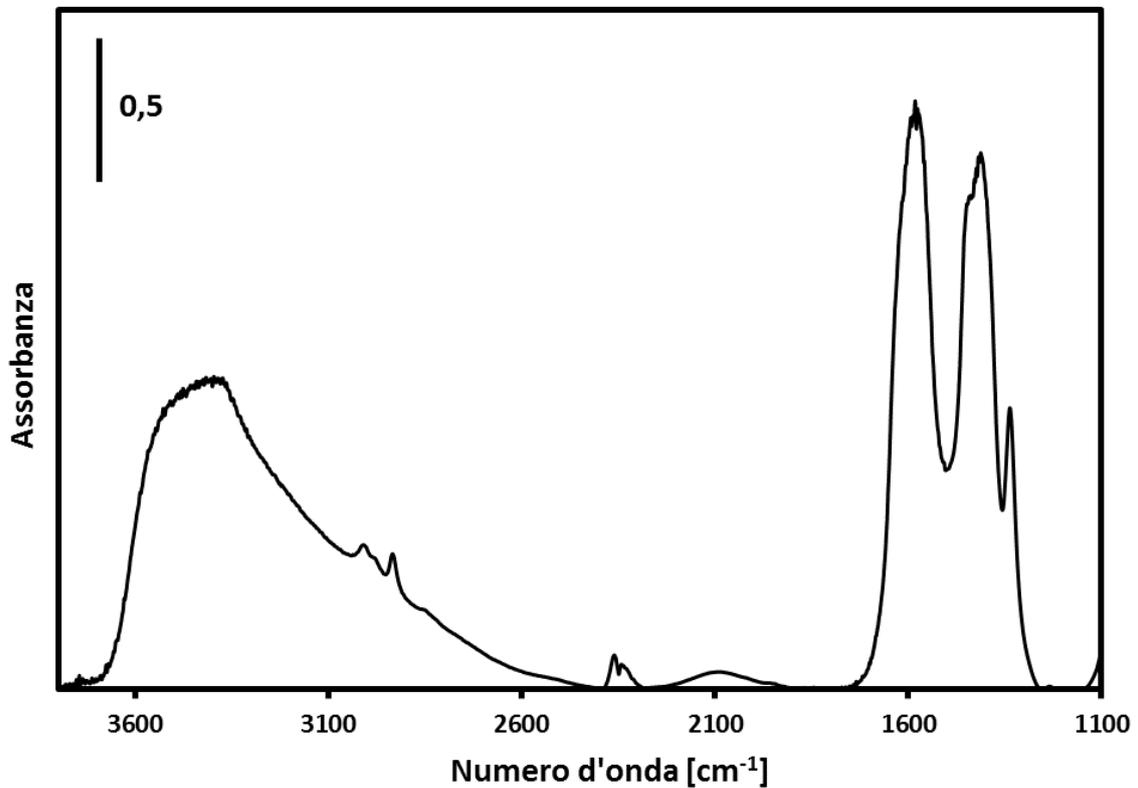


Figura 4.3 Spettro FT-IR di Meso-ZnO

Lo spettro, riportato per valori di numero d'onda compresi tra 1100 e 3600 cm⁻¹ mostra: le bande intense nell'intervallo 1730 cm⁻¹-1250 cm⁻¹ dovute ai gruppi carbonati superficiali e l'assorbimento largo e intenso intorno a 3400 cm⁻¹ che è dovuto alle vibrazioni di stretching dei gruppi O-H superficiali (ossidrili superficiali e molecole di acqua adsorbite sulla superficie). I valori sperimentali sono in accordo con la letteratura, che individua le bande dei carbonati superficiali nell'intervallo di 1700 cm⁻¹ – 1200 cm⁻¹ e i modi degli ossidrili superficiali a 3419 cm⁻¹ [12].

4.1.3 Diffrazione a Raggi X:

Lo spettro ottenuto mediante la prova diffrattometrica è mostrato nella figura 4.4:

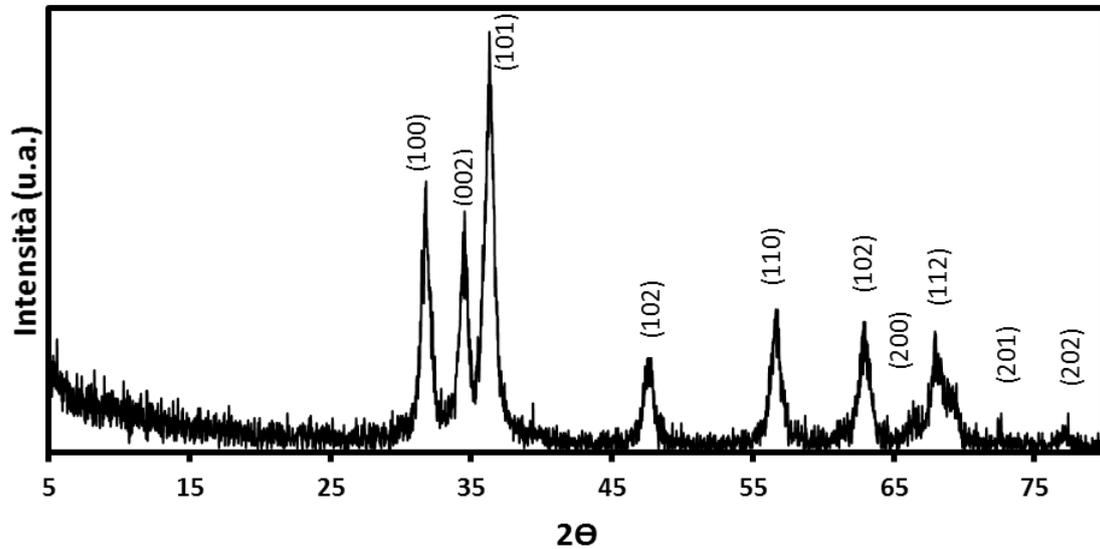


Figura 4.4 Spettro XRD di Meso-ZnO

L'analisi di diffrazione a raggi X conferma la natura cristallina del carrier con la tipica struttura esagonale della wurtzite. I picchi caratteristici, osservabili sul grafico ed equivalenti a quelli indicati in letteratura, sono i seguenti: $2\theta = 31,73^\circ, 34,31^\circ, 36,02^\circ, 47,58^\circ, 56,42^\circ, 62,7^\circ, 66,41^\circ, 67,98^\circ, 69,12^\circ$ e $76,98^\circ$ [12].

4.1.4 Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo

Nella figura 4.5 vengono riportate le immagini relative alla morfologia del campione ossido di zinco sintetizzato:

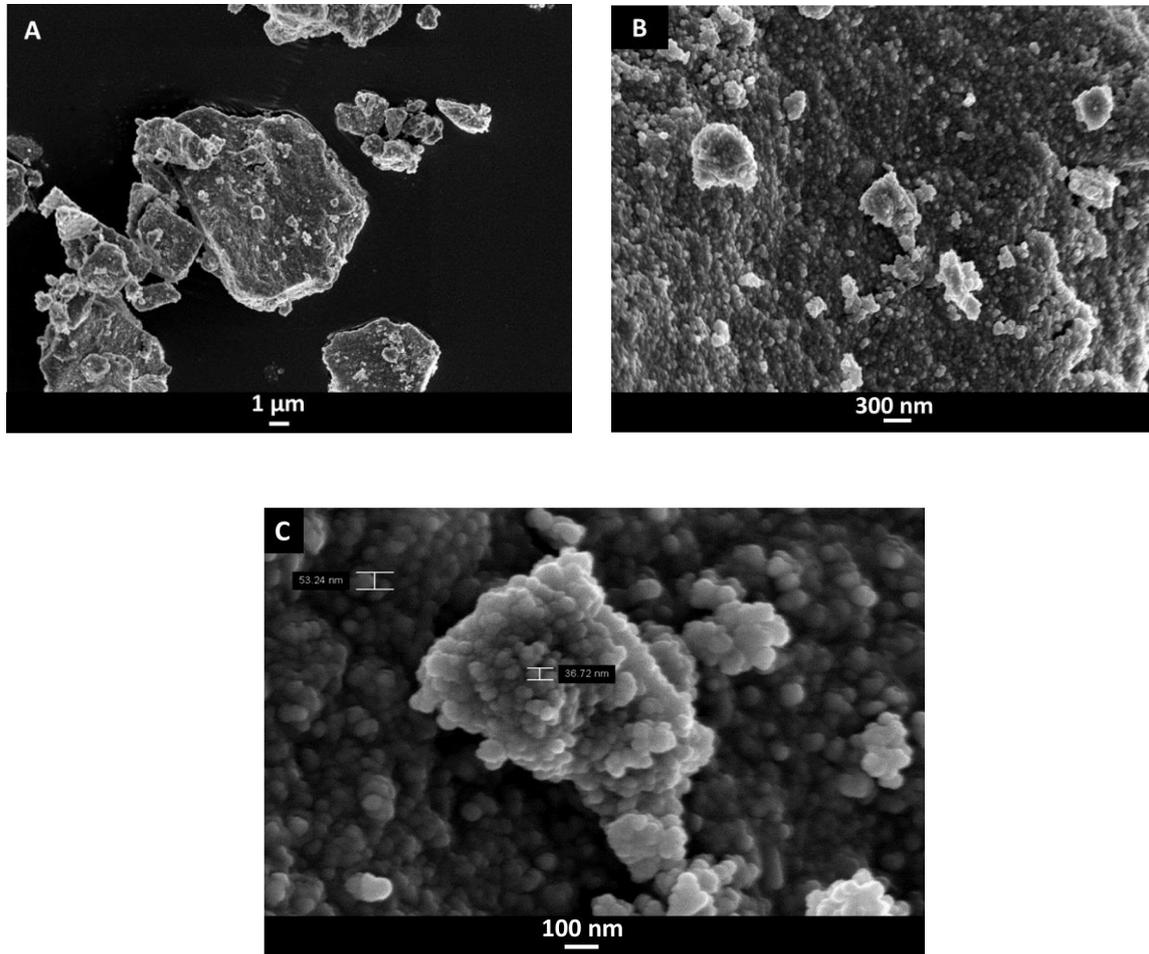


Figura 4.5 Immagini FESEM del campione Meso-ZnO a diversi ingrandimenti: nel pannello A ingrandimento 10 KX, nel pannello B ingrandimento 50 KX e nel pannello C ingrandimento 200 KX

Dalle figure appare chiaro come l'ossido di zinco presenti una struttura costituita da aggregati formati da nanoparticelle con dimensioni eterogenee comprese tra circa 30 e 60 nm.

L'ingrandimento presentato, ai limiti delle possibilità per la strumentazione adoperata, conferma che l'interconnessione delle nanoparticelle determina la porosità del materiale.

4.2 Caratterizzazione dell'Ibuprofene

4.2.1 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

Di seguito (figura 4.6) viene riportato lo spettro relativo ad una pastiglia supportata di Ibuprofene con Bromuro di Potassio (10% Ibu,90%KBr):

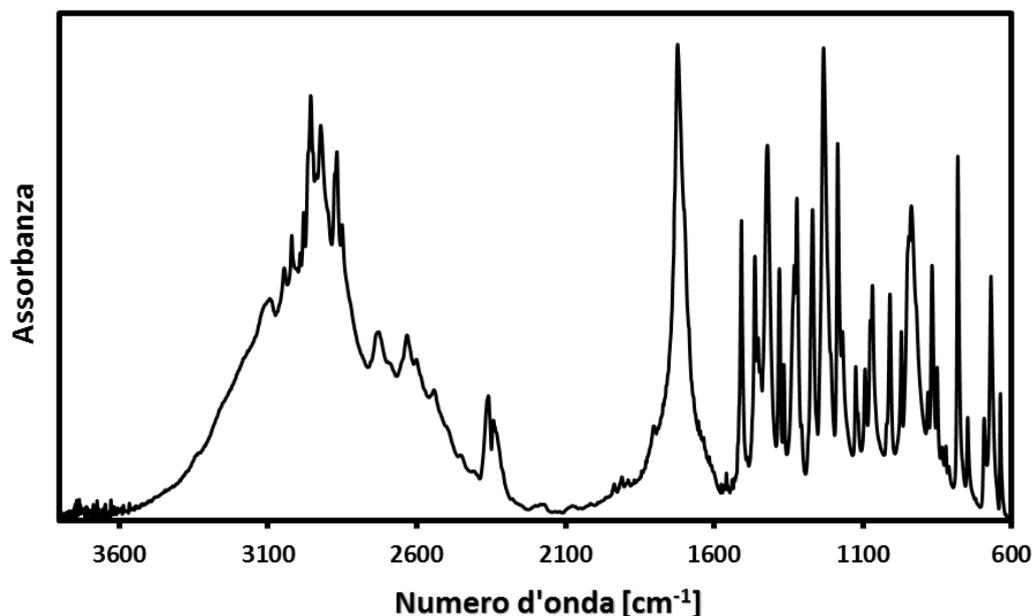


Figura 4.6 Spettro FT-IR dell'Ibuprofene

Nello spettro sono visibili i picchi caratteristici del farmaco: la banda a 1720 cm^{-1} è dovuta ai gruppi carbonilici e quella tra 2840 cm^{-1} e 2980 cm^{-1} è dovuta ai modi dei gruppi C-H. Inoltre, sotto i modi dei gruppi C-H, si riconosce una banda molto larga tra 2440 cm^{-1} e 3516 cm^{-1} che è dovuta agli O-H appartenenti al gruppo carbossilico, impegnati per legame idrogeno. Questi valori sperimentali sono in accordo con quanto dichiarato da Kamari [50]. Inoltre, in letteratura, è stata osservata una variabilità della frequenza del gruppo carbonilico, dovuta ai diversi tipi di interazioni che possono coinvolgere questo gruppo in legami idrogeno. Infatti, Ugliengo e colleghi affermano che la frequenza del gruppo carbonilico è pari a 1738 cm^{-1} [51], invece Matkovic la individua a 1710 cm^{-1} [52].

4.2.2 Diffrazione a Raggi X

Lo spettro del farmaco cristallino determinato mediante la prova diffrattometrica viene mostrato nella figura 4.7:

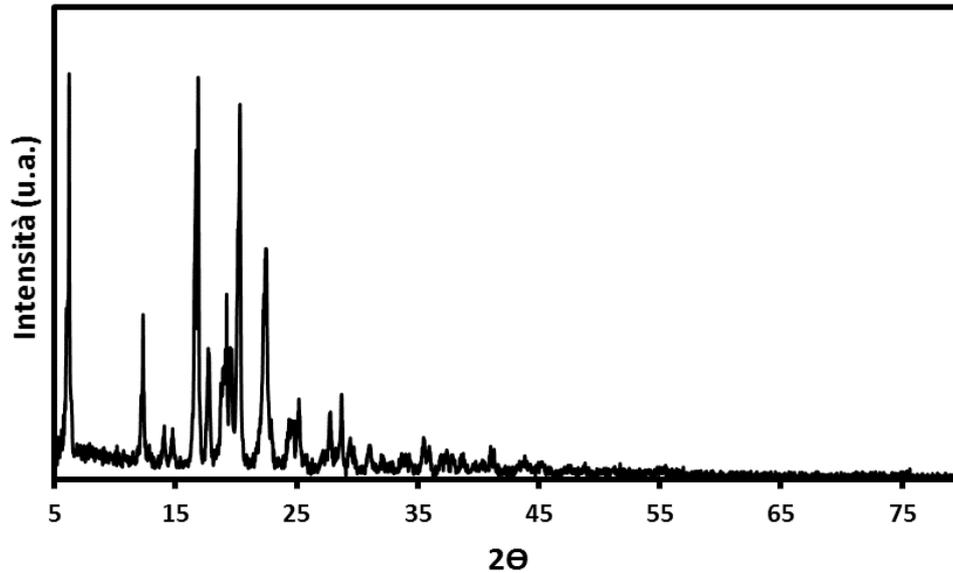


Figura 4.7 Spettro XRD dell'Ibuprofene

La presenza di picchi di diffrazione osservabili a $2\theta = 6^\circ, 16^\circ, 17^\circ$ e 22° confermano la struttura altamente cristallina dell'Ibuprofene, come riportato in letteratura [50].

4.3 Caratterizzazione di Ibu @Meso-ZnO

In seguito ad ogni prova di incorporazione eseguita, è stato caratterizzato il campione Ibu @Meso-ZnO mediante le tecniche elencate precedentemente.

4.3.1 Prova di incorporazione di 24 ore

4.3.1.1 Analisi di fisisorbimento di Azoto

La tecnica di caratterizzazione permette di ottenere l'isoterma di adsorbimento (figura 4.8) e la distribuzione porosimetrica (figura 4.9) che saranno di seguito confrontate con quelle relative all'ossido di zinco sintetizzato:

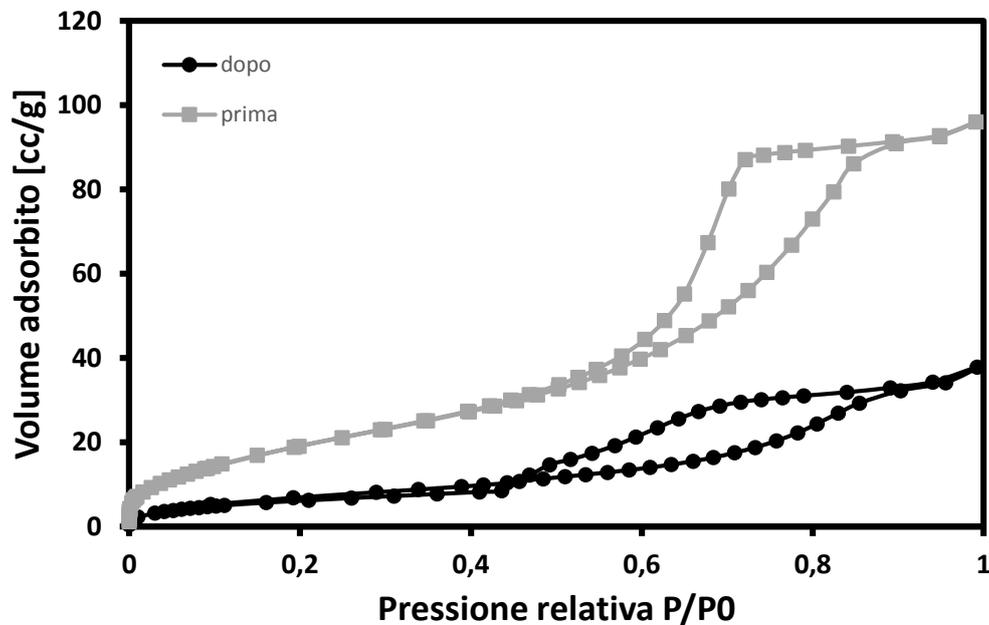


Figura 4.8 Isoterma di adsorbimento di azoto di Ibu@Meso-ZnO-24 ore

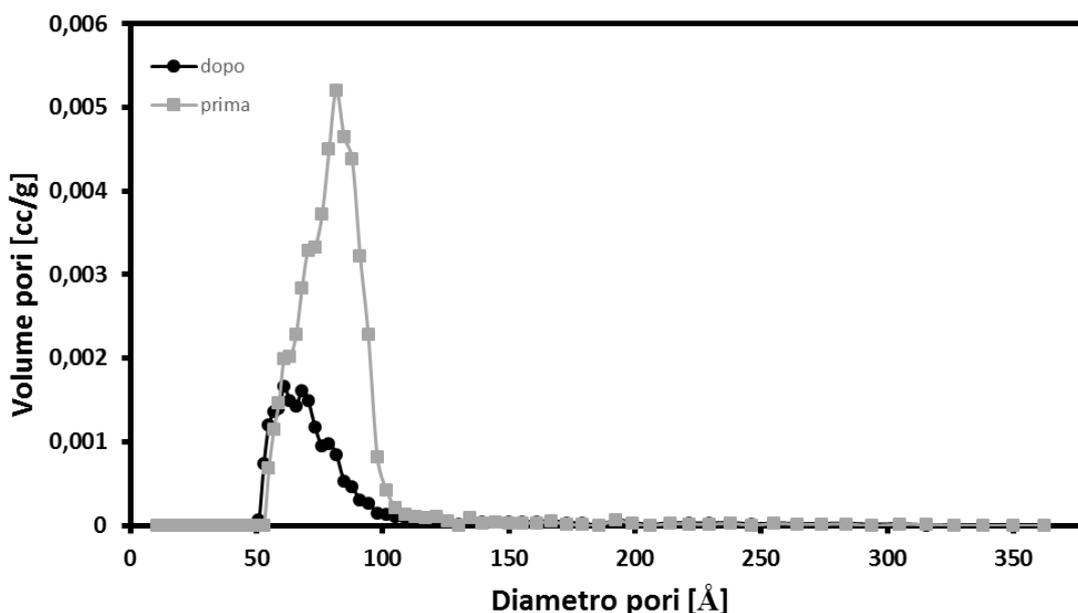


Figura 4.9 Distribuzione dei pori di Ibu@Meso-ZnO-24 ore

I dati relativi ai tre parametri caratteristici ottenuti da questa prova sono confrontati con i valori ottenuti per il carrier appena sintetizzato (tabella 4.1), osservando l'evoluzione che l'Ossido di Zinco ha subito nel corso della prova:

Tabella 4.1 Confronto dei parametri prima e dopo la prova di incorporazione di 24 ore

	Area superficiale [m²/g]	Volume dei pori [cc/g]	Diametro dei pori [Å]
PRIMA	75	0,140	81
DOPO	25	0,050	61

Come si osserva dai grafici e dai valori in tabella, l'area superficiale subisce una significativa diminuzione; ciò è accompagnato anche da una riduzione del volume dei pori e del loro diametro. L'insieme dei risultati evidenzia che le molecole di ibuprofene sono localizzate sulla superficie e all'interno del volume poroso del materiale.

4.3.1.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

La prova di spettroscopia infrarossa effettuata su Ibu@Meso-ZnO conferma che l'Ibuprofene è stato incorporato all'interno di Meso-ZnO, evidenziando dei picchi ben visibili caratteristici del farmaco. Lo spettro ottenuto è mostrato nella figura 4.10:

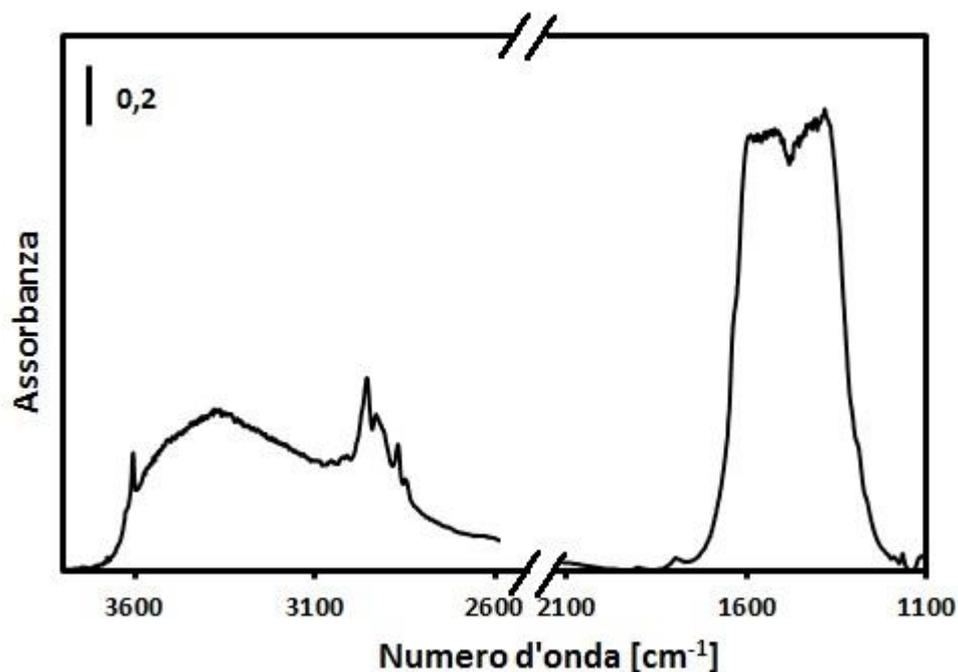


Figura 4.10 Spettro FT-IR di Ibu@Meso-ZnO- 24 ore

Lo spettro mostra i seguenti assorbimenti: una banda larga intorno a 3400 cm^{-1} dovuta ai gruppi ossidrilici superficiali, una banda tra 2840 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} che è dovuta agli stretching dei gruppi C-H dell'Ibuprofene e un assorbimento intenso sotto i 2000 cm^{-1} , caratteristico dei gruppi carbonati superficiali, dovuti alla reazione della CO_2 durante il trattamento in scCO_2 .

Inoltre, è visibile un ossidrile isolato alla frequenza di 3606 cm^{-1} . Da un confronto in letteratura, sembrerebbe che questa specie sia riconducibile al gruppo O-H del bicarbonato.

4.3.1.3 Diffrazione a Raggi X

Lo spettro ottenuto dalla prova diffrattometrica effettuata su Ibu@Meso-ZnO-24h è illustrato nella figura 4.11:

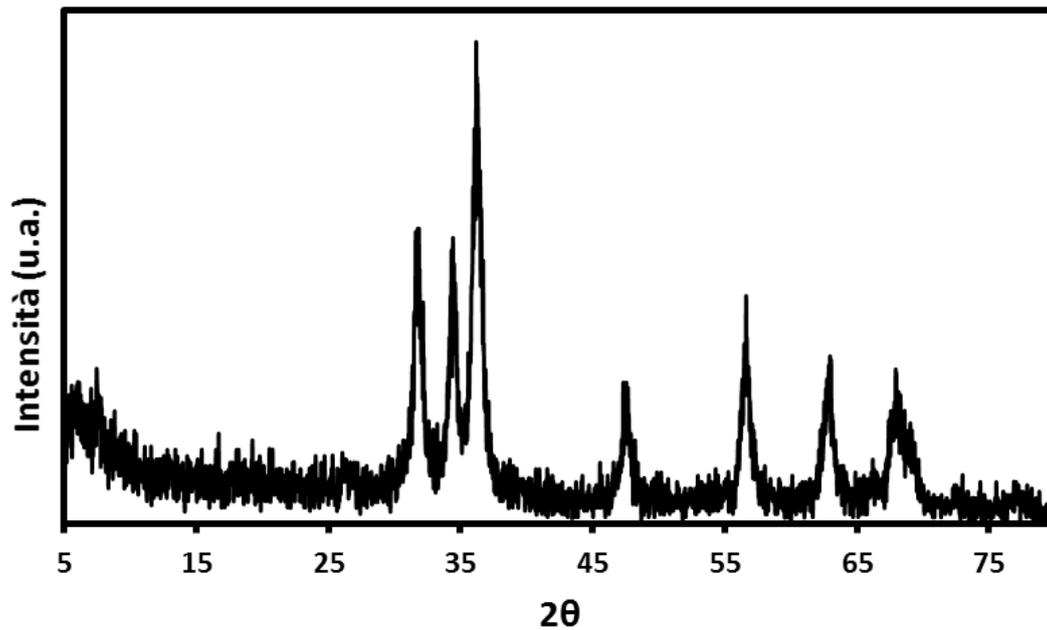


Figura 4.11 Spettro XRD di Ibu@Meso-ZnO-24h

Lo spettro ottenuto permette di affermare che, durante la fase di incorporazione, è mantenuta la struttura wurtzite. Inoltre, l'assenza della fase carbonato di zinco dai raggi X può essere interpretata in due modi: o il carbonato di zinco è amorfo oppure la fase bicarbonato è superficiale.

4.3.2 Prova di incorporazione di 8 ore

4.3.2.1 Analisi di fisisorbimento di Azoto

L'isoterma (figura 4.12) e la distribuzione porosimetrica (figura 4.13) saranno di seguito confrontate con quelle relative all'ossido di zinco sintetizzato:

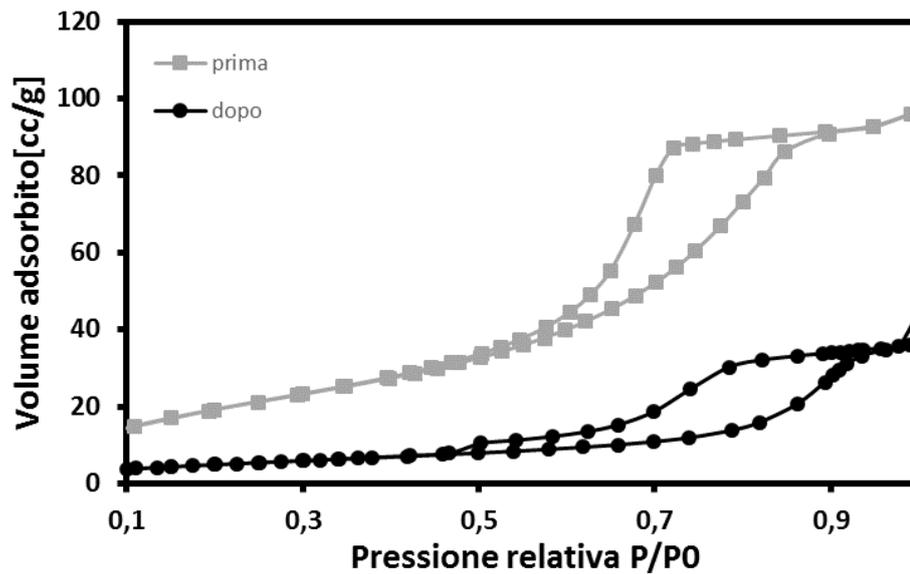


Figura 4.12 Confronto isoterma di adsorbimento di azoto di Ibu@Meso-ZnO-8 ore vs Meso-ZnO

Tabella 4.2 Confronto dei parametri prima e dopo la prova di incorporazione di 8 ore

	Area superficiale [m ² /g]	Volume dei pori [cc/g]
PRIMA	75	0,140
DOPO	19	0,05

4.3.2.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

Lo spettro ottenuto mediante questa tecnica è riportato di seguito:

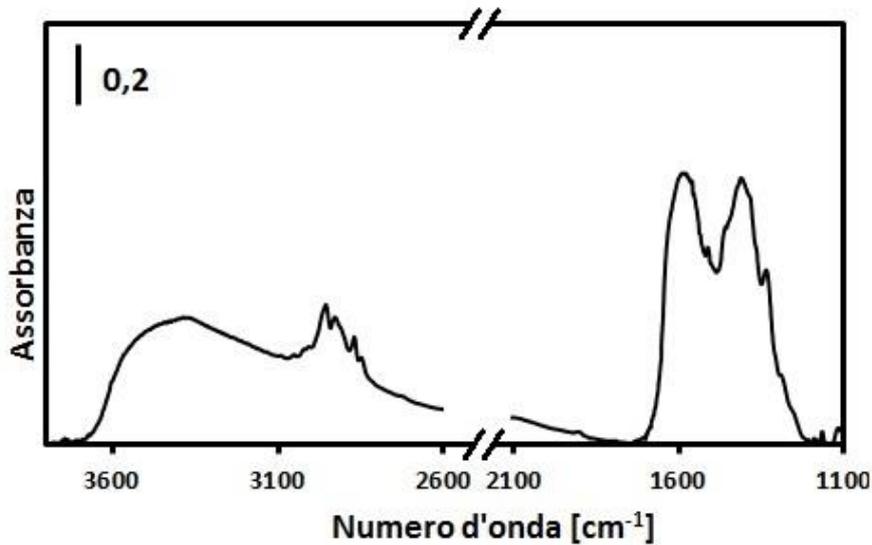


Figura 4.13 Spettro FT-IR di Ibu@MesoZnO-8 ore

Anche questo spettro esibisce i picchi caratteristici del farmaco, indice del fatto che l'incorporazione è avvenuta con successo. Lo spettro evidenzia un grado di carbonatazione minore rispetto a quello delle 24 ore.

Appare interessante il confronto di Ibu@Meso-ZnO con lo spettro del farmaco cristallino (figura 4.14):

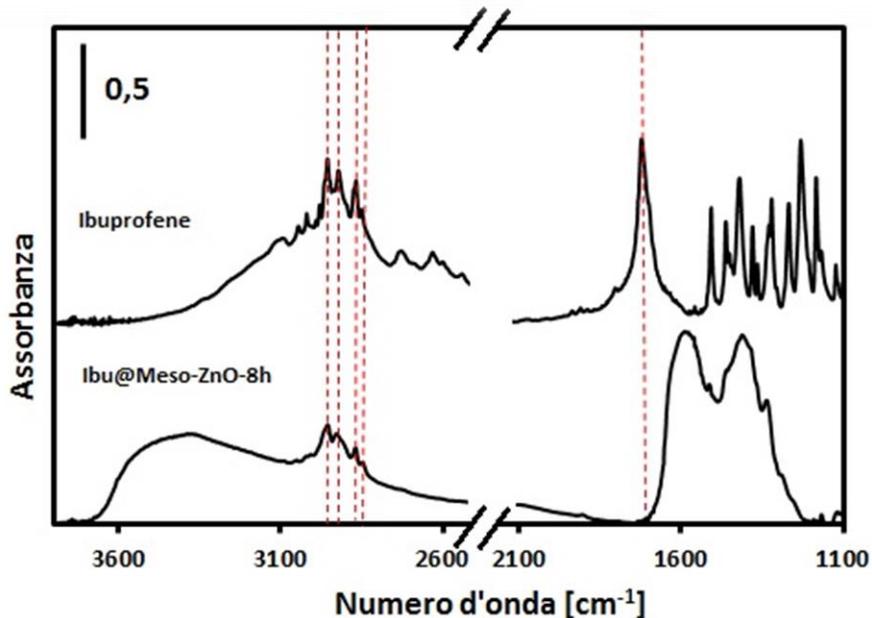


Figura 4.14 Confronto spettro FTIR di Ibu@Meso-ZnO con spettro di Ibu cristallino

Dallo spettro sembra evidente che le frequenze dei gruppi dell'Ibuprofene cristallino relative alla banda dei C-H sono uguali a quelle dei picchi presenti nel campione Ibu@Meso-ZnO.

La letteratura suggerisce che le valutazioni sull'interazione Ibuprofene-superficie possono essere fatte in merito al gruppo carbonile, certamente più informativo rispetto ai legami C-H. In tal caso, il picco relativo al carbonile non è visibile nello spettro e ciò potrebbe indurre a pensare che il carbonile sia impegnato in un'interazione con la superficie, che determina una perturbazione e uno *shift* verso il basso della frequenza di *stretching* del carbonile. Il gruppo carbonilico potrebbe aver interagito con l'Ossigeno degli ossidrili superficiali mediante legame idrogeno, ma certamente un'interazione ancora più forte potrebbe coinvolgere il carbonile e lo ione Zinco. Infatti, quest'ultimo è un sito acido di Lewis che formerebbe un'interazione acido-base di Lewis con il gruppo carbonilico. Tale legame potrebbe perturbare il carbonile ancor di più rispetto ad un legame idrogeno, determinando uno *shift* verso il basso della frequenza dei CO ancora più grande. In particolare, la banda dei gruppi CO non si osserva perché nascosta dalla banda dei carbonati superficiali. Da un'attenta osservazione dello spettro risulta che la frequenza dello stretching del carbonile dei gruppi carbossilici si sia spostata, in seguito ad interazioni intermolecolari, orientativamente al di sotto di 1684cm^{-1} , in linea con quanto detto in letteratura da Fiorilli e colleghi [53].

Un'ulteriore osservazione può essere fatta valutando lo spettro di Ibu@Meso-ZnO insieme allo spettro di Meso-ZnO, come presentato in figura 4.15:

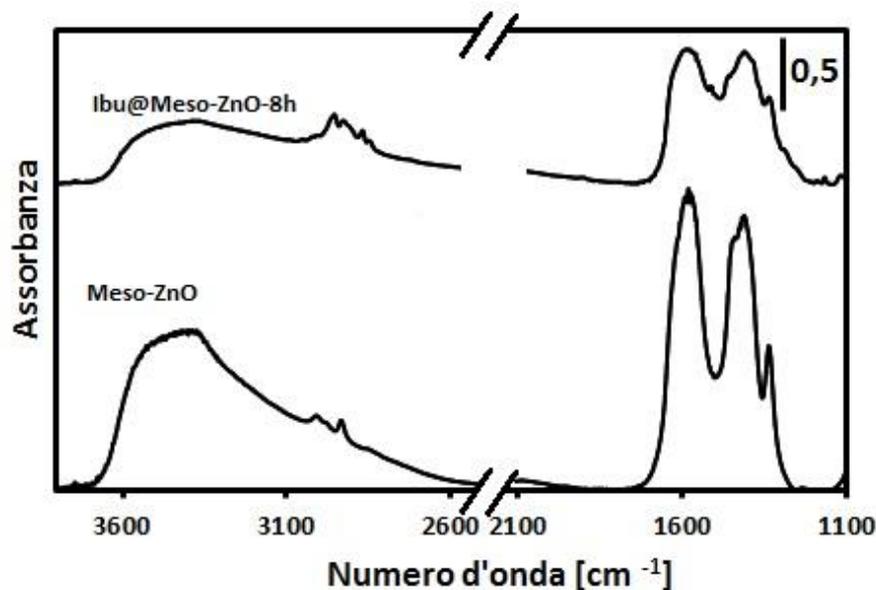


Figura 4.15 Confronto FT-IR tra Meso-ZnO e Ibu@Meso-ZnO

Il confronto evidenzia che l'incorporazione dalla durata di 8 ore non determina una carbonatazione elevata. Infatti, i due spettri appaiono molto simili.

4.3.2.3 Diffrazione a Raggi X

Lo spettro ottenuto è mostrato nella seguente figura:

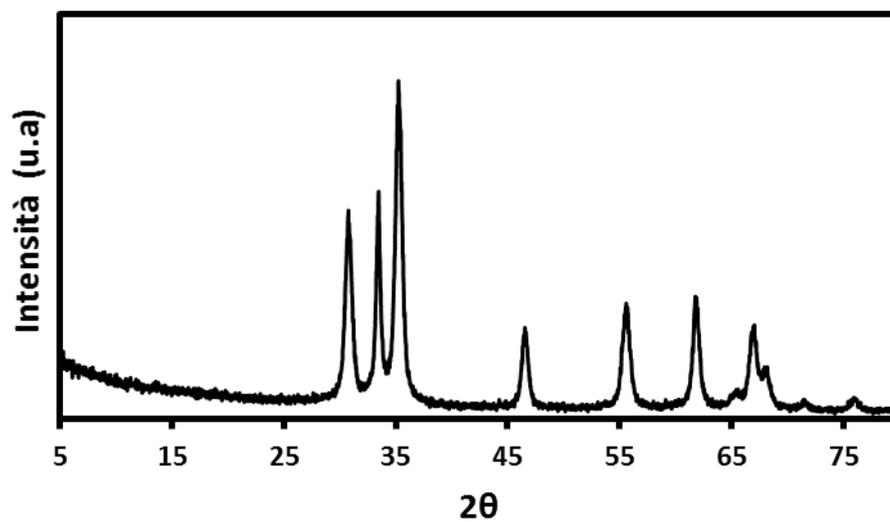


Figura 4.16- Spettro XRD di Ibu@Meso-ZnO-8h

Lo spettro XRD conferma che la struttura è ancora esagonale, tipica della wurtzite, e che non si ha la formazione di carbonato di Zinco.

4.3.2.3 Microscopia a Scansione elettronica a emissione di campo

Le immagini riportate di seguito (figura 4.17) dimostrano che durante l'incorporazione delle 8 ore non sono avvenuti dei cambiamenti morfologici:

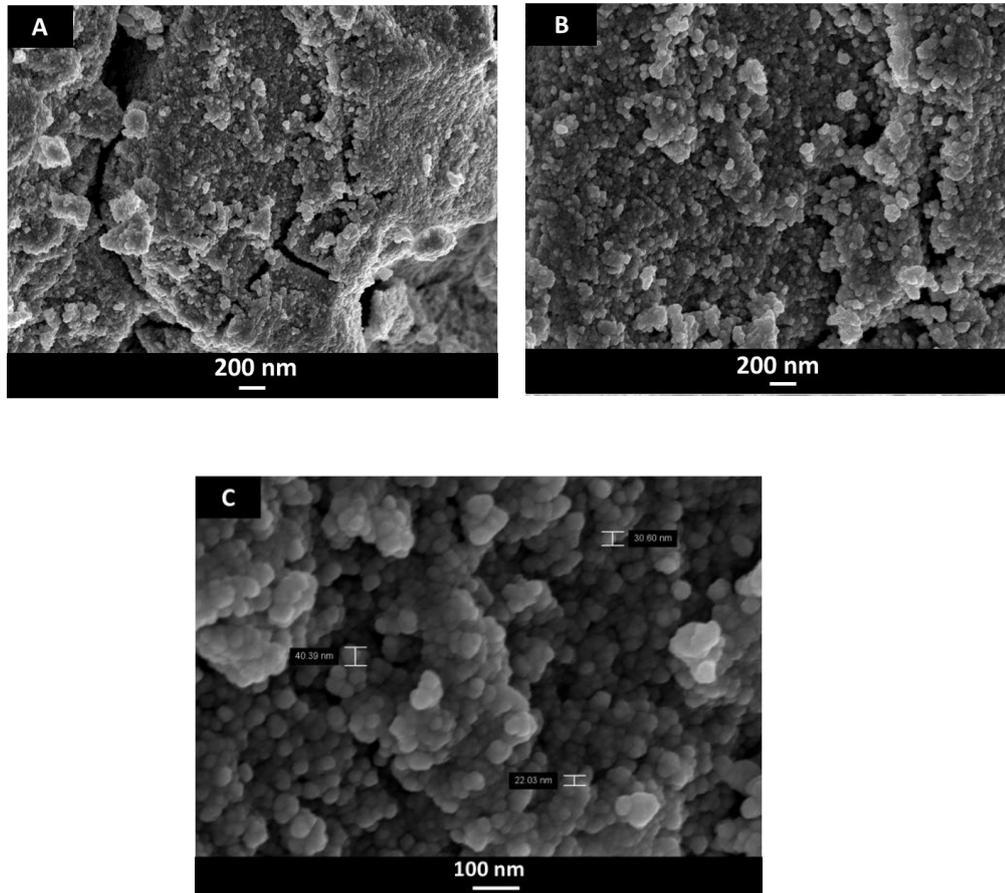


Figura 4.17 Immagini FESEM Ibu@Meso-ZnO-8 ore a diversi ingrandimenti: nel pannello A ingrandimento 50 KX, nel pannello B ingrandimento 100 KX e nel pannello C ingrandimento 300 KX

Durante la prova di incorporazione studiata, non si è verificato alcun fenomeno di accrescimento delle particelle né coalescenza delle unità nanometriche.

4.3.3 Prova di incorporazione 3 ore

4.3.3.1 Analisi di fisisorbimento di Azoto

L'isoterma (figura 4.18) e la curva rappresentativa della distribuzione dei pori (figura 4.19) sono riportati nelle figure successive:

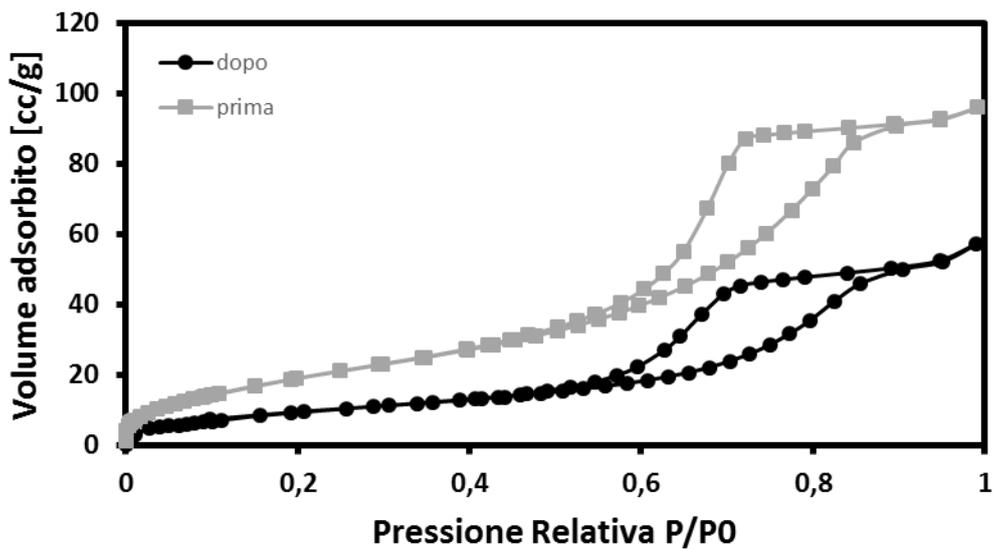


Figura 4.18 Isotherma di adsorbimento di azoto di Ibu@MesoZnO- 3 ore

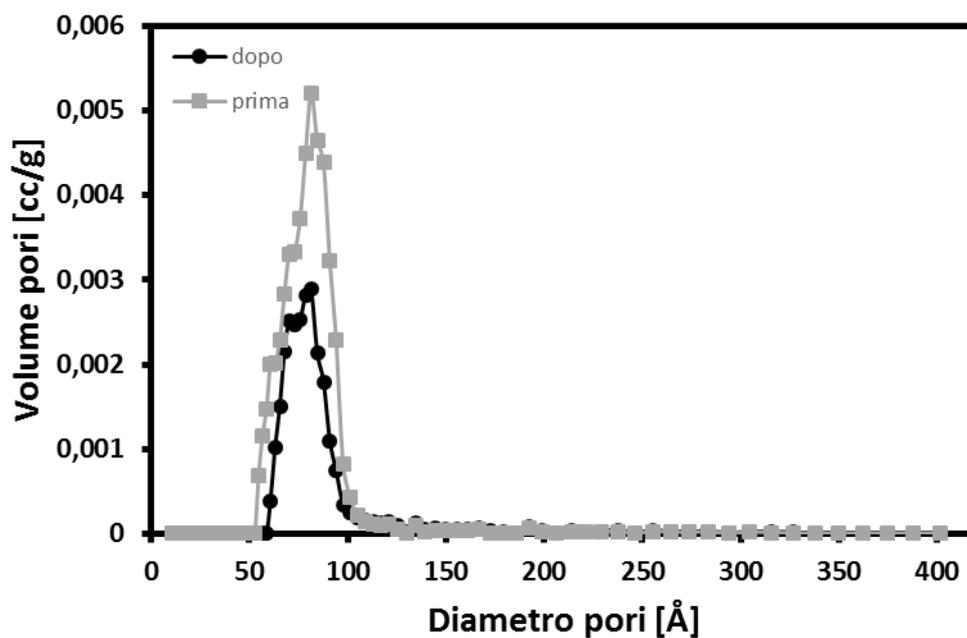


Figura 4.19 Distribuzione dei pori Ibu@MesoZnO-3 ore

I valori numerici ricavati dalla prova sono confrontati con quelli relativi all'ossido sintetizzato e sono mostrati nella tabella 4.3 riportata di seguito:

Tabella 4.3 Confronto dei parametri prima e dopo l'incorporazione di 3 ore

	Area superficiale [m²/g]	Volume dei pori [cc/g]	Diametro dei pori [Å]
PRIMA	75	0,140	81
DOPO	36	0,080	81

È evidente una riduzione dell'area superficiale, seppur in misura minore rispetto alle altre prove, indice dell'adsorbimento del farmaco all'interno di Meso-ZnO. Il volume dei pori subisce una diminuzione, probabilmente data dall'occupazione delle porosità da parte dell'Ibuprofene.

4.3.3.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

Di seguito, nella figura 4.20, viene riportato lo spettro FT-IR di Ibu@Meso-ZnO-3h:

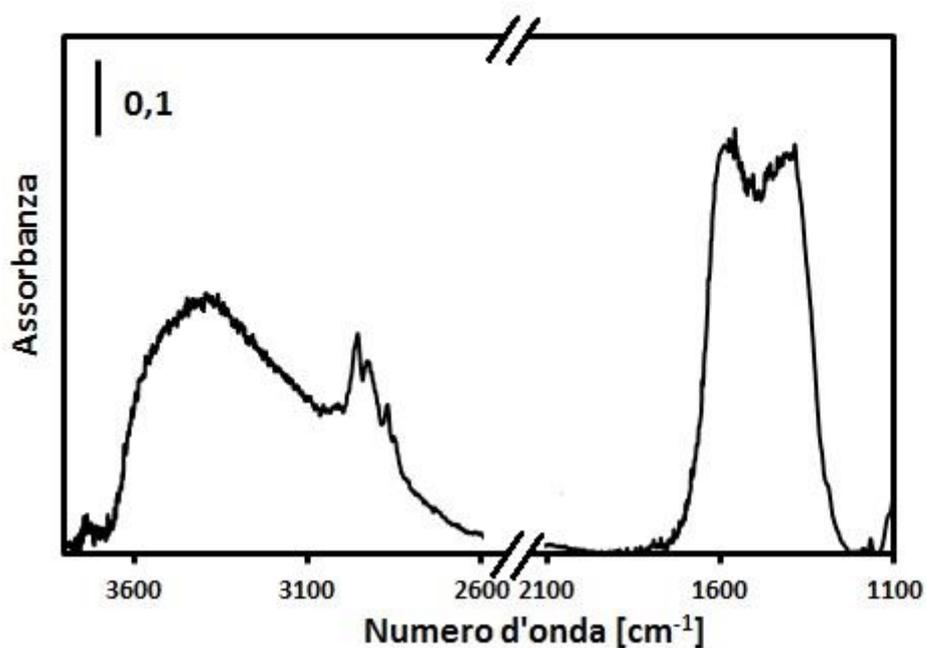


Figura 4.20 Spettro FT-IR di Ibu@Meso-ZnO-3 ore

Sebbene il tempo di contatto tra farmaco e carrier sia basso, l'Ibuprofene è presente all'interno di Meso-ZnO. Ciò è confermato dalla visualizzazione dei modi dell'Ibuprofene.

4.3.3.3 Diffrazione a raggi X

La seguente figura 4.20 mostra il diffrattogramma del campione ottenuto dalla prova di incorporazione di 3 ore:

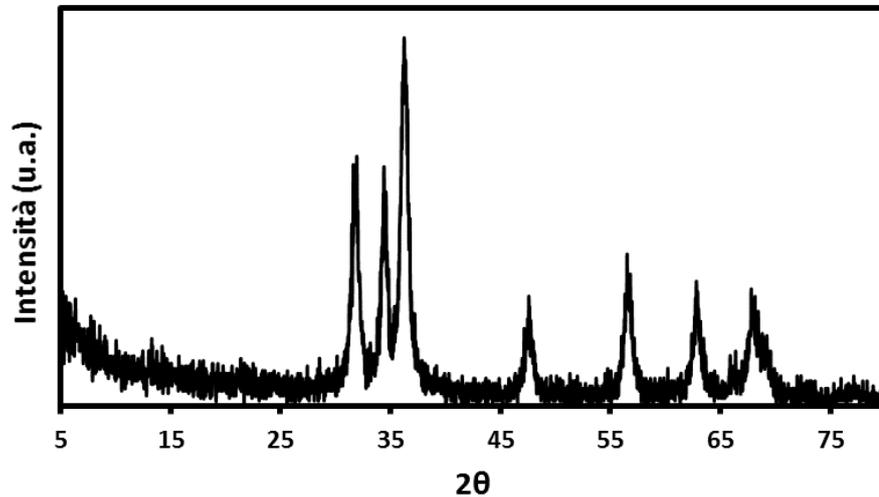


Figura 4.20- Spettro XRD di Ibu@Meso-ZnO-3h

Lo spettro evidenzia nuovamente un pattern cristallografico tipico della wurtzite esagonale.

4.3.4 Confronto delle incorporazioni a 24, 8 e 3 ore

Con lo scopo di confrontare i risultati delle caratterizzazioni effettuate sui campioni Ibu@Meso-ZnO-24h, Ibu@Meso-ZnO-8h e Ibu@Meso-ZnO-3h viene di seguito riportato il grafico riassuntivo con gli spettri di tutti e tre i campioni (figura 4.21):

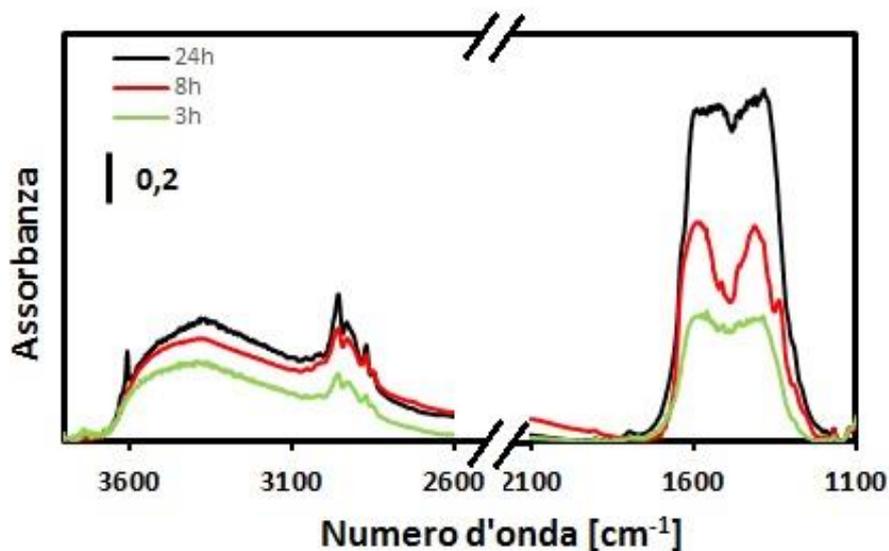


Figura 4.21 Confronto spettri FT-IR delle tre incorporazioni

Dalla valutazione del grado di carbonatazione, è emerso che il sistema relativo all'incorporazione di 8 ore (Ibu@Meso-ZnO-8h) risulta essere il campione più promettente, anche considerandone la percentuale di farmaco incorporata al suo interno. Valutazioni sulla % in massa del farmaco incorporato nei tre sistemi saranno fatte di seguito.

4.3.5 Trattamento dell'Ossido di Zinco con CO₂ supercritica: il "bianco"

4.3.5.1 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

L'Ossido di Zinco sottoposto all'azione di anidride carbonica supercritica (il cosiddetto "bianco") all'interno di un vessel, è stato analizzato mediante la tecnica spettroscopica che rivela il seguente spettro (figura 4.22):

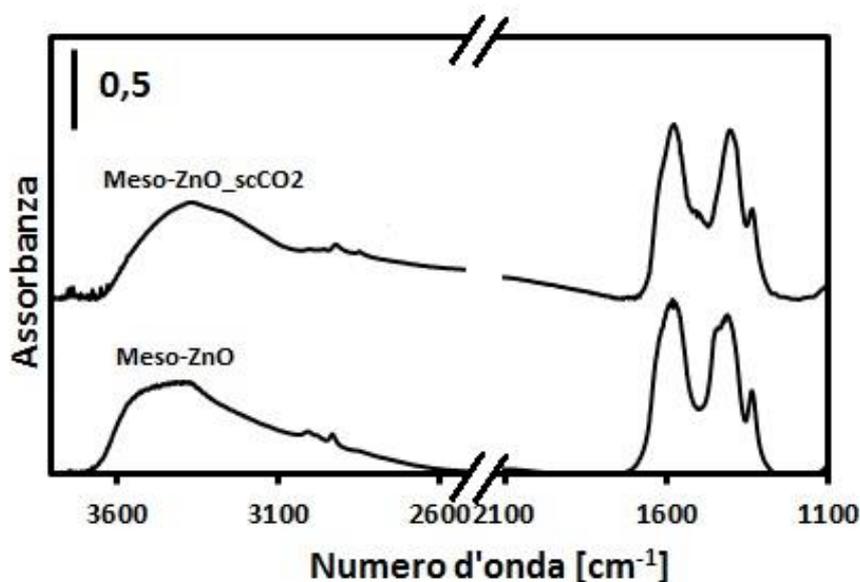


Figura 4.22 Confronto spettri FT-IR MesoZnO e MesoZnO_scCO₂

Dalla comparazione appare sorprendentemente elevata la similitudine tra i due spettri. Dunque, Meso-ZnO a contatto con scCO₂ per 8 ore esibisce una scarsa reattività, con un fenomeno di carbonatazione superficiale non rilevante.

4.3.5.2 Diffrazione a raggi X

Nella figura 4.23 viene confrontato il diffrattogramma di Meso-ZnO con quello di Meso-ZnO esposto a scCO₂:

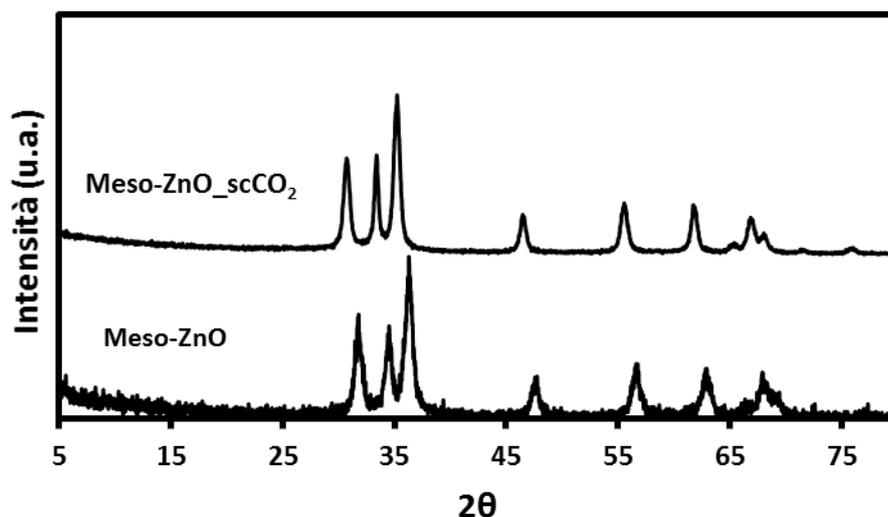


Figura 4.23 Confronto spettri XRD tra Meso-ZnO e Meso-ZnO_scCO₂

Dal confronto non emerge alcuna differenza nei picchi di Meso-ZnO_scCO₂ rispetto a Meso-ZnO, pertanto il campione continua ad essere in forma cristallina wurtzite. Anche in assenza di farmaco, il materiale non subisce alcuna trasformazione in Carbonato di Zinco.

4.4 Quantificazione dell'Ibuprofene incorporato

4.4.1 Rette di taratura

Le rette di taratura dell'Ibuprofene sono state valutate in Etanolo (figura 4.24) e in Tampone Fosfato salino (figura 4.25). Di seguito sono riportati i risultati ottenuti:

In Etanolo:

Tabella 4.4 Valori di Assorbanza ottenuti in EtOH

CONCENTRAZIONE	ASSORBANZA
µg/ml	
500	0,687
250	0,368
100	0,155
50	0,080
0	0

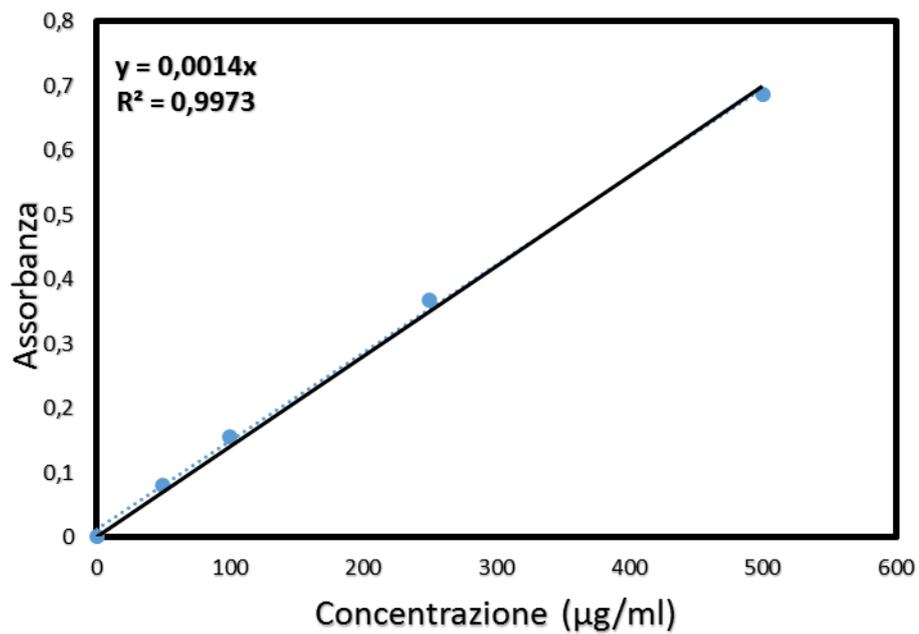


Figura 4.24 Retta di taratura dell'Ibuprofene in Etanolo

In Tampone Fosfato salino:

Tabella 4.5 Valori di Assorbanza ottenuti in PBS

CONCENTRAZIONE	ASSORBANZA
$\mu\text{g/ml}$	
500	0,878
250	0,450
100	0,191
50	0,105
25	0,083
10	0,033
0	0

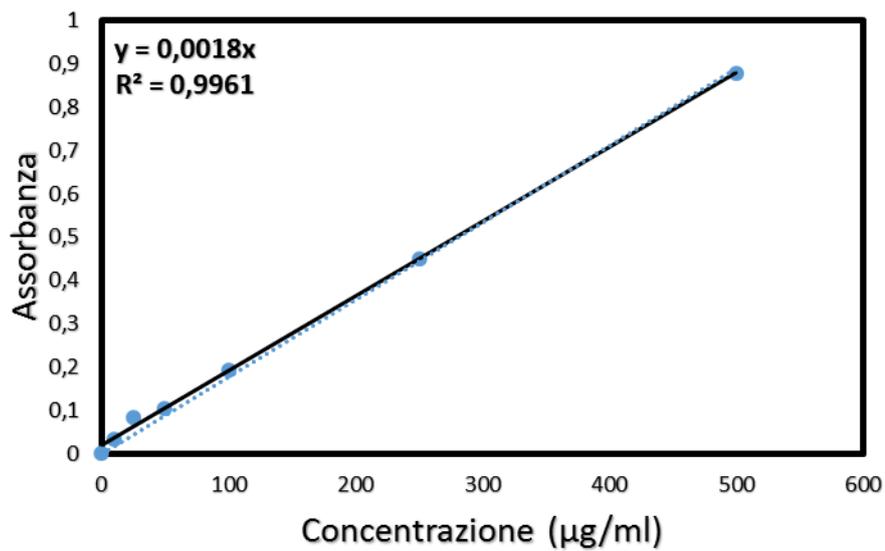


Figura 4.25 Retta di taratura dell'Ibuprofene in PBS

Il coefficiente di determinazione delle due rette risulta essere pari all'incirca all'unità, ciò significa che il modello scelto bene i dati sperimentali.

4.4.2 Valutazione della “Drug Loading Capacity”

I calcoli effettuati per l’ottenimento dell’efficienza di incorporazione (Eq.1) hanno portato ai seguenti risultati (tabella 4.6 e tabella 4.7):

Tabella 4.6 Valori numerici ottenuti dal rilascio in Etanolo

Rilascio in Etanolo	CONCENTRAZIONE [µg/ml]	MASSA IBUPROFENE [mg]	DRUG LOADING CAPACITY (%)
Ibu@Meso-ZnO 24h	323,57	1,94	19
Ibu@Meso-ZnO 8h	256,43	7,69	15
Ibu@Meso-ZnO 3h	78,57	2,36	4,6

Tabella 4.7 Valori numerici ottenuti dal rilascio in PBS

Rilascio in PBS	CONCENTRAZIONE [µg/ml]	MASSA IBUPROFENE [mg]	DRUG LOADING CAPACITY (%)
Ibu@Meso-ZnO-24h	146,11	0,88	9
Ibu@Meso-ZnO-8h	118,89	3,57	6,7
Ibu@Meso-ZnO-3h	87,22	2,62	5,2

I dati sopra riportati dimostrano che l’Etanolo permette una maggiore estrazione del farmaco rispetto al Tampone Fosfato salino. Questo risultato è in linea con la letteratura, considerando la maggiore solubilità in etanolo dell’ibuprofene (25 mg/ml) rispetto all’acqua (0,021 mg/ml).

I risultati mostrano che la quantità di farmaco supportato nel materiale aumenta all’aumentare del tempo di contatto. La figura 4.26 mostra la correlazione tra il drug loading (espresso come percentuale in massa di farmaco) e la durata del processo in scCO₂, in ore:

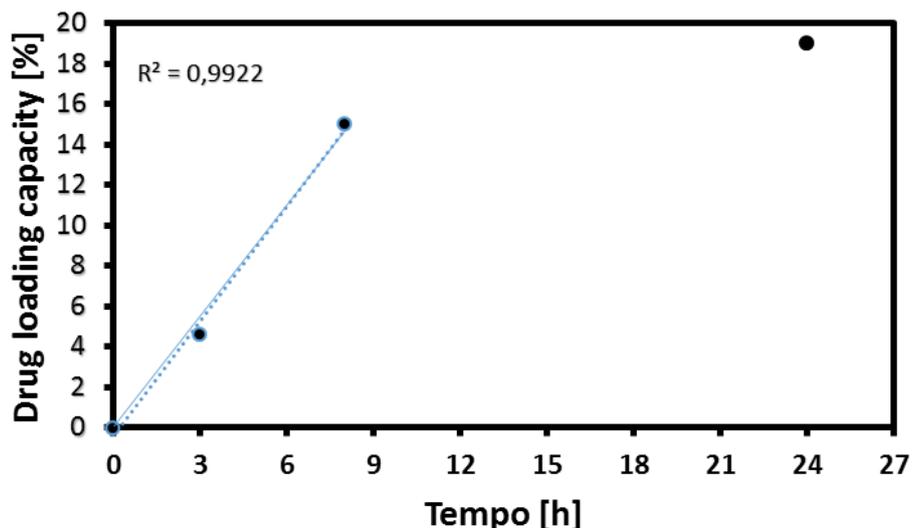


Figura 4.26 Correlazione tra il tempo di contatto e il drug loading

Si osserva una correlazione lineare fino a 8 ore, tempo al quale il drug loading raggiunge un valore del 15% in massa. Passando da 8 a 24 ore si osserva un piccolo incremento del drug loading (pari a circa il 4 %).

Ciò avvalorza l'idea che Ibu@Meso-ZnO-8 ore è il sistema più interessante, presentando dei privilegi rispetto agli altri due. Comunque, il risultato è in linea con ciò che è riportato in letteratura: all'aumentare del tempo di contatto aumenta l'efficienza di incorporazione [43].

4.5 Confronto degli spettri XRD delle tre incorporazioni

L'analisi XRD è stata effettuata per tutte e tre le prove di incorporazione e nella figura 4.27 viene riportato il grafico che confronta i vari diffrattogrammi ottenuti con lo spettro dell'ossido di zinco sintetizzato:

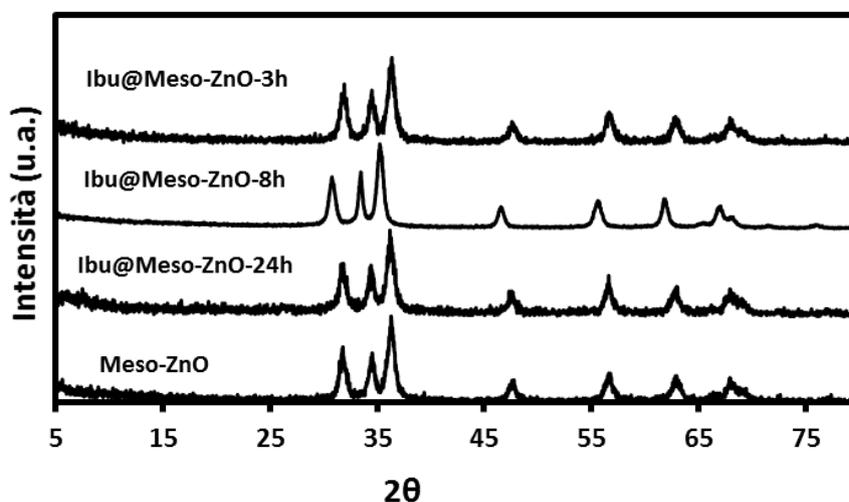


Figura 4.27 Confronto XRD tra Meso-ZnO e Ibu@Meso-ZnO a varie tempistiche

Dal confronto tra lo spettro dei tre campioni e lo spettro di Meso-ZnO è possibile constatare che Ibu@Meso-ZnO non subisce alcuna trasformazione, conservando la struttura cristallina tipica della wurtzite. Dunque, si può concludere che in seguito al processo con CO₂ supercritica sia avvenuto solo un fenomeno di carbonatazione superficiale, senza alcuna trasformazione di fase del materiale. Inoltre, la sovrapposibilità quasi perfetta dei loro spettri con quello di Meso-ZnO dimostra che il farmaco, seppur presente come è stato osservato con altre tecniche, risulta essere in forma amorfa.

4.6 Valutazione del grado di ricoprimento

Nel seguente paragrafo si vuole descrivere il grado di impaccamento, ovvero la distribuzione del farmaco sulla superficie e all'interno del volume del carrier.

4.6.1 Determinazione del numero di molecole per unità di superficie e di volume

La stima del numero di molecole per nm² relative ai campioni delle tre prove di incorporazione (24h, 8h, 3h) è stata effettuata assumendo come riferimento l'area superficiale del carrier sintetizzato, pari a 75 m²/g.

Grazie al calcolo della "Drug Loading Capacity", mediante il peso molecolare del farmaco che è pari a 206,3 g/mol, si è risaliti al numero di moli di Ibuprofene incorporato per grammo di Ossido di Zinco mesoporoso. Successivamente, utilizzando l'area superficiale prima citata, è stato calcolato il numero di moli per m², poi convertito nel quantitativo di molecole presenti in un nm², facendo uso del Numero di Avogadro.

La valutazione del numero di molecole per nm³ è stata eseguita allo stesso modo del calcolo precedente, utilizzando come dato di partenza non più l'area superficiale di Meso-ZnO, ma il volume caratteristico dei pori.

Il calcolo è stato eseguito in relazione al rilascio in Etanolo, visti i migliori risultati ottenuti, e i valori numerici sono di seguito riportati (tabella 4.8):

Tabella 4.8 Rappresentazione del numero di molecole per unità di superficie e di volume

	Drug loading capacity (%)	Molecole/nm²	Molecole/nm³
Ibu@MesoZnO-24h	19	9	5
Ibu@MesoZnO-8h	15	7	4
Ibu@MesoZnO-3h	4,6	2	1

4.6.2 Organizzazione del farmaco sulla superficie

La stima effettuata consente di ragionare sul tipo di adsorbimento che è avvenuto durante i processi di incorporazione. L'ingombro della molecola di Ibuprofene, come mostrato in figura 4.28, risulta avere la forma di un'ellisse con le seguenti dimensioni:

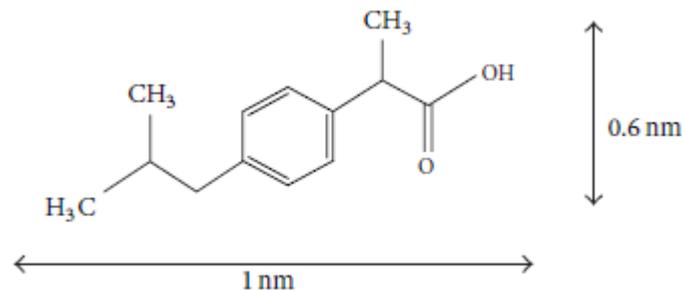


Figura 4.28 Molecola di Ibuprofene [54]

L'area della molecola di farmaco calcolata con le dimensioni indicate è pari a $0,47 \text{ nm}^2$, quindi possiamo stimare che in un monostato si abbiano due molecole per nm^2 . La presenza di 9, 7 e 2 molecole per nm^2 nei campioni permette di ipotizzare che si formano rispettivamente 4/5 strati e 3/4 strati rispettivamente per le prove di 24 ore e 8 ore, invece per la prova di 3 ore sembra esserci un adsorbimento monolayer.

4.6.3 Organizzazione del farmaco all'interno del volume del carrier

Per il seguente studio è stata rivolta l'attenzione sul campione ottenuto dalla prova di 8 ore. Al fine di valutare l'organizzazione del farmaco all'interno del volume del carrier, si considera 1g di carrier quale valore di riferimento iniziale. La % di *drug loading capacity* evidenzia che in 1g di carrier sono presenti 0,15g di Ibuprofene e 0,85g di ZnO. Dalla tecnica di fisisorbimento di azoto è stato ricavato che il carrier sintetizzato possiede un volume dei pori iniziale pari a $0,14 \text{ cm}^3/\text{g}_{\text{carrier}}$, quindi il primo obiettivo consiste nel calcolo del volume che si ha a disposizione in 0,85 g di ZnO. Questo valore è pari a $0,12 \text{ cm}^3$.

Si assume che la densità dell'Ibuprofene che è stato incorporato in ZnO sia pari a quella dell'Ibu cristallino, ovvero $1,03 \text{ g/cm}^3$. Come detto, l'Ibuprofene all'interno del carrier è presente allo stato amorfo, ma si ipotizza che la densità cristallina non si discosti molto dal valore reale di densità del farmaco supportato.

In seguito, si calcola il volume che occuperebbero 0,15g di Ibuprofene all'interno del carrier. Pertanto, rapportando 0,15g alla densità dell'Ibu cristallino, si ottiene un volume pari a $0,15 \text{ cm}^3$. Precedentemente, è stato calcolato che il volume a disposizione per 0,15g di Ibu è pari a $0,12 \text{ cm}^3$, quindi i due valori sono confrontabili. Inoltre, come evidenziato dall'analisi di adsorbimento di azoto del campione Ibu@Meso-ZnO-8h, il volume del carrier non è stato occupato tutto, ma è presente un volume residuo di $0,050 \text{ cm}^3/\text{g}$, come mostrato nella figura 4.29.

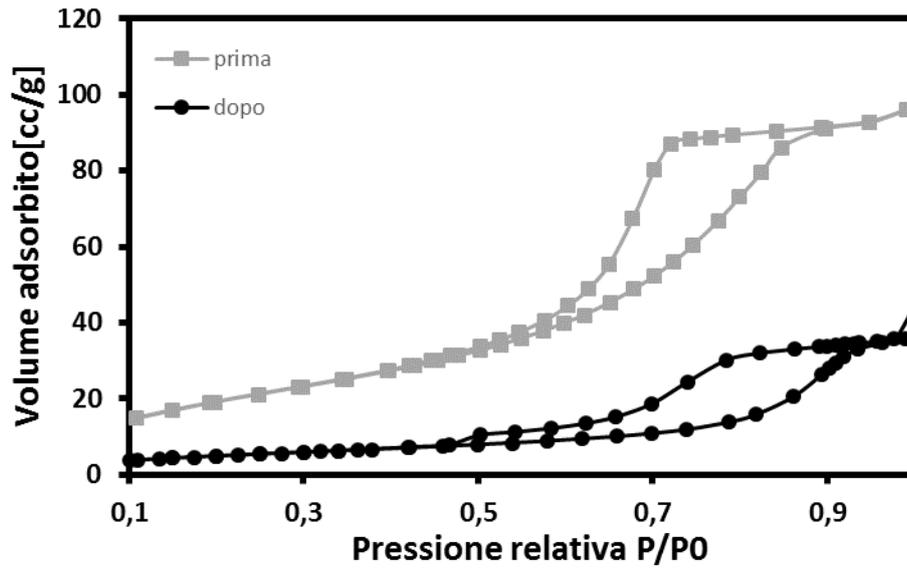


Figura 4.29- Isotherma di adsorbimento di azoto di Ibu@Meso-ZnO-8h

Quindi si può concludere che il farmaco non ha occupato tutto il volume a disposizione, ma ha formato un multilayer sulla superficie esterna, rispetto al volume poroso.

Conclusioni

Negli ultimi anni, l'ossido di zinco ha attirato un crescente interesse in diverse applicazioni, specialmente in ambito biomedico, grazie alle sue proprietà intrinseche. Lo studio dell'ZnO come sistema per il rilascio di farmaci è ancora in fase di evoluzione, soprattutto considerando la sua applicazione in ambito topico.

In questo lavoro di tesi sperimentale l'ZnO è stato scelto come *drug carrier* per applicazioni biomediche.

È stato sintetizzato ossido di zinco mesoporoso caratterizzato da un'elevata area superficiale, un significativo volume dei pori e una distribuzione monomodale dei pori. Queste caratteristiche rendono l'ossido di zinco un buon candidato per il rilascio di farmaci.

Per eseguire il processo di incorporazione del farmaco, è stata utilizzata la tecnologia basata su CO₂ supercritica. Tale scelta è giustificata dalla necessità di utilizzare un metodo innovativo che sia eco-compatibile per l'ottenimento dei *drug delivery systems*. Pertanto, la CO₂ allo stato supercritico è stata utilizzata al posto dei solventi organici, che presentano problemi di tossicità per la salute umana e per l'ambiente. Inoltre, al termine del processo basato sulla scCO₂, è stato ottenuto un prodotto pronto all'uso.

L'ibuprofene, farmaco anti-infiammatorio, è stato scelto come farmaco modello in questo lavoro, grazie al suo profilo scarsamente solubile in acqua e alle sue caratteristiche, utili in ambito dermatologico.

L'ibuprofene, per la prima volta, è stato incorporato nell'ossido di zinco tramite processo in scCO₂. La caratterizzazione dei campioni di meso-ZnO contenenti ibuprofene (Ibu@Meso-ZnO) ha evidenziato la presenza di farmaco in tutti e tre i campioni. Non è stata osservata alcuna modifica della struttura dell'ZnO, escludendo la trasformazione in Carbonato di Zinco. Inoltre, l'analisi XRD evidenzia che il farmaco non è in forma cristallina. Questo risultato è rilevante. Infatti, lo stato amorfo del farmaco è generalmente desiderabile nel contesto del rilascio di farmaci, poiché ne favorisce la dissoluzione e la biodisponibilità rispetto alla forma cristallina. Le tempistiche di contatto sono state studiate al fine di capire se ci fosse una correlazione tra il tempo di contatto e l'efficienza di incorporazione. I risultati ottenuti hanno confermato quanto atteso: all'aumentare del tempo di impregnazione aumenta la % di *drug loading*.

È stata effettuata una prova di rilascio dei campioni Ibu@Meso-ZnO nei solventi Etanolo e PBS, al fine di quantificare il farmaco presente.

I risultati mostrano che la quantità di farmaco supportato nel materiale aumenta all'aumentare del tempo di contatto. Si osserva una correlazione lineare fino a 8 ore, tempo al quale il drug loading raggiunge un valore del 15% in massa. Passando da 8 a 24 ore si osserva un piccolo incremento del drug loading (pari a circa il 4 %).

In seguito, è stato effettuato un tentativo di descrizione dell'organizzazione del farmaco sulla superficie e all'interno del volume del carrier. In particolare, è stata rivolta l'attenzione sul campione ottenuto dalla prova di 8h. Le evidenze sperimentali e i calcoli hanno portato a concludere che il farmaco non ha occupato tutto il volume poroso a disposizione, ma ha formato un multistrato sulla superficie interna ed esterna, rispetto al volume poroso.

Infine, è stata studiata la reattività dell'ossido di zinco mesoporoso con la scCO₂ nelle condizioni di incorporazione di ibuprofene. L'analisi del campione ottenuto ha evidenziato l'assenza di una fase di carbonato di zinco e di quantità significative di specie carbonato superficiali.

In conclusione, l'ossido di zinco è un buon candidato da utilizzare come *drug carrier*, presentando una significativa quantità di farmaco incorporato.

In futuro, si potrebbe cercare di:

- effettuare un test preliminare di rilascio del farmaco che simula l'ambiente fisiologico, studiandone la cinetica di rilascio;
- incorporare nuovi farmaci nell'ossido di zinco mesoporoso, mediante processo supercritico.

Bibliografia

- [1] N. Jones, B. Ray, K. T. Ranjit, and A. C. Manna, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 279, no. 1, pp. 71–76, 2008.
- [2] 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. 22, no. 12, pp. 1825–1834, 2017.
- [3] A. Król, P. Pomastowski, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, and B. Buszewski, "Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 249, pp. 37–52, 2017.
- [4] A. Kołodziejczak-Radzimska, T. Jesionowski, and A. Krysztalkiewicz, "Obtaining zinc oxide from aqueous solutions of KOH and Zn(CH₃COO)₂," *Physicochem. Probl. Miner. Process.*, vol. 44, pp. 93–102, 2010.
- [5] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N. Kaus, L. C. Ann, S. Bakhori, H. Hasan, D. Mohamad, "Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism," *Nano-Micro Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 219–242, 2015.
- [6] R. Kumar, A. Umar, G. Kumar, and H. S. Nalwa, "Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 5, pp. 3940–3961, 2017.
- [7] H. Mirzaei and M. Darroudi, "Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 907–914, 2017.
- [8] G. J. Owens, R. K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C. M. Han, C. Mahapatra, H. W. Kim, J. C. Knowles, "Sol-gel based materials for biomedical applications," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 77, pp. 1–79, 2016.
- [9] M. Martínez-Carmona, Y. Gun'ko, and M. Vallet-Regí, "ZnO Nanostructures for Drug Delivery and Theranostic Applications," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 4, p. 268, 2018.
- [10] P. Zhu, Z. Weng, X. Li, X. Liu, S. Wu, K. W. K. Yeung, X. Wang, Z. Cui, X. Yang, P. Chu, "Biomedical Applications of Functionalized ZnO Nanomaterials: From Biosensors to Bioimaging," *Adv. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 1, pp. 1–30, 2016.
- [11] H. M. Xiong, "ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 37, pp. 5329–5335, 2013.
- [12] S. Mitra, P. Patra, S. Chandra, N. Debnath, S. Das, R. Banerjee, S. Kundu, P. Pramanik, A. Goswami, "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.
- [13] T. Nayak, H. Wang, A. Pant, M. Zheng, H. Junginger, W. Goh, C. Lee, S. Zou, S. Alonso, B. Czarny, G. Storm, C. Sow, C. Lee, G. Pastorin, "ZnO Nano-Rod Devices for Intradermal Delivery and Immunization," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 6, p. 147, 2017.
- [14] Ö. Çinar Medeni, G. Baltacı, and G. Doğan Vayvay, "Acute effect of kinesiotape muscle technique on hamstring flexibility and pain during stretching," *Fiz. Rehabil.*, vol. 26, no. 2, pp. 73–77, 2015.

- [15] F. Leone, A. Gignone, S. Ronchetti, R. Cavalli, L. Manna, M. Banchemo, B. Onida, "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.
- [16] 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.
- [17] P. J. Ginty, M. J. Whitaker, K. M. Shakesheff, and S. M. Howdle, "Drug delivery goes supercritical," *Mater. Today*, vol. 8, no. 8 SUPPL., pp. 42–48, 2005.
- [18] R. K. Kankala, Y. S. Zhang, S. Bin Wang, C. H. Lee, and A. Z. Chen, "Supercritical Fluid Technology: An Emphasis on Drug Delivery and Related Biomedical Applications," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 16, 2017.
- [19] P. B. Deshpande, G.A. Kumar, A.R.Kumar, G.V. Shavi, A. Karthik, M.S. Reddy, N. Udupa, "Supercritical Fluid Technology: Concepts and Pharmaceutical Applications," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 65, no. 3, pp. 333–344, 2011.
- [20] M. Champeau, J. M. Thomassin, T. Tassaing, and C. Jérôme, "Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review," *J. Control. Release*, vol. 209, pp. 248–259, 2015.
- [21] I. Pasquali and R. Bettini, "Are pharmaceuticals really going supercritical?," *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no. 2, pp. 176–187, 2008.
- [22] 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.
- [23] X. Zhang, S. Heinonen, and E. Levänen, "Applications of supercritical carbon dioxide in materials processing and synthesis," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 105, pp. 61137–61152, 2014.
- [24] J. Zhang, K. G. Neoh, X. Hu, and E. T. Kang, "Mechanistic insights into response of *Staphylococcus aureus* to bioelectric effect on polypyrrole/chitosan film," *Biomaterials*, vol. 35, no. 27, pp. 7690–7698, 2014.
- [25] J. Kerc, S. Srcic, Z. Knez, and P. Sencar-Bozic, "Micronization of drugs using supercritical carbon dioxide," *Int. J. Pharm.*, vol. 182, no. 1, pp. 33–39, 1999.
- [26] J. N. Hay and a Khan, "Review - Environmentally friendly coatings using carbon dioxide as the carrier medium," *J. Mater. Sci.*, vol. 37, no. 22, pp. 4743–4752, 2002.
- [27] B. S. Sekhon, "Supercritical fluid technology: An overview of pharmaceutical applications," *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 810–826, 2010.
- [28] J. Peach and J. Eastoe, "Supercritical carbon dioxide: A solvent like no other," *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 10, pp. 1878–1895, 2014.
- [29] R. Laitinen, K. Lobmann, C. J. Strachan, H. Grohganz, and T. Rades, "Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs," *Int. J. Pharm.*, vol. 453, no. 1, pp. 65–79, 2013.
- [30] T. Vasconcelos, B. Sarmiento, and P. Costa, "Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs," *Drug Discov. Today*, vol. 12, no. 23–24, pp. 1068–1075, 2007.

- [31] P. Gurikov and I. Smirnova, "Amorphization of drugs by adsorptive precipitation from supercritical solutions: A review," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 132, pp. 105–125, 2018.
- [32] R. J. Ahern, A. M. Crean, and K. B. Ryan, "The influence of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) processing conditions on drug loading and physicochemical properties," *Int. J. Pharm.*, vol. 439, no. 1–2, pp. 92–99, 2012.
- [33] A. Nishiwaki, A. Watanabe, K. Higashi, Y. Tozuka, K. Moribe, and K. Yamamoto, "Molecular states of prednisolone dispersed in folded sheet mesoporous silica (FSM-16)," *Int. J. Pharm.*, vol. 378, no. 1–2, pp. 17–22, 2009.
- [34] J. Mitchell and J. H. Strange, "An NMR investigation of naphthalene nanostructures," *Mol. Phys.*, vol. 102, no. 19–20, pp. 1997–2005, 2004.
- [35] A. Gignone, M. Delle Piane, M. Corno, P. Ugliengo, and B. Onida, "Simulation and Experiment Reveal a Complex Scenario for the Adsorption of an Antifungal Drug in Ordered Mesoporous Silica," *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, no. 23, pp. 13068–13079, 2015.
- [36] B. S. K. Gorle, I. Smirnova, and W. Arlt, "Adsorptive crystallization of benzoic acid in aerogels from supercritical solutions," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 52, no. 3, pp. 249–257, 2010.
- [37] P. Marizza, L. Pontoni, T. Rindzevicius, J.F. Alopaeus, K. Su, J.A. Zeitler, S.S.Keller, I. Kikic, M.Moneghini, N. De Zordi, D. Solinas, A. Cortesi, A. Boisen "Supercritical impregnation of polymer matrices spatially confined in microcontainers for oral drug delivery: Effect of temperature, pressure and time," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 107, pp. 145–152, 2016.
- [38] R. Yoganathan, R. Mammucari, and N. R. Foster, "Impregnation of Ibuprofen into Polycaprolactone using supercritical carbon dioxide," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 215, pp. 6–11, 2010.
- [39] M. Braga, S.R. Marques, "Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 44, no. 2, pp. 245–257, 2008.
- [40] M. Braga and S.R. Marques, "Supercritical carbon dioxide processing of commercial contact lenses: sorption effects on drug loading," *Proc. 13th ...*, no. September, 2011.
- [41] A. R. C. Duarte, A.L. Simplicio, A. Vega-Gonzalez, P. Subra-Paternault, P.Coimbra, M. H. Gil, H.C. De Sousa, C. M. Duarte, "Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophthalmic drug delivery," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 42, no. 3 SPEC. ISS., pp. 373–377, 2007.
- [42] A. R. C. Duarte, J. F. Mano, and R. L. Reis, "Dexamethasone-loaded scaffolds prepared by supercritical-assisted phase inversion," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 6, pp. 2054–2062, 2009.
- [43] 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.
- [44] M. Bahrami and S. Ranjbarian, "Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 40, no. 2, pp. 263–283, 2007.
- [45] R. Bushra and N. Aslam, "Review Article An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen," vol. 25, no. 3, pp. 155–162, 2010.
- [46] M. L. Vueba, M. E. Pina, and L. A. E. B. D. E. Carvalho, "Conformational Stability of

- Ibuprofen : Assessed by DFT Calculations and Optical Vibrational Spectroscopy,” vol. 97, no. 2, pp. 845–859, 2008.
- [47] 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. 1–11, 2018.
- [48] 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.
- [49] P. A. Arciniegas-Grijalba, M. C. Patiño-Portela, L. P. Mosquera-Sánchez, J. A. Guerrero-Vargas, and J. E. Rodríguez-Páez, “ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) and their antifungal activity against coffee fungus *Erythricium salmonicolor*,” *Appl. Nanosci.*, vol. 7, no. 5, pp. 225–241, 2017.
- [50] Y. Kamari and M. Ghiaci, “Preparation and characterization of ibuprofen/modified chitosan/TiO₂ hybrid composite as a controlled drug-delivery system,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 234, pp. 361–369, 2016.
- [51] M. Delle Piane, M. Corno, A. Pedone, R. Dovesi, and P. Ugliengo, “Large-scale B3LYP simulations of ibuprofen adsorbed in MCM-41 mesoporous silica as drug delivery system,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 46, pp. 26737–26749, 2014.
- [52] S. R. Matkovic, G. M. Valle, and L. E. Briand, “Quantitative Analysis of Ibuprofen in Pharmaceutical Formula- Tions Through Ftir Spectroscopy,” *Lat. Am. Appl. Res.*, vol. 35, pp. 189–195, 2005.
- [53] S. Fiorilli, B. Camarota, E. Garrone, and B. Onida, “Carboxylic groups in mesoporous silica and ethane-bridged organosilica : effect of the surface on the reactivity w,” pp. 1201–1209, 2011.
- [54] G. Gonzalez, A. Sagarzazu, and T. Zoltan, “Influence of microstructure in drug release behavior of silica nanocapsules,” *J. Drug Deliv.*, vol. 2013, p. 803585, 2013.

Ringraziamenti

Eccomi qui, alla fine del mio percorso, a ripensare a tutto ciò che ho vissuto in questi anni. Non è per niente facile esprimere tutte le emozioni che mi hanno accompagnato in questo cammino, emozioni nuove, che mi hanno cambiata e, forse, anche un po' migliorata. Sono stati tre anni lunghi e faticosi, più volte ho creduto di non essere all'altezza, ma per fortuna in ogni momento "buio" ho ritrovato in me l'ambizione e la tenacia che da sempre mi caratterizzano.

Innanzitutto vorrei ringraziare la mia relattrice, la Prof.ssa Barbara Onida, per la professionalità e cordialità dimostrata in questi mesi.

Ringrazio la dottoranda che mi ha seguita, la Dottoressa Federica Leone, per aver dedicato il suo tempo nella risoluzione di tutti i miei dubbi, ma soprattutto per la passione con cui ha cercato di trasmettermi il suo sapere.

Ringrazio mamma e papà, per aver permesso la realizzazione di tutto questo. Grazie per gli innumerevoli sacrifici fatti in questi anni, ma soprattutto perché avete sempre creduto in me, anche nei momenti in cui non ci credevo neanche io. Grazie papà per l'amore incondizionato che mi hai insegnato, grazie per la tua emotività che ti caratterizza, per avermi dato sempre fiducia. Grazie mamma, per l'infinito affetto che mi hai trasmesso, grazie per avermi insegnato ad essere forte e determinata.

Grazie Chiara, per la tenerezza e dolcezza che ti caratterizza, sempre casa delle mie paure e debolezze. Grazie per la protezione che mi hai sempre rivolto, per aver risolto ogni mio problema anche a distanza, per esserti presa cura di me in ogni momento.

Grazie Giovannino, perché il tuo amore è stato per me motivo di forza in questi anni. Grazie per aver riempito le mie giornate di studio con i tuoi discorsetti, grazie per la ventata di allegria che hai portato nella mia vita.

Grazie Giovanni, che da anni mi supporti e sopporti come solo tu sai fare. Grazie per la fiducia, l'amore, la pazienza e le interminabili risate. Grazie per ogni abbraccio stretto datomi alle partenze, grazie per aver accarezzato le mie paure, regalandomi solo certezze in questi anni, anche a distanza.

Grazie zia Maria, per la profonda stima che nutri nei miei confronti, per il pensiero che mi rivolgi ogni giorno. Grazie per aver avuto sempre le parole giuste al momento giusto. Grazie per il legame unico che da sempre ci unisce.

Grazie Zia Antonietta, per le lacrime versate ad ogni mia partenza e per ogni tua parola di conforto.

Grazie alle mie coinquiline, colleghe, ma anzitutto amiche, con cui condiviso questa esperienza.

Grazie Valeria T., perché tu sei il mio successo migliore di questa esperienza. Grazie per la bella persona che sei, per tutto quello che mi hai regalato in questi anni. Grazie perché vivere in casa insieme è significato non essere mai sola. Grazie per avermi preso per mano in ogni momento e per avermi reso una persona migliore.

Grazie Giada, amica e complice di tante avventure. Grazie per il feeling speciale che abbiamo, grazie per avere condiviso insieme nuove esperienze e per aver vissuto momenti indimenticabili. Grazie per i nostri discorsi, per i momenti di shopping sfrenato e i buoni consigli che mi hai dato.

Grazie Valeria G., per questo percorso che abbiamo deciso di affrontare insieme con coraggio e determinazione. Grazie per i bei momenti trascorsi insieme e per il tuo appoggio, grazie per la sintonia e il bene che ci legano da anni.

Grazie alle mie amiche, per aver gioito con me in ogni mia vittoria.

Grazie Francesca, l'amica di sempre, colei che sono certa di avere sempre al mio fianco, nonostante tutto e tutti. Grazie per la tua presenza quotidiana, sebbene i chilometri che ci separano. Grazie per il legame unico che abbiamo, grazie perché mi fai riflettere quando ce n'è bisogno, grazie semplicemente per quello che sei.

Grazie Caterina, per essere stata sempre presente e per avermi incoraggiata quando il percorso universitario era in salita. Grazie per le risate che mi regali anche a distanza e per l'esplosività che ti caratterizza.

Grazie Federica G., per le nostre lunghe chiacchierate e per aver ascoltato sempre i miei sfoghi.

Grazie Jessica, per l'attenzione e l'affetto che mi hai rivolto in ogni mio momento no, grazie per i momenti condivisi, ma soprattutto per avermi coinvolto nella tua vita.

Grazie Betty, perché sei sempre riuscita a strapparmi un sorriso, anche quando ne avevo più bisogno. Grazie per la semplicità e l'allegria che ti caratterizzano, grazie per tutti i momenti piacevoli trascorsi insieme.

Inoltre, ringrazio tutti coloro che in Cielo hanno vegliato su di me e tutti gli altri, parenti ed amici, che hanno creduto e credono in me.

Grazie a tutti!