

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
Idrocortisone**



Relatore

Prof. Barbara Onida

Correlatore

Prof. Mauro Banchero

Candidato
Giada Pisano

Novembre 2018

*Alla gioia di questo traguardo,
alle notti insonni prima di un esame,
ai sacrifici del successo raggiunto,
alle mie debolezze e alla mia forza,
a me stessa.*

Sommario

Acronimi	i
Introduzione	iii
Capitolo 1	1
Sistemi per rilascio di farmaci	1
1.1 Nanotecnologia e dermatologia	1
1.2 Nanoparticelle per la terapia topica	3
1.2.1 Nanoparticelle polimeriche	4
1.2.2 Dendrimeri	5
1.2.3 Nanoparticelle solide lipidiche (SLN) e Carrier lipidici nanostrutturati (NLC).....	5
1.2.4 Liposomi	6
1.2.5 Nanoemulsioni	7
1.2.6 Nanoparticelle inorganiche	7
1.2.6.1 Silice.....	7
1.2.6.2 Nanoparticelle di biossido di titanio e ossido di zinco.....	8
Capitolo 2	11
Ossido di Zinco: dalle generalità alle applicazioni biomediche	11
2.1: Generalità e proprietà di ZnO	11
2.2 Metodi di sintesi dell'ossido di zinco	13
2.2.1 Metodi chimici	14
2.2.2 Metodi fisici	15
2.2.3 Metodi biologici.....	16
2.3 Applicazioni dell'ossido di zinco in ambito biomedico	16
2.3.1 Attività antibatterica.....	17
2.3.2 Attività antifunginea	18
2.3.3 Attività antidiabetica.....	18
2.3.4 Attività antinfiammatoria.....	18
2.3.5 Attività antitumorale	19
2.3.6 ZnO in Drug Delivery Systems.....	20
Capitolo 3	21
Metodi di impregnazione dei farmaci cortisonici in ossido di zinco	21
3.1 Incipient Wetness Impregnation (IWI).....	21
3.2 Impregnazione con CO ₂ supercritica.....	21
3.2.1 L'anidride carbonica supercritica	22
3.3 Amorfismo e cristallizzazione di farmaci.....	23

3.4 Farmaci cortisonici	24
Capitolo 4	27
Materiali e metodi	27
4.1 Materiali.....	27
4.2 Sintesi dell'Ossido di Zinco Mesoporoso.....	27
4.3 Adsorbimento da CO ₂ supercritica	28
4.4 Incipient wetness impregnation (IWI).....	29
4.5 Invecchiamento.....	29
4.6 Rilascio dell'Idrocortisone	30
4.7 Metodi di caratterizzazione	32
4.7.1 Analisi di fisisorbimento ad azoto	32
4.7.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier	32
4.7.3 Diffratometria a raggi X.....	32
4.7.4 Spettroscopia UV	32
Capitolo 5	33
Risultati	33
5.1 Caratterizzazione dell'Ossido di Zinco mesoporoso	33
5.1.1 Analisi di fisisorbimento ad azoto	33
5.1.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier.....	34
5.1.3 Diffratometria a Raggi X	35
5.2 Caratterizzazione Idrocortisone.....	36
5.2.1 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier.....	36
5.2.2 Diffratometria a Raggi X	37
5.3 Caratterizzazione del Cortisone.....	38
5.3.1 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier.....	38
5.3.2 Diffratometria a Raggi X	39
5.4 Caratterizzazione di HC@Meso-ZnO dopo adsorbimento da CO ₂ supercritica.....	39
5.5 Caratterizzazione di HC@Meso-ZnO_15% dopo Incipient Wetness Impregnation.....	40
5.5.1 Diffratometria a Raggi X	40
5.5.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier.....	41
5.5.3 Analisi di fisisorbimento ad azoto	42
5.5.3.1 Confronto dei sistemi HC@Meso-ZnO e IBU@Meso-ZnO.....	43
5.6 Caratterizzazione di HC@Meso-ZnO_8% dopo Incipient wetness Impregnation.....	45
5.6.1 Diffratometria a Raggi X	45
5.6.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier.....	46

5.6.3 Analisi di fisisorbimento ad azoto	47
5.7 Caratterizzazione di COR@Meso-ZnO_8% dopo Incipient Wetness Impregnation	48
5.7.1 Diffrazione a Raggi X	48
5.7.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier.....	49
5.7.3 Analisi di fisisorbimento ad azoto	49
5.8 Effetto del tempo sulla cristallizzazione di HC@Meso-ZnO_15%	51
5.9 Effetto del tempo e dell'umidità sulla cristallizzazione di HC@Meso-ZnO_15%	52
Capitolo 6	55
Rilascio di Idrocortisone	55
6.1 Retta di taratura	55
6.2 Confronto curve di rilascio di Idrocortisone.....	56
6.3 Confronto cinetiche di rilascio di HC@Meso-ZnO_15% e di CTZ@Meso-ZnO.....	57
Conclusioni.....	59
Bibliografia	61
Ringraziamenti	67

Acronimi

Drug delivery system

Nanoparticelle

Ossido di Zinco

Ossido di Zinco mesoporoso

Nanoparticelle di Ossido di Zinco

Idrocortisone

Cortisone

Anidride carbonica supercritica

Incipient wetness impregnation

Etanolo

Tampone fosfato alcalino

Idrocortisone in Ossido d Zinco
mediante scCO₂

Ossido di Zinco con Idrocortisone al 15%

Ossido di Zinco con Idrocortisone a 8%

Ossido di Zinco con Cortisone a 8%

Ossido di Zinco con Idrocortisone al 15%
invecchiato in ambiente asciutto

Ossido di Zinco con Idrocortisone al 15%
invecchiato in ambiente umido

Ossido di Zinco invecchiato in ambiente umido

Ibuprofene in Ossido di Zinco mediante CO₂
Supercritica

Clotrimazolo in Ossido di Zinco

Analisi di fisisorbimento di azoto

Diffratometria a raggi x

Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

DDS

NPs

ZnO

Meso-ZnO

ZnO-NPs

HC

COR

scCO₂

IWI

EtOH

PBS

HC@Meso-ZnO_scCO₂

HC@ Meso-ZnO_15%

HC@ Meso-ZnO_8%

COR@Meso-ZnO_8%

HC@Meso-ZnO_15%_SECCO

HC@Meso-ZnO_15%_UMIDO

Meso-ZnO_UMIDO

IBU@Meso-ZnO

CTZ@Meso-ZnO

BET

XRD

FT-IR

Introduzione

Negli ultimi decenni, le nanoparticelle sono state studiate per le applicazioni nel settore biomedico sviluppando nuovi sistemi di somministrazione di farmaci. In questo ambito vengono inseriti i sistemi di *drug delivery*, in cui il farmaco, caricato in una matrice organica o inorganica, viene veicolato in una zona specifica del corpo umano in modo controllato riducendo la tossicità e gli effetti collaterali; viene, inoltre, ridotta la dose di principio attivo farmaceutico necessaria per il paziente [1]. L'applicazione topica dei DDs favorisce una maggiore biodisponibilità del principio attivo che tende a disperdersi nello stato amorfo all'interno del *carrier*. Nella fase di dissoluzione, il principio attivo nella fase amorfa viene rilasciato in modo più veloce in quanto l'energia necessaria per rompere i legami è minore rispetto al corrispondente farmaco cristallino.

L'ossido di zinco è un materiale inorganico usato come matrice di supporto nei *drug delivery systems* per le sue proprietà fisiche e chimiche che lo rendono un nanomateriale versatile, biocompatibile e non tossico. Viene, infatti, riconosciuto come sostanza sicura (GRAS) dalla “*Food and Drug Administration*” [2]. Nel campo biomedico è studiato per le sue proprietà antibatterica, antinfiammatoria, antifunginea e antitumorale.

Il lavoro di tesi si inserisce nell'ambito farmaceutico e nella sperimentazione dei sistemi di farmaci a rilascio controllato per trattamenti dermatologici; è stato scelto l'ossido di zinco mesoporoso come *carrier* di principi attivi cortisonici. Si vuole realizzare, quindi, un nuovo sistema di *drug delivery* in cui si combinano l'azione antibatterica dell'ossido di zinco e le proprietà antinfiammatorie dell'idrocortisone. L'impregnazione del farmaco è stata effettuata mediante *Incipient Wetness Impregnation* (IWI) e tecnica “green” con CO₂ supercritica. Nella parte conclusiva del lavoro sperimentale è stato studiato il profilo di rilascio dell'idrocortisone dalla matrice.

Nel primo capitolo viene spiegata la nuova strategia di somministrazione di farmaci per le applicazioni sulla pelle evidenziando i vantaggi dei DDs rispetto alle terapie tradizionali. Vengono, inoltre, illustrate in breve le nanoparticelle più utilizzate come *carrier* di farmaci.

Il secondo capitolo pone l'attenzione sull'ossido di zinco e le sue proprietà fisiche e chimiche; vengono spiegati i vari metodi di sintesi delle nanoparticelle che determinano le varie morfologie assunte dal materiale e le proprietà mostrate nelle applicazioni in ambito biomedico.

L'obiettivo del terzo capitolo consiste nella descrizione dei metodi di impregnazione usati durante la sperimentazione e i vantaggi dell'uso della scCO₂. Nella parte finale vengono esposti i farmaci, idrocortisone e cortisone, con le loro caratteristiche.

Nel quarto capitolo inizia la parte sperimentale illustrando le metodologie e la strumentazione utilizzate nel lavoro di tesi.

Il quinto capitolo raccoglie i risultati elaborati dalle prove effettuate riguardo la caratterizzazione dell'ossido di zinco sintetizzato, i sistemi ottenuti con le due tecniche di impregnazione, gli effetti del tempo e dell'umidità sulla cristallizzazione dell'idrocortisone supportato sul *carrier*.

Nell'ultimo capitolo sono riportati i profili di rilascio dell'idrocortisone dall'ossido di zinco mesoporoso e il confronto con il farmaco puro cristallino.

Capitolo 1

Sistemi per rilascio di farmaci

La nanotecnologia è una scienza multidisciplinare in cui chimici, fisici, biologi e scienziati hanno svolto un ruolo importante per lo sviluppo di nuovi trattamenti e sistemi da applicare in vari settori, come la medicina, l'agricoltura e l'ingegneria [3].

Nei campi biomedico e farmaceutico, i nanomateriali vengono manipolati per ottenere nuovi tipi di biosensori, utilizzati nella diagnostica, o per sviluppare nuovi sistemi per la somministrazione di farmaci (nanoparticelle per *drug delivery system*).

Il termine nanomateriale include tutti i materiali con almeno una dimensione compresa tra 1 nm e 100 nm [4].

1.1 Nanotecnologia e dermatologia

I sistemi di *drug delivery* rappresentano un metodo alternativo di somministrazione di farmaci a rilascio controllato tramite il quale è possibile ottenere vantaggi rispetto alle terapie farmacologiche tradizionali; l'intera quantità di farmaco necessaria per il paziente viene somministrata in un'unica dose in modo controllato.

Un altro effetto positivo di tali sistemi consiste nella possibilità di circoscrivere l'azione del farmaco e rilasciarlo in una specifica zona del corpo umano, riducendo la tossicità ed evitando il suo contatto con gli organi non interessati.

Nei *drug delivery systems*, micro e nanoparticelle vengono utilizzate come *carrier* in cui il principio attivo è dissolto, incapsulato o adsorbito, [5] e viene, successivamente rilasciato per diffusione o disgregazione della matrice di supporto.

Questi metodi innovativi vengono studiati in campo dermatologico per curare le ferite della pelle, le dermatiti, le infezioni batteriche e/o fungine, la psicosi e alcuni stati pre-cancerosi della pelle.

Skin Drug Delivery Systems sviluppano sistemi di farmaci capaci di modificarne la penetrazione/permeazione nelle zone più profonde della pelle, superando la barriera dell'epidermide e garantendo un contatto diretto con lo strato corneo, aumentare il periodo di permanenza del principio attivo sulla pelle. [6]

Un'applicazione topica di *drug delivery*, per esempio, comprende nanoparticelle di argento che presentano un'elevata attività antimicrobica; le nanoparticelle rilasciano lentamente ioni argento sulla pelle che possono inibire la proliferazione microbica e accelerare la guarigione delle ferite. [7]

La pelle ricopre un ruolo importante per il corpo umano; è definita come una barriera protettiva che evita gli attacchi degli agenti chimici e fisici esterni, dei microrganismi e protegge dalle radiazioni ultraviolette.

La pelle è organizzata in una struttura multistrato e comprende tre strati: epidermide, derma e ipoderma, come si può notare dalla figura seguente:

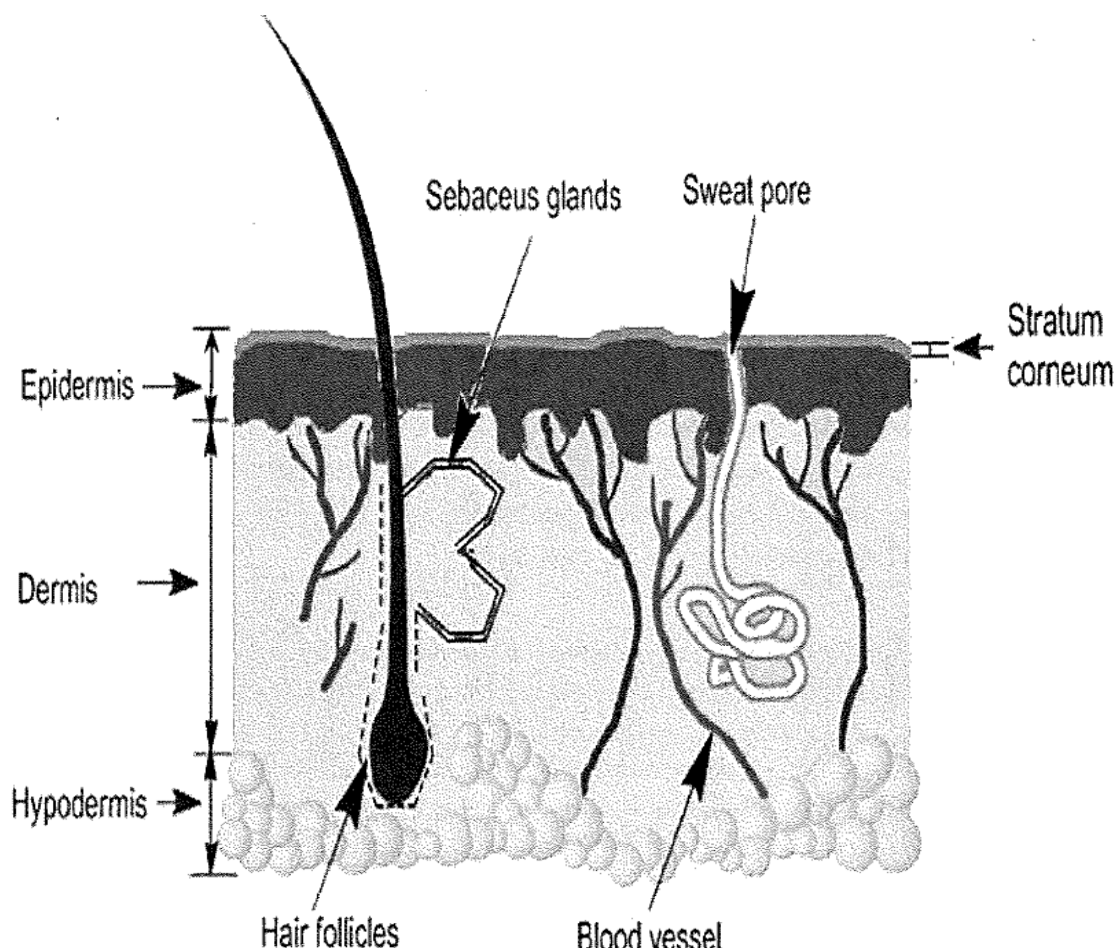


Figura 1.1: Rappresentazione della struttura della pelle [8]

La funzione di protezione è attribuita allo strato corneo, la parte più esterna dell'epidermide [9]. È costituito da una struttura lamellare che aumenta la resistenza alla permeazione della pelle riducendo il passaggio di molecole, in particolare quelle con dimensione superiore a 500 Da [10], rappresentando un ostacolo alla terapia topica tradizionale di farmaci.

Le nanotecnologie, perciò, sviluppano nuove strategie, per esempio, sistemi basati sull'uso di nanoparticelle con farmaco incorporato capaci di superare lo strato corneo e curare le malattie dermatologiche. Conoscendo l'interazione tra le NPs e gli strati della pelle, si possono variare le caratteristiche fisico-chimiche (dimensione, forma, area superficiale) dei nanomateriali individuando la matrice più idonea a svolgere il ruolo di *carrier* e favorire, quindi, la somministrazione del principio attivo.

L'applicazione topica dei DDS ha portato molti vantaggi rispetto alle vie tradizionali di somministrazione, ad esempio:

- Maggiore biodisponibilità del farmaco e rilascio controllato [11];
- Biocompatibilità del nanomateriale di supporto;
- Il principio attivo è diretto nella sola zona bersaglio del sito cutaneo riducendo la tossicità e gli effetti collaterali;
- Diminuzione delle dosi del farmaco da somministrare al paziente [1].

La seguente figura [10] confronta il trasporto del principio attivo attraverso la pelle nel caso di terapia topica tradizionale e nei nuovi sistemi di *drug delivery*:

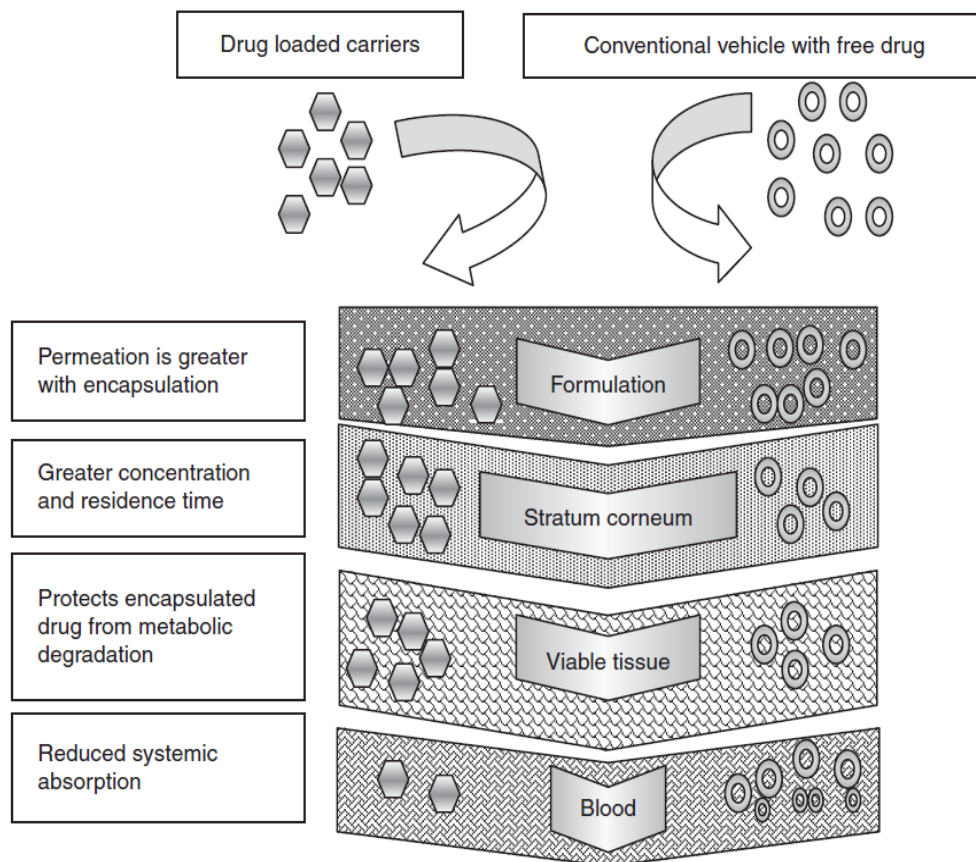


Figura 1.2: Rappresentazione schematica del trasporto di farmaco attraverso la pelle

Si possono osservare i benefici del DDS rispetto alla somministrazione con farmaco puro, infatti, la concentrazione di principio attivo che permea lo strato corneo dell'epidermide è maggiore e cresce il tempo di residenza in tale strato. La sostanza caricata nel *carrier* è protetta dalla degradazione metabolica, inoltre, l'assorbimento del farmaco nel sangue è più basso rispetto alla terapia tradizionale, evidenziando, quindi, una minore tossicità del nuovo sistema di *drug delivery*.

1.2 Nanoparticelle per la terapia topica

L'uso delle nanoparticelle come *carrier* di farmaci consente di aumentare la solubilità del principio attivo idrofobo, ridurre la tossicità del farmaco incorporato e gli effetti collaterali sulla cute, per esempio, l'irritazione della pelle. Le loro caratteristiche fisico-chimiche, come la rigidità, l'idrofobicità, la dimensione e la forma, sono importanti nello studio del meccanismo di permeazione attraverso la pelle [6].

I materiali più studiati come matrici di supporto per il *drug delivery system* sono: nanoparticelle polimeriche, nanoparticelle a base lipidica (liposomi e nanoemulsioni), nanoparticelle inorganiche, come si evince nella classificazione seguente:

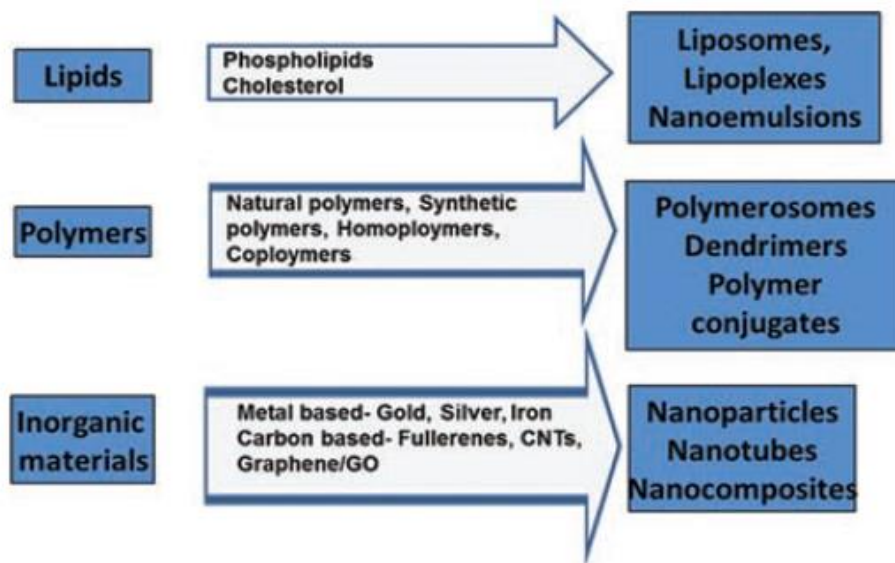


Figura 1.3: Rappresentazione schematica dei materiali usati come DDS [11]

1.2.1 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono costituite da polimeri biocompatibili e biodegradabili; possono essere di origine sintetica, come l'acido polilattico (PLA) e l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), e di origine naturale come il chitosano o l'alginate.

I *carrier* polimerici si possono classificare in nanosfere e nanocapsule, (figura 1.4):

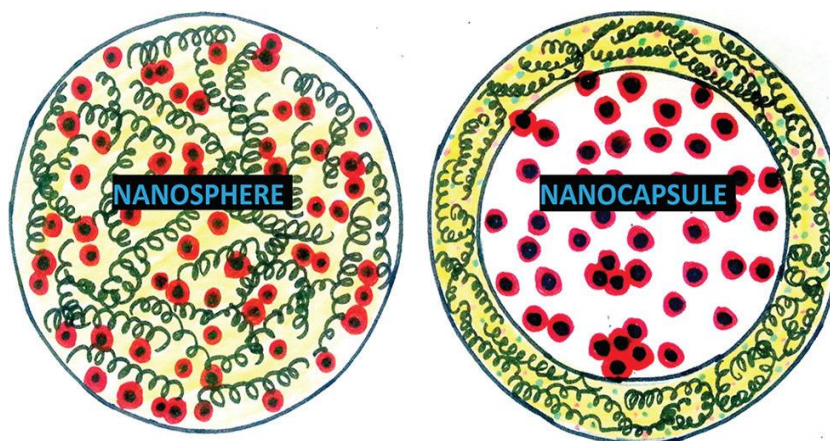


Figura 1.4: Nanosfere e nanocapsule [6]

Le nanosfere sono particelle a matrice solida in cui il principio attivo è disciolto o disperso nella matrice. Le seconde, invece, sono particelle più piccole di $1 \mu\text{m}$ [4], comprendono un nucleo a base di un solvente lipofilo, generalmente un olio, circondato da una matrice polimerica sottile stabilizzata da tensioattivi e/o agenti chimici.

Il lavoro di Gupta et al. [10] riporta un esempio di nanoparticelle di PLGA ricoperte da chitosano, un polisaccaride con importanti proprietà biofarmaceutiche. Il sistema realizzato può

favorire l'incorporazione di due farmaci all'interno della matrice modificata e maggiore stabilità delle macromolecole.

I *carrier* polimerici vengono impiegati per aumentare il tempo di permanenza sul sito cutaneo quando vengono applicati e per ridurre l'effetto di irritazione della pelle a diretto contatto con il farmaco. Riescono, inoltre, a trattenere l'acqua favorendo il controllo della capacità idratante e dell'assorbimento del principio attivo sulla pelle [12].

1.2.2 Dendrimeri

I dendrimeri sono macromolecole tridimensionali ramificate; i più utilizzati sono la poliammidoammine (PAMAM) e la poli(L-lisina).

Ricoprono un ruolo importante nel rilascio di farmaci antifungini, farmaci poco solubili in acqua; le ramificazioni della macromolecola sono idrofobiche e favoriscono l'incapsulamento di principi attivi idrofobici aumentando, quindi, la loro solubilità in ambiente acquoso [13].

1.2.3 Nanoparticelle solide lipidiche (SLN) e Carrier lipidici nanostrutturati (NLC)

Le nanoparticelle solide lipidiche (SLN) sono costituite da lipidi dispersi in una soluzione acquosa contenente un surfattante. I *carrier* lipidici nanostrutturati vengono studiati per superare i limiti delle SLN, come la limitata quantità di farmaco incorporata e l'espulsione del principio attivo [12]. Le nanoparticelle, infatti, durante lo stoccaggio, tendono a riorganizzare le molecole per ottenere un cristallo ordinato; questo comporta un minor spazio a disposizione per il farmaco che viene, perciò, eliminato dalla matrice [13]. I *carrier* lipidici ordinati comprendono una miscela di lipidi solidi e lipidi liquidi formando una struttura meno ordinata, offrendo così un maggior spazio in cui ospitare il farmaco:

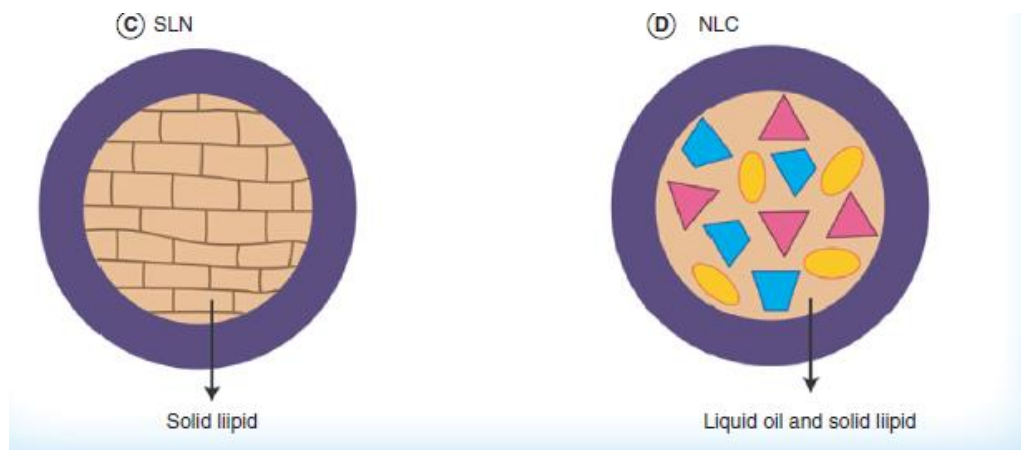


Figura 1.5: Rappresentazione di SLN e NLC [14]

Le nanoparticelle lipidiche possono essere prodotte mediante tecniche di ultrasuoni o omogenizzazione ad alta pressione [12].

Tali *carrier* favoriscono il rilascio del farmaco per un tempo più lungo, la riduzione dell'assorbimento sistematico e minore tossicità. Le dimensioni ridotte, inoltre, garantiscono

un contatto ravvicinato allo strato corneo aumentando la quantità di farmaco che penetra nella pelle [10].

Nel lavoro di Akomeah [12], viene studiato un sistema di nanoparticelle lipidiche caricate con clobetasolo propionato, farmaco usato per curare l'eczema. Rispetto alla formulazione convenzionale della crema, si osserva una riduzione degli effetti collaterali, ovvero, minore sensazione di prurito e infiammazione della cute.

1.2.4 Liposomi

I liposomi sono matrici costituiti da fosfolipidi; in ambiente acquoso i fosfolipidi formano bistrati e un cuore acquoso. Le code degli acidi grassi sono rivolte verso l'interno, i gruppi polari della testa verso l'esterno a causa della natura anfifilica [12].

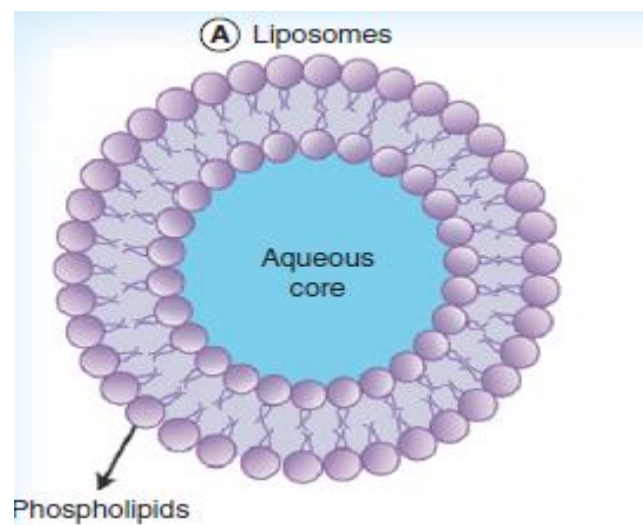


Figura 1.6: Struttura dei liposomi [14]

Questi supporti, quindi, possono essere caricati con farmaci idrofili e idrofobi.

Esistono diversi tipi di liposomi [15]:

- Piccole unilamellari vescicole di diametro tra 20 nm e 100 nm;
- Grandi vescicole unilamellari nell'intervallo 100-1000 nm,
- Piccole vescicole multilamellari nell'intervallo 0,1-10 μm .

L'uso dei liposomi dei DDS favorisce il rilascio localizzato del farmaco nella pelle e la biocompatibilità, minimizza, inoltre, la tossicità del principio attivo e l'irritazione della cute.

1.2.5 Nanoemulsioni

Le nanoemulsioni sono sistemi costituiti da goccioline di olio disperse in acqua o viceversa (figura 1.7):

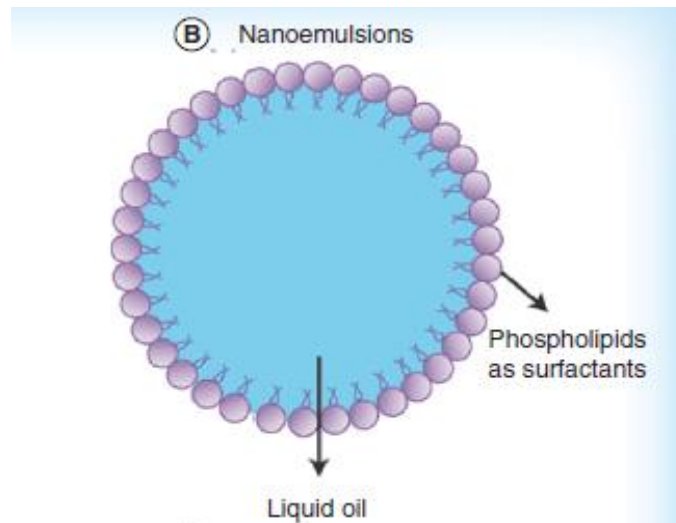


Figura 1.7: Nanoemulsioni [14]

I *carrier* hanno diametro compreso nell'intervallo 100-300 nm e vengono preparate mediante tecnica di omogenizzazione ad alta pressione o metodo di separazione delle fasi [15].

Questi sistemi sono usati per incorporare farmaci idrofobi e idrofili; favoriscono un buon contatto con lo strato corneo dell'epidermide e stabilità cinetica.

Le nanoemulsioni trovano applicazione nel trattamento di dermatiti e pelle secca senza irritazione e indebolimento della cute [5].

1.2.6 Nanoparticelle inorganiche

I *carrier* inorganici rimangono stabili per lunghi periodi, possiedono una buona biocompatibilità ed elevata capacità di veicolare il farmaco nella zona di interesse. Alcuni materiali sono caratterizzati da un'alta area superficiale e possono adsorbire un'elevata quantità di principio attivo nei loro pori [15].

Le nanoparticelle inorganiche più usate sono: silice, biossido di titanio (TiO_2), ossido di zinco (ZnO).

1.2.6.1 Silice

La silice mesoporosa è stata studiata per le applicazioni topiche.

Questo materiale presenta le seguenti proprietà [9]:

- Stabilità chimica, fisica e meccanica;
- Elevata area superficiale che favorisce l'adsorbimento del farmaco;
- Grande volume dei pori per ospitare il farmaco;

- Concentrazione di silanoli sulla superficie che facilita le reazioni sulla superficie e il legame delle molecole.

La figura 1.8 e la tabella 1.1 riportano i differenti tipi di silice e le loro caratteristiche [16]:

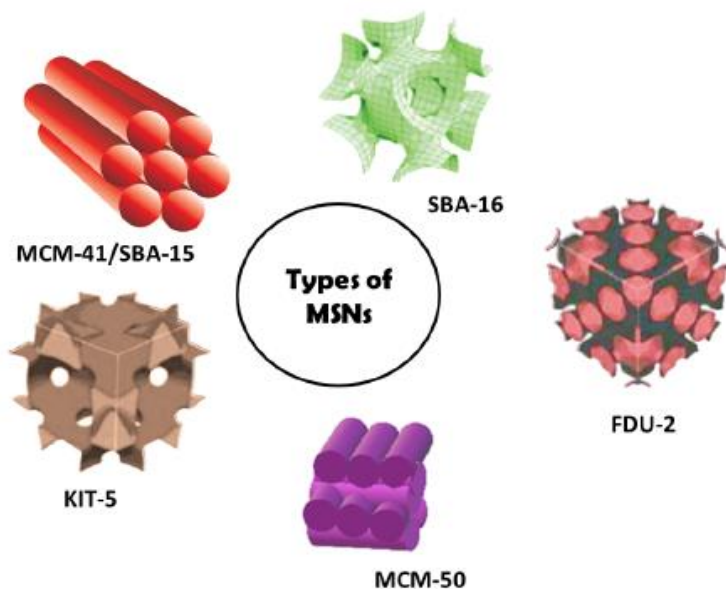


Figura 1.8: Tipi di silici mesoporose

Tabella 1.1: Tipi di silici mesoporose e loro caratteristiche

MSN Family	MSN Type	Pore Symmetry	Pore Size (nm)	Pore Volume (cm ³ /g)	References
M41S	MCM-41	2D hexagonal $P6mm$	1.5–8	>1.0	[42,43]
	MCM-48	3D cubic $Ia3d$	2–5	>1.0	[42,43]
	MCM-50	Lamellar $p2$	2–5	>1.0	[44,45]
SBA	SBA-11	3D cubic $Pm3m$	2.1–3.6	0.68	[45–47]
	SBA-12	3D hexagonal $P6_3/mmc$	3.1	0.83	[48–50]
	SBA-15	2D hexagonal $p6mm$	6–0	1.17	[43,51]
	SBA-16	Cubic $Im3m$	5–15	0.91	[43,52]
KIT	KIT-5	Cubic $Fm3m$	9.3	0.45	[53,54]
COK	COK-12	Hexagonal $P6m$	5.8	0.45	[55,56]

Le silici MCM.41, MCM-48, SBA-15, SBA-18 sono state impiegate per i sistemi di drug delivery; sono studiate anche nel settore della catalisi e dei biosensori.

1.2.6.2 Nanoparticelle di biossido di titanio e ossido di zinco

Il biossido di titanio e l'ossido di zinco vengono impiegati nelle creme solari per proteggere la pelle dalle radiazioni ultraviolette. Rispetto ad altri composti chimici, non si decompongono per effetto delle radiazioni UV [9].

I due materiali sono stati studiati come matrici di supporto nei sistemi a rilascio controllato in quanto favoriscono un ampio spettro di protezione per la pelle, assenza di irritazione della cute e, perciò, ridotto effetto di tossicità.

L'ossido di zinco presenta un'attività antibatterica, infatti, può rilasciare ioni zinco sulla cute. Viene impiegato come *carrier* di farmaci antinfiammatori o antibiotici abbinando, quindi, in un solo sistema, entrambe le proprietà. Palanikuma et al [17], per esempio, hanno sperimentato l'antibiotico amoxicilina supportato sull'ossido di zinco.

Capitolo 2

Ossido di Zinco: dalle generalità alle applicazioni biomediche

2.1: Generalità e proprietà di ZnO

Negli ultimi decenni l'ossido di zinco ricopre un ruolo crescente nel settore delle nanotecnologie per applicazioni in ambito biomedico e terapeutico. È un materiale inorganico di grande interesse per le sue proprietà e per la disponibilità di differenti metodi di sintesi che determinano varie morfologie delle nanostrutture [18].

L'ossido di zinco è classificato come un semiconduttore del gruppo II-IV, presenta un *energy gap* pari a 3.37 eV, energia di legame di 60 mV ed elevata stabilità termica e chimica a temperatura ambiente [19]. Nella tabella seguente, sono riportate le proprietà fisiche delle nanoparticelle dell'ossido di zinco:

Tabella 2.1: Proprietà fisiche di ZnO [20]

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

Le strutture cristalline presentate dall'ossido di zinco sono la wurtzite, la zircoblenda cubica e il sale di roccia, mostrate nella figura 2.1. In condizioni ambientali, la struttura termodinamicamente più stabile è la wurtzite; la struttura wurtzite è costituita da una cella esagonale con i parametri di reticolo $a=0.325$ nm e $c=0.521$ nm; ogni atomo di zinco è circondato da quattro atomi di ossigeno e viceversa [21]. La struttura di ZnO, inoltre, può essere semplicemente rappresentata come un numero di piani alternati composti da tetraedri, impilati alternativamente lungo l'asse c [22].

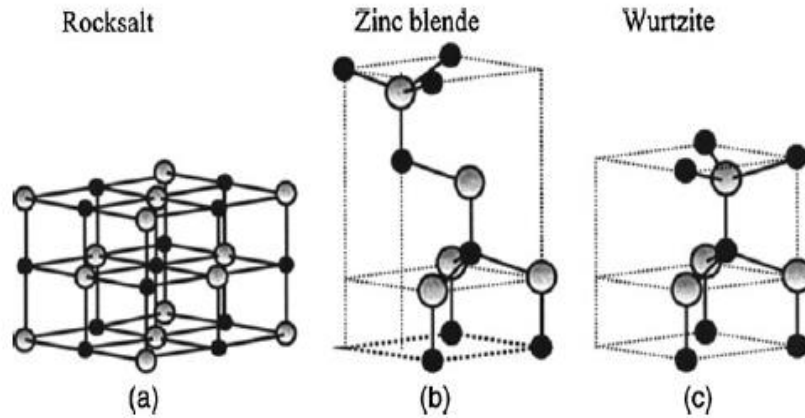


Figura 2.1: Strutture cristalline di ZnO: (a) sale di roccia, (b) zircoblenda, (c) wurtzite [2].

L'ampia applicazione dell'ossido di zinco nel campo della nanotecnologia è dovuta alla varietà di nanostrutture che il materiale può assumere in seguito ai vari metodi di sintesi. Si possono trovare strutture in una-(1D), due-(2D) e tre-(3D) dimensioni, per esempio, *nanospings*, *nanorings*, *nanowires*, *nanopellets*, *nanoflowers*, *nanoplates*, come riportato in figura:

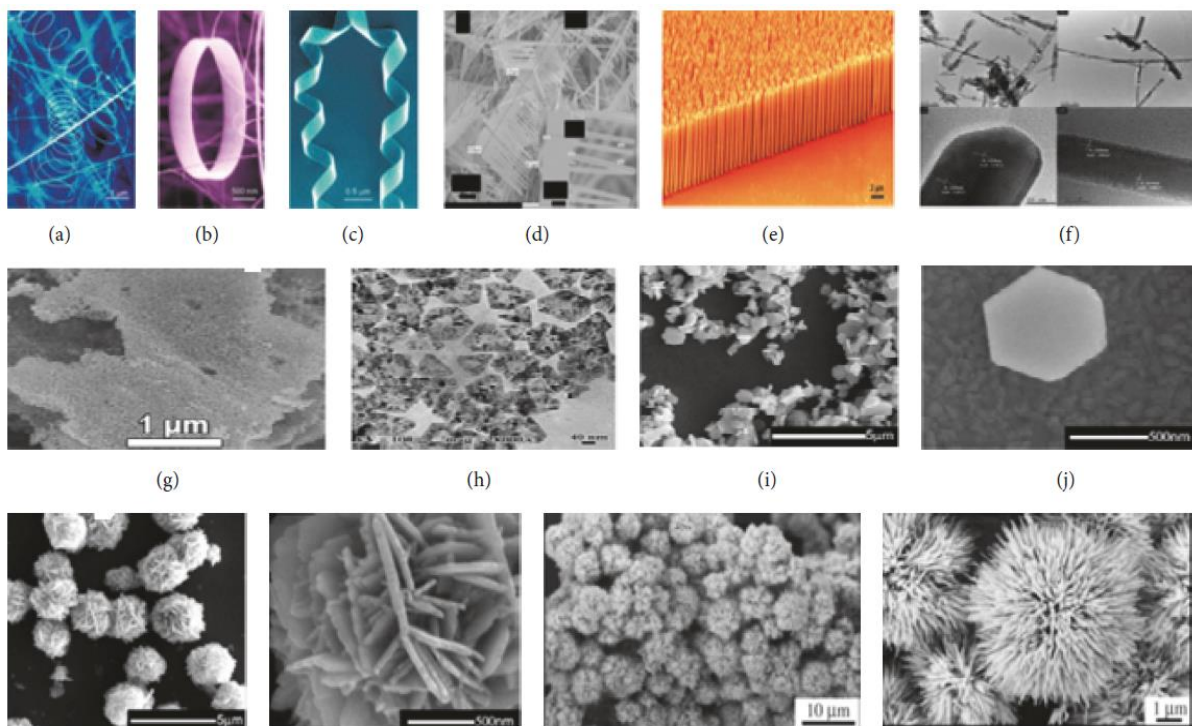


Figura 2.2: Differenti strutture di ZnO; una dimensione: (a) *nanospings*, (b) *nanorings*, (c) *nanohelix*, (d) *nanocombs*, (e) *nanowires*, (f) *nanorods*; due dimensioni: (g) *nanosheets*, (h) *nanopellets*, (i) *nanoplates*; tre dimensioni: (k) e (l) *nanoflowers*, (m) *nanomesosphere*; (n) *nanourchins*. [20]

Le caratteristiche fisiche e chimiche rendono l'ossido di zinco un materiale versatile che viene utilizzato in molti settori industriali (figura 2.3); per esempio, nell'industria della ceramica vengono sfruttate le

proprietà di durezza e di rigidità del materiale, nel settore della cosmetica l'ossido di zinco è usato come componente delle creme solari per proteggere dalle radiazioni UV.

La figura evidenzia i campi di applicazione di ZnO:

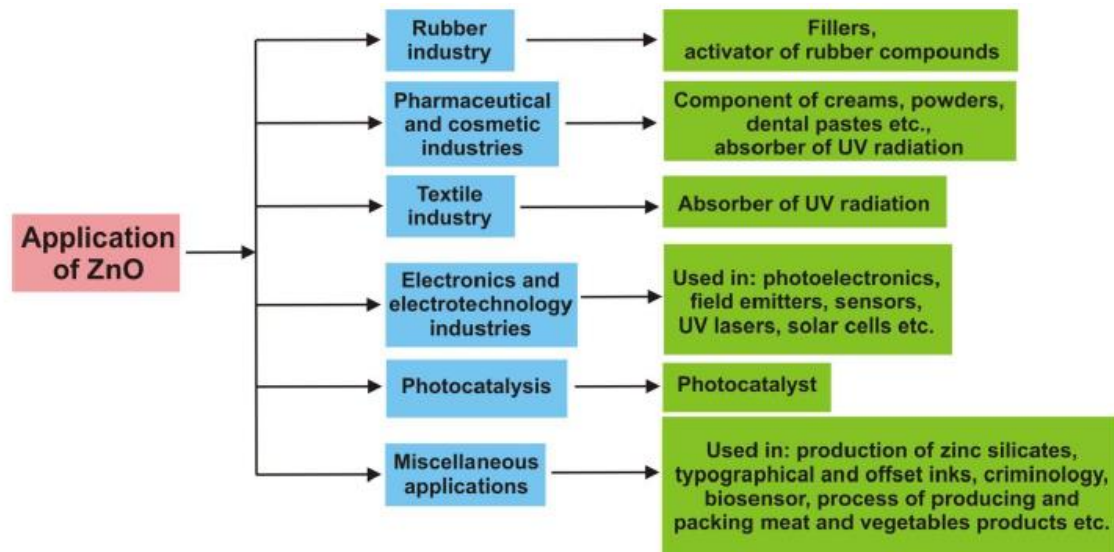


Figura 2.3: Rappresentazione schematica delle applicazioni dell'ossido di zinco [19]

Negli ultimi anni, le nanoparticelle di ZnO vengono studiate nel settore biomedicale e come *carrier* nei nuovi sistemi di somministrazione di farmaci; sono usate, per esempio, come agenti antimicrobici e antibatterici per la loro bassa tossicità e biocompatibilità [23] [24]. L'ossido di zinco, infatti, è riconosciuto come materiale sicuro (GRAS) dalla "Food and Drug Administration"[2].

2.2 Metodi di sintesi dell'ossido di zinco

Per la sintesi dell'ossido di zinco esistono una varietà di tecniche che determinano la forma e la dimensione delle diverse nanostrutture sintetizzate. Questi metodi vengono classificati in tre gruppi: metodi chimici, metodi fisici e metodi biologici (figura 2.4).

I metodi fisici coinvolgono l'uso di attrezzature costose, elevate condizioni di pressione e temperatura, ampio spazio per l'installazione delle apparecchiature [25]; si formano inoltre delle nanostrutture stabili e ben definite.

I metodi chimici si basano sull'uso di prodotti chimici per la sintesi del materiale; si tratta di sostanze che possono rivelarsi dannose per l'ambiente e per la salute dell'uomo.

I metodi biologici nascono dall'esigenza di ridurre la pericolosità delle sostanze chimiche usate negli altri due metodi e risultano essere eco-compatibili per le applicazioni in ambito medico e farmaceutico [26].



Figura 2.4: Metodi usati per la sintesi dell'ossido di zinco [20]

2.2.1 Metodi chimici

I metodi chimici sono classificati in base allo stato fisico: fase solida, fase liquida o fase vapore, applicata per la sintesi di nanocompositi di zinco. Queste tecniche usano reagenti chimici economici, apparecchiature semplici e meno costose rispetto ai metodi fisici [21].

- I metodi di precipitazione sono usati per ottenere nanostrutture con proprietà diverse. La sintesi avviene mediante una reazione tra una soluzione di sali di zinco e un agente riducente [19], seguita dalla precipitazione del precursore dell'ossido di zinco dalla soluzione. Nello step successivo, viene effettuato un trattamento termico raggiungendo un elevato livello di aggregazione delle particelle di ZnO. La diversa morfologia dell'ossido di zinco è controllata da alcuni parametri: la concentrazione della soluzione, pH, temperatura di calcinazione e tempo di precipitazione.
- La tecnica sol-gel coinvolge la preparazione di soluzioni colloidali che vengono convertite in gel. La procedura prevede delle reazioni di condensazione, polimerizzazione e idrolisi in cui vengono usati gli alcossidi metallici come precursori. La crescita delle nanoparticelle con la tecnica sol-gel è influenzata dalla natura del gruppo alchilico e del solvente, dalla concentrazione del solvente e dalla temperatura [21]. Questo processo può essere applicato per produzioni industriali, ma ha lo svantaggio di usare precursori di sintesi costosi.
- I metodi idrotermali non richiedono l'uso di solventi organici e la fase di calcinazione finale è assente. La sintesi viene effettuata in un'autoclave, la miscela di substrati viene

riscaldata, per alcuni giorni, fino a 100-130 °C [19]; segue la fase di raffreddamento con la nucleazione e la crescita dei cristalli dell'ossido di zinco. La dimensione e la forma delle nanoparticelle dipendono dalla composizione della miscela iniziale e dalle condizioni operative del processo.

Questo processo permette di operare a basse temperature, di ottenere un elevato grado di cristallinità e di purezza del prodotto finale.

2.2.2 Metodi fisici

I metodi fisici comprendono un'ampia classe di tecniche, tra cui deposizione chimica e fisica del vapore, irradiazione ultrasonica, evaporazione termica ed ablazione laser.

- La deposizione chimica da vapore (CVD) è una delle tecniche più utilizzate in cui la crescita dei cristalli di ossido di zinco avviene su un substrato. Il processo può essere suddiviso in cinque stadi come mostra la seguente figura:

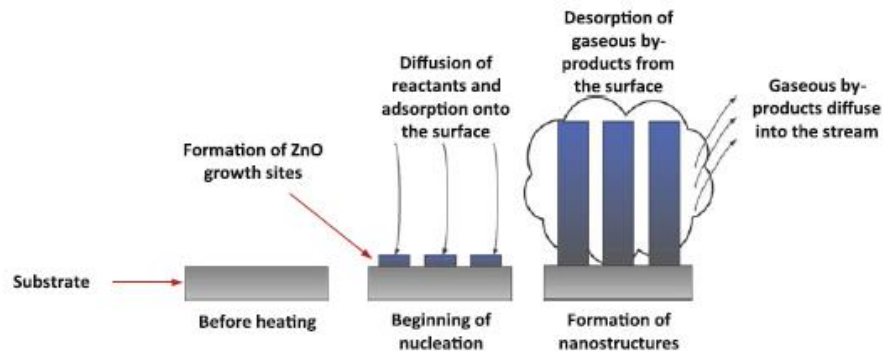


Figura 2.5: Diagramma del processo di deposizione chimica da vapore (CVD) [27]

Il primo e il secondo stadio includono la diffusione dei reagenti e l'adsorbimento sul substrato adsorbente; segue la reazione chimica superficiale per portare ad una deposizione del solido. I sottoprodotti gassosi iniziano un processo di desorbimento dalla superficie a temperature più elevate rispetto al processo di deposizione fisica [27].

Alcuni tipi di processi includono la deposizione chimica da vapore sotto pressione atmosferica (APCVD), la deposizione chimica da vapore a bassa pressione (LPCVD), e la deposizione chimica da fase vapore al plasma (PECVD).

- La deposizione fisica da vapore (PVD) è un metodo fisico di sintesi in cui il materiale, solitamente sublimato, è inviato in una fornace (figura 2.6) in cui si raggiungono due temperature differenti:

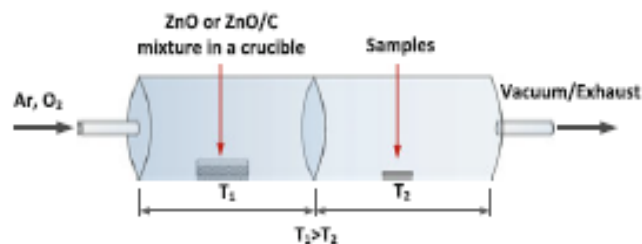


Figura 2.6: Diagramma del processo di deposizione fisica da vapore (PVD) [27]

Nella zona a temperatura più elevata si verifica la sublimazione dell'ossido di zinco che, dopo, in condizioni di bassa temperatura, si deposita sul substrato. L'aria è usata come carrier per favorire il trasporto dell'ossido di zinco tra le due zone della fornace.

2.2.3 Metodi biologici

Le tecniche biologiche di sintesi di ZnO usano sistemi biologici, come piante, batteri, alghe e funghi (figura 2.7) e presentano più vantaggi rispetto ai metodi chimici tradizionali: sono più eco-compatibili non utilizzando prodotti chimici tossici.

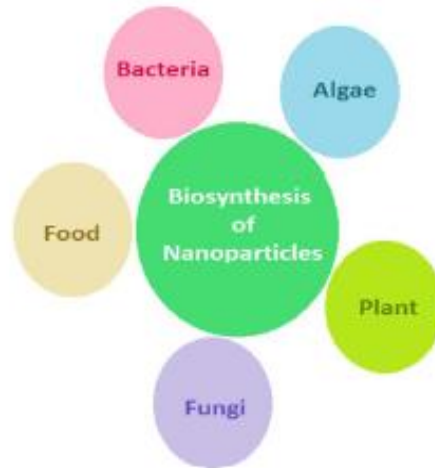


Figura 2.7: Precursori per la biosintesi di nanoparticelle di ZnO [26]

I processi biologici richiedono severe condizioni operative [21] come la selezione degli organismi coinvolti e dei loro medium di coltura, i valori di temperatura e pH.

Le nanoparticelle, prodotte con la biosintesi, esibiscono attività antimicrobica contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi e proprietà antifunginea. In letteratura [21] vengono individuati due tipi di sintesi microbica: intracellulare ed extracellulare. La produzione intracellulare consiste nel trasporto di ioni all'interno della cellula batterica per formare le nanoparticelle in presenza di enzimi. La sintesi extracellulare coinvolge gli ioni sulla superficie delle cellule batteriche e l'interazione degli ioni zinco con i componenti bioattivi rilasciati ottenendo le particelle dell'ossido. Per la sintesi di ZnO, possono essere usati batteri come *Lactobacillus sporogens* e *Candida albicans* che favoriscono la crescita di nanoparticelle con diametro compreso tra 15-25 nm [23].

Il meccanismo mediato dalle piante dipende dai metaboliti secondari presenti nelle differenti parti della pianta che agiscono come agenti riducenti dei sali precursori di ZnO.

2.3 Applicazioni dell'ossido di zinco in ambito biomedico

Molti studi sono stati eseguiti per sperimentare l'ossido di zinco in ambito biomedico e farmaceutico per le sue proprietà antibatterica, antinfiammatoria e antifunginea. Le nanoparticelle, inoltre, vengono usate come *carrier* di farmaci per il rilascio e il trasporto in siti specifici:

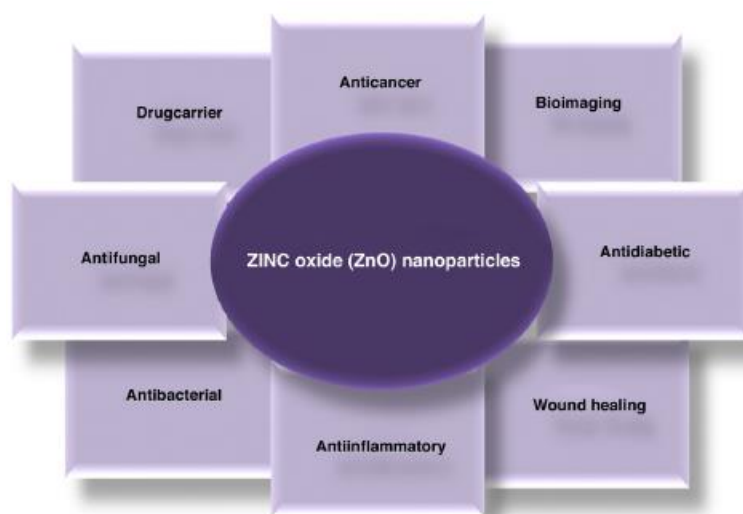


Figura 2.8: Applicazioni biomediche di ZnO-NPs [28]

2.3.1 Attività antibatterica

L'attività antibatterica consiste nella distruzione o inibizione della crescita batterica [29]. La dimensione e la concentrazione delle ZnO-NPs svolgono un ruolo importante per le proprietà antibatteriche del nanomateriale, infatti una concentrazione elevata e un'area esposta grande [30] favoriscono l'inibizione della crescita dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Le particelle più piccole, infatti, possono penetrare più facilmente nella membrana batterica distruggendola.

In laboratorio, sono stati sperimentati diversi metodi per valutare l'attività antibatterica dell'ossido di zinco; alcuni ricercatori, per esempio, hanno studiato la capacità delle ZnO-NPs contro i batteri *E.coli* e *S.aureus* utilizzando un metodo di diluizione nel brodo di coltura contenente le nanoparticelle [29]. Sono stati, inoltre, variati alcuni parametri per valutare l'effetto sulla velocità dell'attività antibatterica, ottenendo un miglioramento al diminuire del numero di colonie batteriche formate (*colony forming unit*, CFU).

Le proprietà antibatteriche dell'ossido di zinco sono legate al rilascio di ioni zinco Zn^{2+} , alla formazione di ROS (*reactive oxygenated species*) e al diretto contatto delle ZnO-NPs con la parete cellulare [24]. Gli ioni zinco disciolti provocano la distruzione della parete e della membrana cellulare quando la cellula batterica interagisce con le nanoparticelle. I ROS si formano quando le nanoparticelle sono investite da radiazioni UV generando radicali liberi e superossidi che distruggono la cellula provocandone la morte. I ricercatori esprimono la generazione di ROS attraverso le seguenti equazioni chimiche [29]:

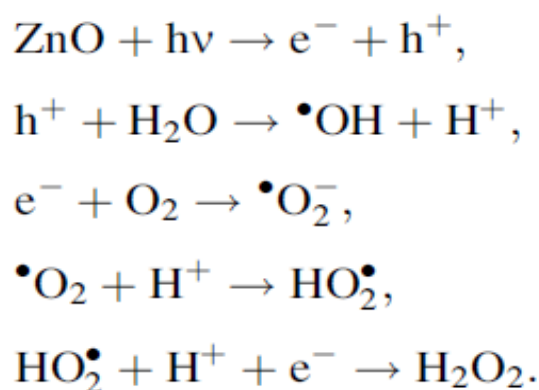


Figura 2.9: Equazioni chimiche coinvolte nella formazione di ROS

2.3.2 Attività antifunginea

L'ossido di zinco è usato in applicazioni biomediche e dermatologiche come agente antifungineo per la cura di dermatiti, infezioni e malattie della pelle. Molti ricercatori hanno effettuato degli studi su diversi tipi di funghi dimostrando l'attività antimicotica delle nanoparticelle. Sharma et al. [31] hanno studiato il comportamento delle nanoparticelle di ossido di zinco contro il fungo *Fusarium sp.* Il ceppo è stato inoculato e aggiunto in un medium di agar e uno contenente le NPs sintetizzate in diverse condizioni e lasciato a contatto per 3-4 giorni. L'effetto antifungineo di ZnO-NPs è stato, successivamente, confrontato con l'antimicotico tradizionale, solfato di rame.

2.3.3 Attività antidiabetica

Lo zinco svolge un ruolo importante nella sintesi dell'insulina, perciò, sono stati intrapresi degli studi per valutare questa proprietà dell'ossido di zinco e confrontata con i farmaci antidiabetici tradizionali. In letteratura [28] sono stati scoperti i vantaggi delle ZnO-NPs per migliorare i danni indotti dai medicinali nel pancreas.

2.3.4 Attività antinfiammatoria

L'ossido di zinco mostra una proprietà antinfiammatoria; le nanoparticelle riescono a penetrare negli strati più profondi della pelle sopprimendo le infiammazioni locali cutanee e inducendo la produzione di anticorpi [28]. Questo effetto è legato alla capacità di ZnO di rilasciare ioni zinco.

Sono stati condotti degli studi riguardo il rilascio di Zn^{2+} su una superficie che simula la cute ottenendo il seguente profilo [32]:

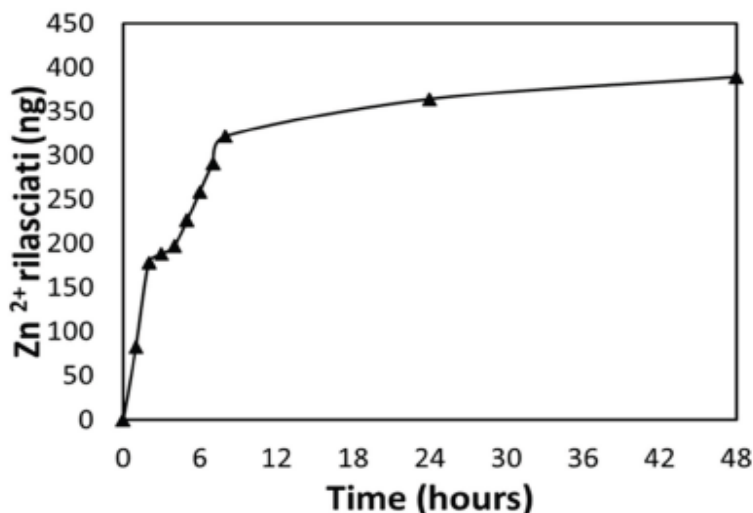


Figura 2.10: Profilo di rilascio di ioni zinco [32]

Si osserva che in 12 ore le nanoparticelle rilasciano un'elevata quantità di ioni confermando l'attività antiinfiammatoria e antibatterica.

2.3.5 Attività antitumorale

Le nanotecnologie hanno sviluppato nuovi sistemi per il trattamento dei tumori con vantaggi rispetto ai metodi di somministrazione tradizionale. La chemioterapia, attualmente applicata ai pazienti affetti da cancro, si basa su agenti achemilanti, antimetaboliti, agenti biologici, vari componenti che non sempre riescono a produrre una risposta antitumorale completa a causa della resistenza ai farmaci o alla loro incapacità di distinguere le cellule cancerogene e normali [33]. Si verifica un effetto di tossicità sistemica e debilitazione dei tessuti normali del corpo, per esempio soppressione delle funzionalità midollare. Le nanoparticelle di ossido di zinco risultano essere buone candidate per il miglioramento delle terapie contro il cancro, infatti, le ZnO-NPs esibiscono attività antitumorali superando alcuni limiti dei farmaci tradizionali. I nanomateriali interagiscono con il sito bersaglio non attaccando gli altri organi e riducendo la tossicità del farmaco.

L'ossido di zinco viene usato per il trattamento dei tumori alle ossa, al colon, al seno e contro la leucemia. L'attività antitumorale delle nanoparticelle è legata alla produzione e al rilascio dei ROS che attaccano la cellula cancerogena portando alla sua distruzione selettiva [33].

Per l'attività contro il cancro viene sfruttata la proprietà elettrostatica dell'ossido di zinco. Le ZnO-NPs presentano un diverso comportamento della carica superficiale, a causa dei gruppi ossidrilici chemisorbiti sulla loro superficie. A pH alto, i protoni (H^+) lasciano la particella formando una superficie caricata negativamente; a basso pH, i protoni vengono trasferiti dall'ambiente acquoso alla superficie della particella, determinando una superficie carica positivamente [28]. Queste particelle positive interagiscono con i fosfolipidi anionici delle membrane cellulari cancerogene promuovendo l'assorbimento dalla cellula. Le NPs si dissolvono e rilasciano ioni zinco che inibiscono l'azione degli enzimi e causano la morte della cellula tumorale.

2.3.6 ZnO in Drug Delivery Systems

L'ossido di zinco è usato come supporto nei sistemi di *drug delivery* favorendo la veicolazione del principio attivo nel sito bersaglio. Si abbinano le proprietà mostrate dall'ossido di zinco con le caratteristiche mediche dei farmaci supportati aumentando la biodisponibilità dei principi attivi e il rilascio in un tempo minore rispetto alla terapia tradizionale.

Le nanoparticelle, per esempio, sono state testate in combinazione con la doxorubicina (DOX) e il cisplatino (CPT) producendo una citotossicità maggiore di questi agenti chemioterapici [28] per il trattamento dei tumori. In questo lavoro di tesi, viene studiato l'ossido di zinco come supporto di idrocortisone, farmaco antinfiammatorio poco solubile in acqua.

Capitolo 3

Metodi di impregnazione dei farmaci cortisonici in ossido di zinco

3.1 *Incipient Wetness Impregnation (IWI)*

In questo metodo, viene preparata una soluzione contenente il farmaco con un volume pari al volume dei pori dell'ossido di zinco; la soluzione viene aggiunta al *carrier* e diffonde per capillarità all'interno dei pori della matrice [34]. Il sistema viene essiccato per far evaporare il solvente e il farmaco, depositato sulla superficie, rimane precipitato nei pori dell'ossido di zinco.

Il metodo di *Incipient Wetness Impregnation* viene effettuato a temperatura ambiente e permette un controllo sulla quantità di *drug loading* [35].

3.2 *Impregnazione con CO₂ supercritica*

I fluidi supercritici hanno attirato l'attenzione nel campo farmaceutico [36] in cui vengono sfruttate le loro proprietà per migliorare la solubilità dei farmaci, per controllare la morfologia e la dimensione delle particelle di principio attivo [37] e favorire l'impregnazione di differenti API (*Active Pharmaceuticals Ingredients*) in matrici organiche e inorganiche per *drug delivery systems*.

Le operazioni tradizionali dell'industria farmaceutica prevedono l'uso di solventi organici, elevate temperature e stress meccanici che possono degradare le molecole di API [38]. In seguito alla fase di purificazione del farmaco, possono rimanere nel principio attivo piccole tracce di solvente organico alterando la purezza del prodotto. I ricercatori, perciò, hanno sviluppato sistemi di impregnazioni dei farmaci in nanomateriali mediante fluidi supercritici ottenendo un prodotto finale puro [39].

L'impregnazione necessita di una fase mobile per dissolvere e trasportare il principio attivo permettendo la diffusione della molecola sulla superficie del *carrier* e aumentando la velocità di impregnazione [40]. La preparazione dei sistemi a rilascio controllato di farmaci prevede tre fasi (figura 3.1):

- Dissoluzione del principio attivo in un adeguato solvente;
- Diffusione attraverso la matrice;
- Depressurizzazione del sistema per eliminare il solvente residuo.

Rispetto ai convenzionali metodi di preparazione, la tecnica di impregnazione è definita "green" ed eco-compatibile in quanto le condizioni operative del processo sono più basse e il solvente viene eliminato completamente lasciando il farmaco adsorbito sul supporto [41].

Tra i fluidi supercritici, l'anidride carbonica supercritica (scCO₂) è usata come solvente nelle applicazioni farmaceutiche in quanto non è tossica, infiammabile, è economica ed eco-compatibile.

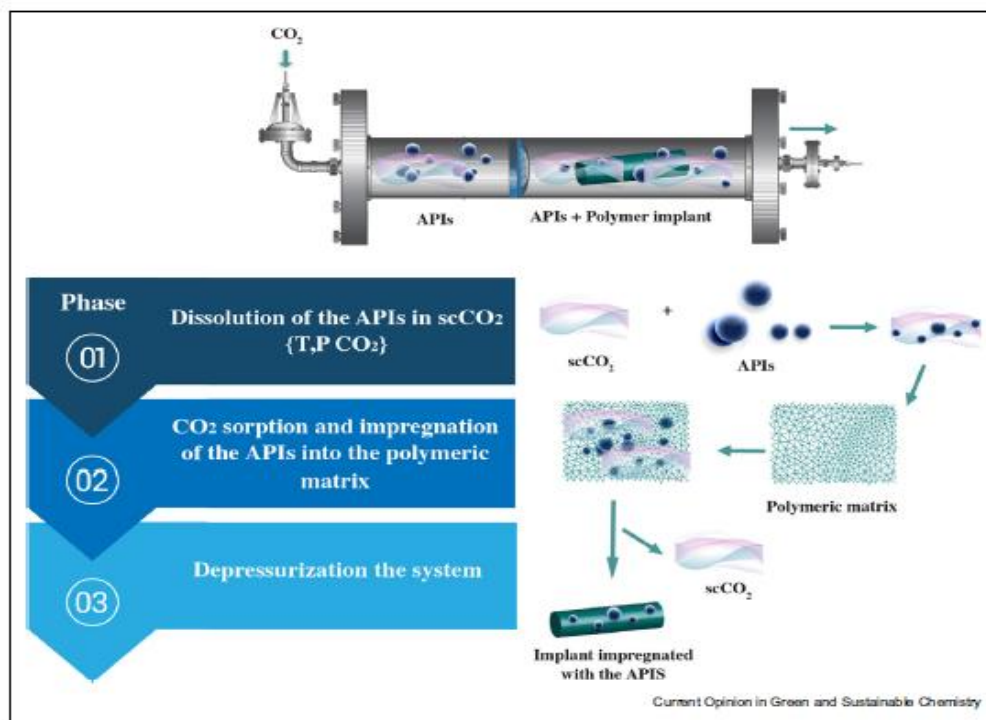


Figura 3.1: Rappresentazione del processo di impregnazione con scCO₂ [40]

Gonzalez et al. [42], per esempio, hanno usato la scCO₂ come solvente per l'adsorbimento del ketoprofene, farmaco antinfiammatorio, in microsfele di polisaccaride usato come *carrier* per principi attivi poco solubili in acqua.

3.2.1 L'anidride carbonica supercritica

L'anidride carbonica supercritica è una sostanza che presenta valori di pressione e temperatura sopra il punto critico [38].

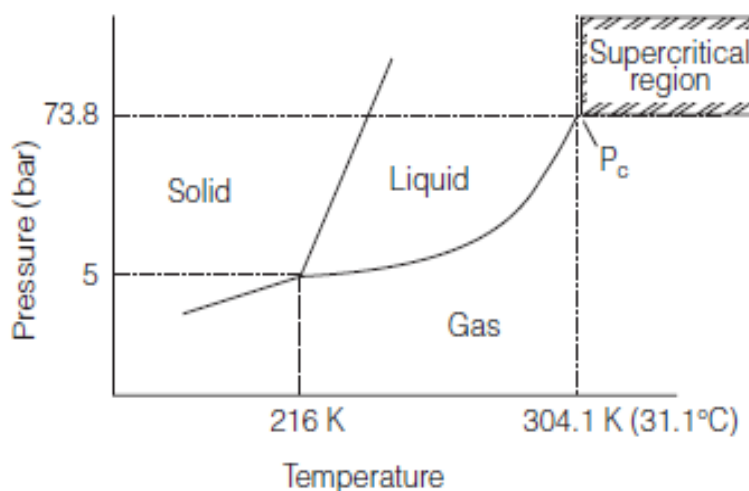


Figura 3.2: Diagramma di fase dell'anidride carbonica supercritica [38]

La temperatura critica (T_c) è la più alta temperatura a cui un gas può essere convertito in un liquido aumentando la pressione; la pressione critica (P_c) è il valore di pressione più alto a cui un liquido può essere convertito in un gas aumentando la temperatura del liquido [36]. Nel caso della $scCO_2$, la T_c è pari a $31.1^\circ C$ e la P_c corrisponde a 73.8 bar [38].

Sopra il punto critico, il SCF esiste come singola fase con proprietà fisico-chimiche (densità, viscosità, diffusività) intermedie tra quelle del gas e del liquido; la sostanza esibisce densità simile ai valori dei liquidi, viscosità e diffusività come i gas. Queste proprietà sono importanti per le applicazioni in ambito farmaceutico. Per esempio, le proprietà analoghe ai liquidi forniscono benefici nel processo di estrazione di solventi organici e impurità, solubilizzazione di farmaci; le caratteristiche dei gas, inoltre, facilitano il trasporto di materia [36].

La maggior parte delle applicazioni farmaceutiche sono state sviluppate con CO_2 supercritica, in quanto presenta valori di P_c e T_c facilmente raggiungibili, è, inoltre, eco-compatibile, riciclabile e economica. Nei processi di impregnazione, favorisce la dispersione amorfa dei principi attivi nei supporti aumentando la solubilità di farmaci poco solubili in acqua e la loro biodisponibilità. Il limite dell'uso della $scCO_2$ è legato alle sue proprietà fisiche e chimiche e alla sua configurazione. L'anidride carbonica è un solvente non polare [43], presenta un momento dipolare nullo e, perciò, non riesce a dissolvere specie polari e ioniche. Per le applicazioni farmaceutiche, è usato un co-solvente, come l'etanolo, per aumentare la polarità [41].

La $scCO_2$ può svolgere anche il ruolo di agente anti-solvente se il farmaco non è solubile nella fase supercritica ma è miscibile con il solvente di natura organica favorendo la precipitazione del soluto dal solvente. Il metodo GAS (*Gas Antisolvent Recrystallization*) usa l'anidride carbonica supercritica come anti-solvente; la $scCO_2$ diffonde nel solvente organico portando alla sua evaporazione e riduzione della sua densità. Si verifica una minore affinità del solvente organico nei confronti del soluto che inizia la sua nucleazione e precipitazione. La situazione ideale per la tecnica GAS è garantita da un'elevata miscibilità del fluido supercritico con il solvente e insolubilità del soluto [36].

3.3 Amorfismo e cristallizzazione di farmaci

I farmaci possono esistere in diverse forme polimorfiche, ognuna delle quali mostra differenti caratteristiche fisiche e chimiche come il punto di fusione, la solubilità e la biodisponibilità. La dimensione e la forma dei solidi polimorfi possono essere manipolate controllando la temperatura e/o la pressione durante il processo con fluidi supercritici [44].

Per migliorare la biodisponibilità dei farmaci poco solubili in acqua, l'industria farmaceutica ha cercato di sviluppare nuove strategie per superare questo limite; per esempio si cerca di ridurre la dimensione delle particelle di API o di produrre delle dispersioni solide.

Le dispersioni solide sono sistemi in cui il principio attivo si deposita in modo amorfo nella matrice porosa aumentando la biodisponibilità del farmaco. Lo stato amorfo, infatti, favorisce un rilascio più veloce in quanto non richiede un'energia elevata per rompere il reticolo cristallino durante il processo di dissoluzione [45]. I materiali amorfi, inoltre, non presentano un ordine molecolare mostrando una maggiore mobilità delle molecole e tendenza a cristallizzare [46].

Le dispersioni solide vengono preparate mediante una procedura definita "metodo di impregnazione con solvente", la matrice porosa è immersa in una soluzione di farmaco con solvente organico (solitamente acetone, metanolo o etanolo) [47]. Dopo l'evaporazione del solvente, i principi attivi precipitano e si forma una fase polimorfa metastabile con maggiore

solubilità rispetto a quella cristallina stabile. Per farmaci con bassa energia cristallina (bassa temperatura di fusione o calore di fusione), la forma amorfa è principalmente dovuta alla differenza di temperatura di fusione tra farmaco e *carrier*. Per farmaci con alta energia cristallina, lo stato amorfo può essere ottenuto scegliendo delle matrici che mostrano specifiche interazioni con loro [45].

L'adsorbimento del farmaco sulla superficie e la precipitazione in seguito all'evaporazione del solvente dipendono dalle interazioni tra le molecole del principio attivo e il supporto. Se l'interazione è forte, infatti, il farmaco ha maggior probabilità di essere confinato in forma amorfa nei pori della matrice. Per esempio, nelle matrici a base di silice, i silanoli formano legami idrogeno che determinano prevalentemente interazioni farmaco-supporto [47]. Le interazioni influenzano anche la quantità complessiva impregnata nel supporto.

Il farmaco amorfo supportato presenta una maggiore mobilità molecolare rispetto alle parti cristalline; le molecole in superficie mostrano un comportamento simile al fluido con una maggiore mobilità rispetto alle molecole nel nucleo dei pori, dove la mobilità si avvicina a quella cristallina. Dal punto di vista pratico, questo comportamento può implicare una maggiore reattività dei solidi amorfi, ad es. verso l'ossigeno [47].

Durante lo stoccaggio dei farmaci, l'umidità rende instabile lo stato amorfo e promuove la formazione di una fase più ordinata [45] perdendo i vantaggi della dispersione amorfa del principio attivo, quindi, la velocità di dissoluzione e la solubilità decrescono.

3.4 Farmaci cortisonici

La BCS (*Biopharmaceutics Classification System*) classifica i farmaci in quattro categorie (figura 3.3) in base ai parametri di solubilità e permeabilità.

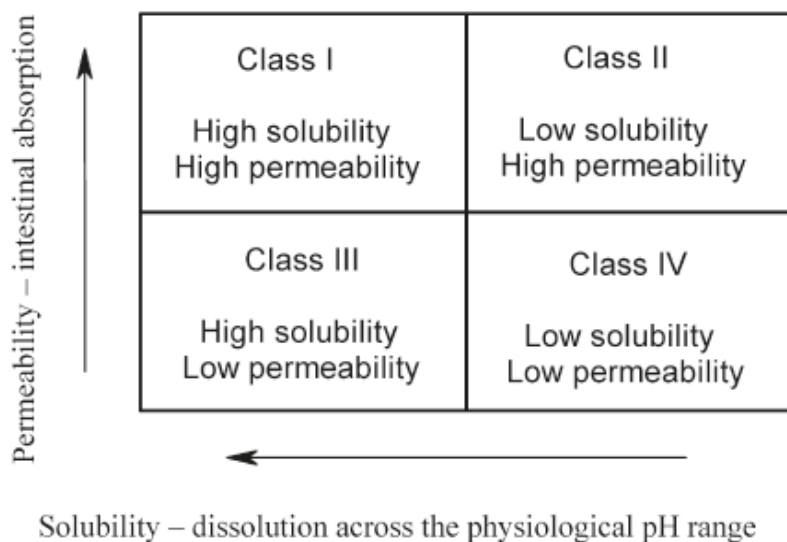


Figura 3.3: Classificazione di principi attivi farmaceutici [48]

I farmaci cortisonici, idrocortisone e cortisone, appartengono alla classe II in base alla classificazione BCS; sono poco solubili in acqua ma presentano affinità maggiore con i solventi di natura organica. L'assorbimento di questi composti dipende dalla loro dissoluzione: un

aumento della velocità di dissoluzione comporta una maggiore biodisponibilità del principio attivo.

L'idrocortisone e il cortisone sono ormoni prodotti dalle ghiandole surrenali; si tratta di ormoni steroidei appartenenti alla classe dei glucorticoidi che agiscono sul metabolismo dei carboidrati e riducono le risposte infiammatorie ed immunitarie.

La struttura chimica di tali steroidi è composta da un nucleo ciclopentanoperidrofenantrenico a 4 anelli come riportato di seguito:

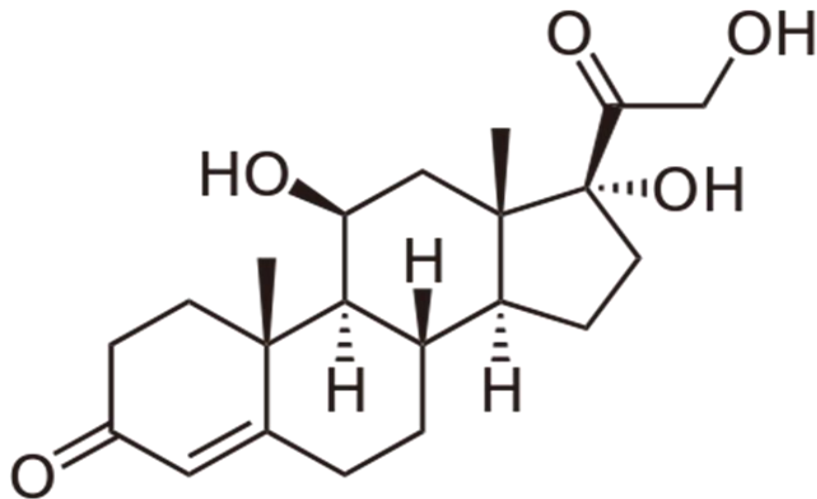


Figura 3.4: Struttura chimica di idrocortisone ($C_{21}H_{30}O_5$) [49]

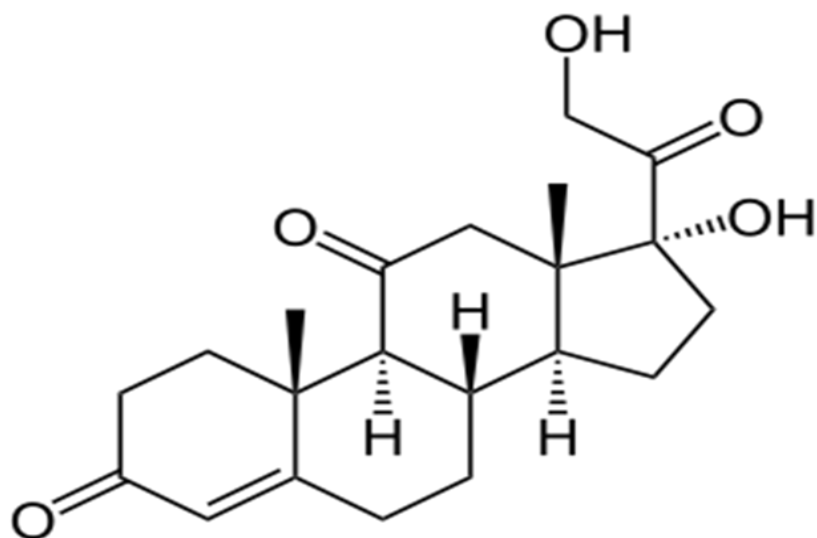


Figura 3.5: Struttura chimica del Cortisone ($C_{21}H_{28}O_5$) [50]

Si tratta di solidi cristallini inodori dal colore bianco che presentano le seguenti proprietà fisiche:

Tabella 3.1: Proprietà fisiche di Idrocortisone e cortisone [49] [50]

	Idrocortisone	Cortisone
Peso molecolare [g/mol]	362.466	360.45
Punto di fusione [°C]	220	222
Solubilità in acqua [mg/ml]	0.32	0.28

Il cortisone è inattivo e viene, perciò, convertito nella molecola di idrocortisone mediante l'enzima 11- β -steroido-deidrogenasi.

I farmaci cortisonici vengono somministrati al paziente per via orale, parenterale o per via topica per il trattamento di infiammazioni, reazioni allergiche, punture di insetto, eczemi, dermatiti o asma. Hanno azione antinfiammatoria ma portano ad un aumento della pressione sanguigna, del livello di zuccheri nel sangue e ad una soppressione del sistema immunitario.

In letteratura, l'idrocortisone e il cortisone sono poco studiati nei sistemi di drug delivery in cui vengono maggiormente impregnati in carriers polimerici. In questo lavoro di tesi, si vuole studiare la combinazione della natura antinfiammatoria dei principi farmaceutici cortisonici e dell'azione antibatterica dell'ossido di zinco per trattamenti topici.

Capitolo 4

Materiali e metodi

4.1 Materiali

Per la sintesi dell'Ossido di Zinco sono stati utilizzati i seguenti materiali, forniti da SIGMA-ALDRICH Italia:

- Acetato di zinco diidrato ($(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- Idrossido di potassio (KOH);
- Metanolo (CH_3OH).

Nelle prove di incorporazione con scCO_2 e IWI, vengono impiegati:

- Idrocortisone ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$);
- Etanolo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$);
- Acetone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$);
- Cortisone ($\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$);
- Anidride carbonica con purezza del 99,5%.

I primi tre materiali sono stati acquistati da SIGMA-ALDRICH Italia, il farmaco Cortisone è fornito da Alfa-Aesar e, inoltre, la CO_2 da SIAD.

Nell'ultima parte della tesi, la prova di rilascio del farmaco dalla matrice è stata effettuata usando Tampone Fosfato Salino (PBS) e Acqua bidistillata, entrambi forniti da SIGMA-ALDRICH Italia.

4.2 Sintesi dell'Ossido di Zinco Mesoporoso

La sintesi dell'ossido di zinco mesoporoso (Meso- ZnO) è stata eseguita in laboratorio seguendo lo stesso metodo riportato nell'articolo di Mitra e colleghi, mediante tecnica di precipitazione da soluzione [51].

Sono stati pesati 14,75 g del precursore acetato di zinco diidrato e 7,4 g di idrossido di potassio (KOH); le due sostanze vengono disciolte rispettivamente in 60 ml e 32 ml di metanolo. Al fine di ottenere una soluzione omogenea, i due sistemi sono stati posti in un agitatore magnetico, mantenendoli in agitazione a temperatura ambiente. Le due sospensioni sono state versate in un pallone da laboratorio per favorire il loro contatto. Il recipiente è stato collegato ad un tappo condensatore detto "reflux" in cui circola acqua; lo strumento ha lo scopo di evitare l'evaporazione del metanolo durante la reazione. Il pallone è stato inserito in un bagno di oli, mantenuto ad una temperatura di 60°C da una sonda di temperatura del termoregolatore.

Il sistema è stato posto in un agitatore magnetico per 72 ore ed è stata impostata una Velocità pari a 350 rpm.

Alla fine delle 72 ore, sono state eseguite le operazioni di lavaggio e purificazione dell'ossido di zinco dal metanolo. Sono stati effettuati tre cicli di centrifugazione a velocità di 4000 rpm con durata di 30 minuti ciascuno per separare il surnatante (metanolo) dal precipitato (Meso-

ZnO). In seguito, rimosso il surnatante, il precipitato è stato lavato con metanolo per eliminare le tracce di idrossido di potassio.

Il precipitato (Meso-ZnO), infine, è stato essiccato in un forno ad una temperatura di 50°C per circa 24 ore, ottenendo una polvere bianca di Meso-ZnO.

4.3 Adsorbimento da CO₂ supercritica

L'adsorbimento dell'idrocortisone nell'ossido di zinco mesoporoso è stata eseguita usando CO₂ supercritica nella seguente apparecchiatura:

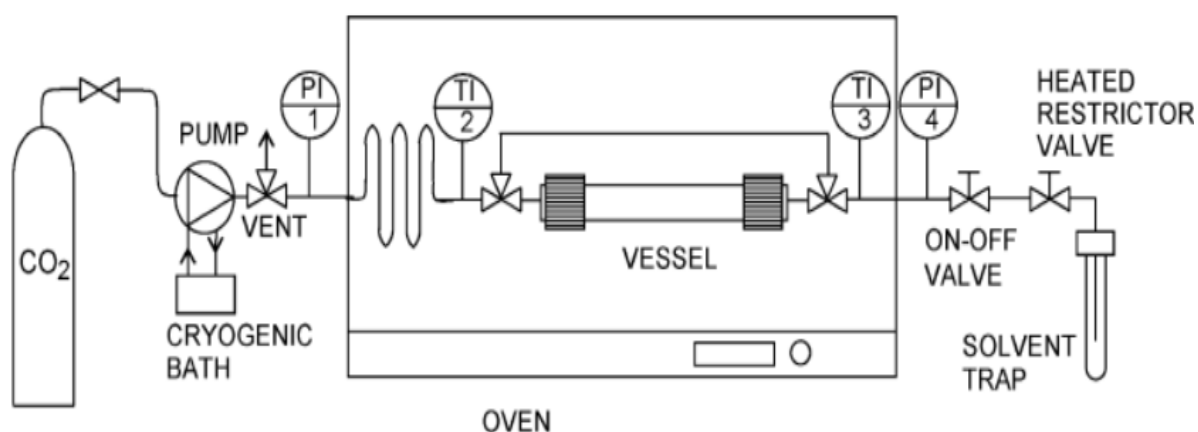


Figura 4.1: Impianto usato per l'incorporazione con scCO₂ [52]

Sono state preparate una pastiglia di Meso-ZnO (100 mg) e una pastiglia di HC (100 mg) mediante una pressa idraulica. Successivamente le due pastiglie sono state poste in un cilindro di vetro e separate da un filtro di carta per evitare il loro contatto e favorire la separazione dei materiali alla fine del processo di incorporazione [53]. All'estremità del cilindretto è stata inserita la lana di vetro per impaccare il sistema, come si nota dalla seguente figura:



Figura 4.2: Cilindro di vetro pronto per l'incorporazione [54]

Sono stati preparati quattro cilindretti e inseriti in un vessel di acciaio inossidabile. Il vessel è stato posto in una stufa che opera a temperatura costante; il reattore è stato riempito con anidride carbonica liquida e riscaldato fino a 45°C. Dopo il riscaldamento, è stata pompata l'anidride carbonica nel vessel fino a raggiungere una pressione di 130 bar [55]. Le condizioni di temperatura e pressione non sono state cambiate durante la prova di incorporazione, permettendo all'idrocortisone di dissolversi nella scCO₂ e diffondere all'interno del *carrier*. Al termine della prova, dopo 8 ore, l'apparecchiatura è stata depressurizzata e riportata in condizioni ambientali.

4.4 Incipient wetness impregnation (IWI)

L'incorporazione del farmaco nell'ossido di zinco tramite impregnazione (IWI) è stata effettuata preparando inizialmente una soluzione di HC in Etanolo, solvente in cui il principio presenta una solubilità pari a 15 mg/ml [49]. Sono stati pesati 150 mg di polvere di HC ed è stata ottenuta la soluzione usando un matraccio da 10 ml.

È stata pesata una quantità di Meso-ZnO pari a 1 g e posta in un beker; usando una pipetta è stato aggiunto un volume di soluzione, contenente il farmaco, pari al volume dei pori della matrice, quindi 0.14 cm³. È stato deciso, però, di considerare un volume di soluzione maggiore pari a 0.5 ml, quantità pari al volume occupato dalla polvere di ossido di zinco.

La quantità di farmaco che diffonde nell'ossido di zinco per ogni impregnazione è pari a 7.5 mg ottenendo una percentuale totale di HC di 0.74% in massa. Al termine di ogni operazione di impregnazione, il sistema è stato lasciato a riposo per circa un'ora per consentire l'evaporazione del solvente.

Sono stati preparati due sistemi con Meso-ZnO e HC impregnato:

1. Il primo sistema contiene il 15.3% in massa di farmaco; per ottenere tale percentuale sono state effettuate 24 impregnazioni;
2. La seconda impregnazione prevede una quantità di HC pari a 8.3% in massa, ottenuta con 12 impregnazioni.

Il campione di Meso-ZnO_COR, contenente 8.3% in massa di farmaco, è stato preparato con lo stesso procedimento conoscendo la solubilità del cortisone in acetone, pari a 10 mg/ml. Ogni operazione consente l'impregnazione di 5 mg di farmaco (0.5%) nel *carrier*; per ottenere la quantità finale sono state effettuate 18 impregnazioni.

4.5 Invecchiamento

Il campione Meso-ZnO_HC_15% è stato lasciato ad invecchiare per un mese per valutare gli effetti del tempo e dell'umidità sulla cristallinità del farmaco contenuto nella matrice.

Metà quantità del campione è stata stoccata in un ambiente asciutto e in assenza di luce, l'altra metà è stata posta in un essiccatore da laboratorio. La parte bassa dell'essiccatore è stata riempita con acqua, il campione è stato posto in un contenitore sul piatto forato in ceramica, come riportato in figura 3.3:



Figura 4.3: Campione Meso-ZnO_HC_15% in essiccatore

Successivamente, si è deciso di usare lo stesso procedimento per verificare la stabilità del supporto a contatto con l'umidità.

4.6 Rilascio dell'Idrocortisone

Le prove di rilascio sono state effettuate per stimare la concentrazione di farmaco disciolta in una soluzione in funzione del tempo; al termine della misura si può valutare il tempo impiegato dal farmaco per passare in soluzione e, quindi, il suo tempo di biodisponibilità. Si è deciso di confrontare le cinetiche di rilascio del campione impregnato Meso-ZnO_HC_15% e del farmaco cristallino puro.

Inizialmente è stata preparata una soluzione di HC in PBS a concentrazione 13.33 ppm per valutare lo spettro di assorbimento del farmaco; si registra un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di 248 nm.

È stata costruita la retta di taratura per l'analisi della soluzione di idrocortisone in PBS, solvente a pH pari a 7.4. Si è deciso di usare il tampone fosfato alcalino per simulare l'ambiente di rilascio del farmaco. È stata creata una soluzione madre a concentrazione 30 ppm, misurando

0.03g di HC in un volume di 1 litro di PBS, dalla quale sono state preparate le diluizioni a concentrazioni di 19 ppm, 15 ppm, 12 ppm, 9 ppm, 5 ppm, 2 ppm. Dalla stima dell'assorbanza, letta mediante lo spettrofotometro al picco massimo di 248 nm, si ottiene la retta di taratura.

La misura di rilascio è stata effettuata in continuo nello strumento USP II (Erweka Dissolution Tester, GmdH, Germania), riportato nella seguente figura:

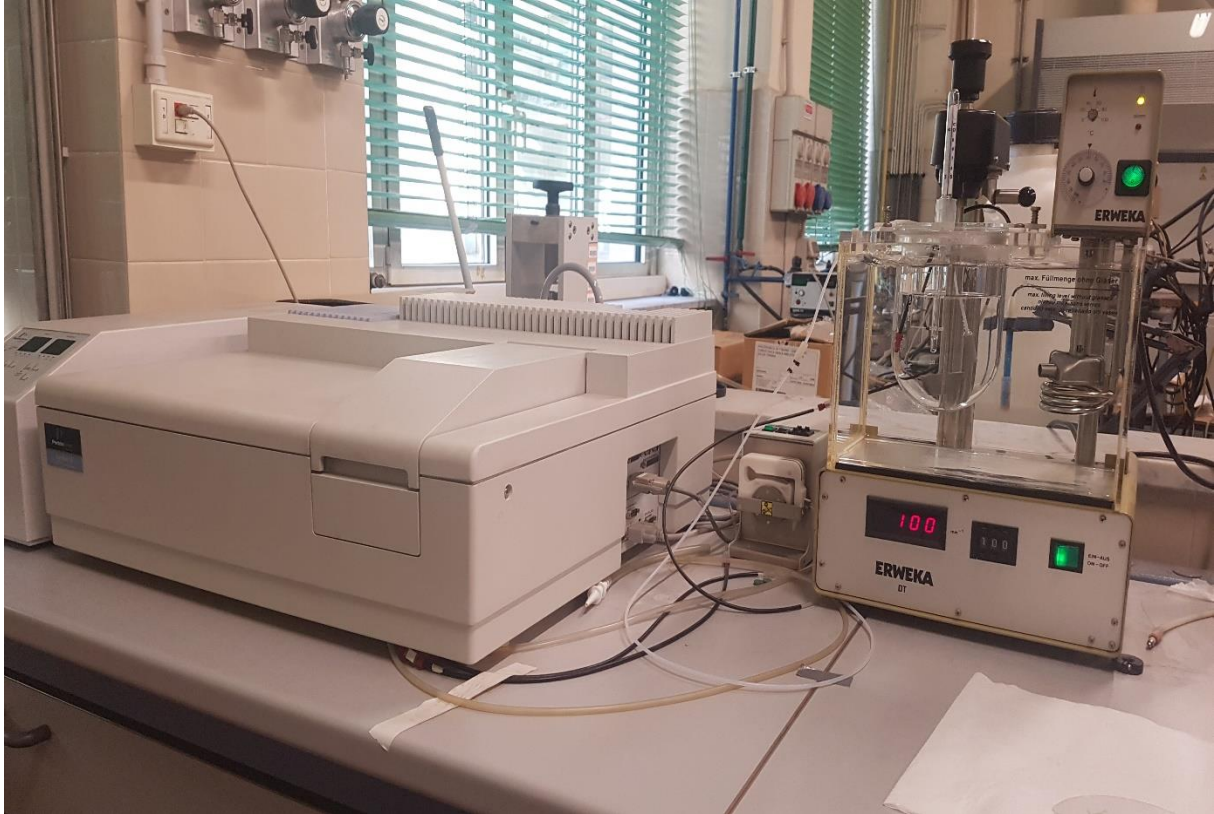


Figura 4.4: Sistema usato per il rilascio del farmaco idrocortisone

Il recipiente è stato riempito fino a 750 cc con tampone fosfato alcalino ed è stato inserito in un bagno termostato e mantenuto a 40°C. È stato aggiunto il campione da analizzare nel recipiente che viene opportunamente agitato da un agitatore, la cui velocità è impostata a 100 giri/min. Il dispositivo è collegato ad una pompa peristaltica che, in continuo, preleva una quantità di soluzione e la invia allo spettrofotometro analizzando il suo valore di assorbanza. Al termine della misura, la pompa ricircola la soluzione nel recipiente. Il prelievo è effettuato mediante un piccolo tubo contenente un filtro che separa eventuali particelle di *carrier*. Le particelle di ossido di zinco assorbono la radiazione UV alterando la misura di assorbanza.

È stato impostato un tempo di prova di 8h e i prelievi sono stati effettuati ogni 5 secondi. La misura è stata condotta pesando 13,7 mg di HC per il rilascio del farmaco puro e 91,3 mg di campione Meso-ZnO_HC_15% per la seconda prova.

4.7 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), Diffratometria a raggi x (XRD), Spettroscopia UV.

4.7.1 Analisi di fisisorbimento ad azoto

Questo metodo di caratterizzazione è stato usato per valutare l'area superficiale specifica, la dimensione dei pori e il volume dei pori del materiale mesoporoso; al termine della prova si ottiene l'isoterma di adsorbimento che deve essere confrontata con le isoterme di riferimento definite dalla classificazione IUPAC.

L'analisi è stata effettuata mediante lo strumento "ASAP 2020 PLUS" della Micromeritics; l'area superficiale dei campioni analizzati è stata valutata nell'intervallo di pressione relativa tra 0.1 e 0.3 e l'area BET è stata ottenuta con il modello Brunauer-Emmet-Teller.

La prova prevede un'operazione di degasaggio iniziale, in condizioni di vuoto, per eliminare eventuali sostanze estranee presenti sul materiale. Il degasaggio è stato effettuato a 150°C per l'Ossido di Zinco, 70°C per i campioni impregnati.

4.7.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

La tecnica FTIR consente di valutare le interazioni tra la matrice e i farmaci studiati in seguito ai processi di incorporazione e impregnazione.

La caratterizzazione dei campioni è stata eseguita mediante uno spettrofotometro "Brucker Tensor 27" correlato al software Opus. È stata preparata una pastiglia supportata da Bromuro di Potassio (KBr), inerte al fascio di radiazioni. Il campione in proporzione 50:50 di KBr è stato pressato in una pressa idraulica ad una pressione inferiore a 3 torr per 10 secondi. Per ogni prova, è stata effettuata un'operazione di degasaggio a temperatura ambiente per 1h.

4.7.3 Diffratometria a raggi X

La struttura di un solido cristallino è studiata mediante le misure XRD.

In laboratorio è stato usato lo strumento "PANalytical X'Pert Powder", connesso al software in cui sono state impostate le condizioni di 40 KV per la tensione e 40 mA per la corrente. L'analisi è stata eseguita in condizioni di alti angoli, ottenendo uno spettro diffrattometrico nell'intervallo tra 5 e 80 di 2θ .

4.7.4 Spettroscopia UV

La spettroscopia UV è stata usata nell'ultima parte della tesi per valutare il rilascio dell'Idrocortisone impregnato nell'Ossido di Zinco. La misura della quantità rilasciata è stata effettuata a valori di assorbanza corrispondenti al picco massimo di assorbimento del farmaco.

È stato impiegato uno spettrofotometro "PerkinElmer" connesso al software "Lamba 25" e i campioni sono stati analizzati in cuvette di quarzo da 10mm.

Capitolo 5

Risultati

In questo capitolo vengono descritti i risultati ottenuti durante la caratterizzazione dell'Ossido di Zinco mesoporoso e dei sistemi impregnati da idrocortisone e cortisone. Nella parte successiva vengono riportate le analisi di invecchiamento effettuate sul sistema HC@Meso-ZnO_15% e sul supporto.

5.1 Caratterizzazione dell'Ossido di Zinco mesoporoso

5.1.1 Analisi di fisisorbimento ad azoto

Nella figura 5.1 viene riportata l'isoterma di adsorbimento ad azoto a 77K dell'ossido di zinco mesoporoso:

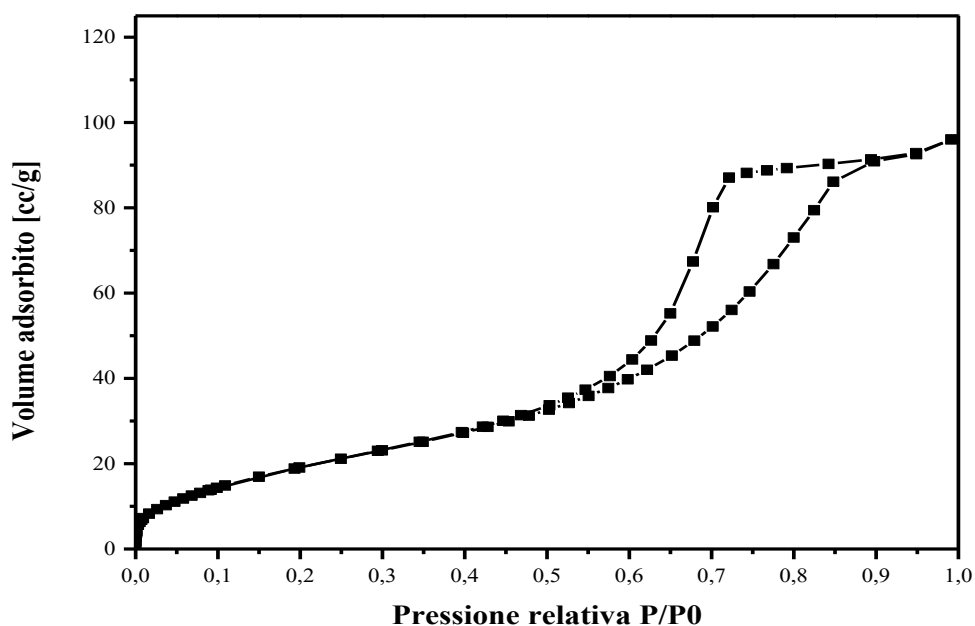


Figura 5.1: Isoterma di adsorbimento di azoto di Meso-ZnO

Secondo la classificazione IUPAC, l'isoterma ottenuta è di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi con diametro compreso tra 2 e 50 nm [56]. La caratteristica dell'isoterma è il ciclo di isteresi: partendo da pressioni relative prossime all'unità si compie il ciclo inverso, ciclo di desorbimento; la curva non segue lo stesso tracciato di adsorbimento [57]. Inizialmente il gas tende a formare un monostrato, in seguito, si ha la formazione di un multilayer. Ad una certa pressione il gas all'interno dei pori non è stabile in fase vapore e condensa (condensazione capillare) [57].

La seguente figura mostra la distribuzione monomodale dei pori con diametro di 8 nm.

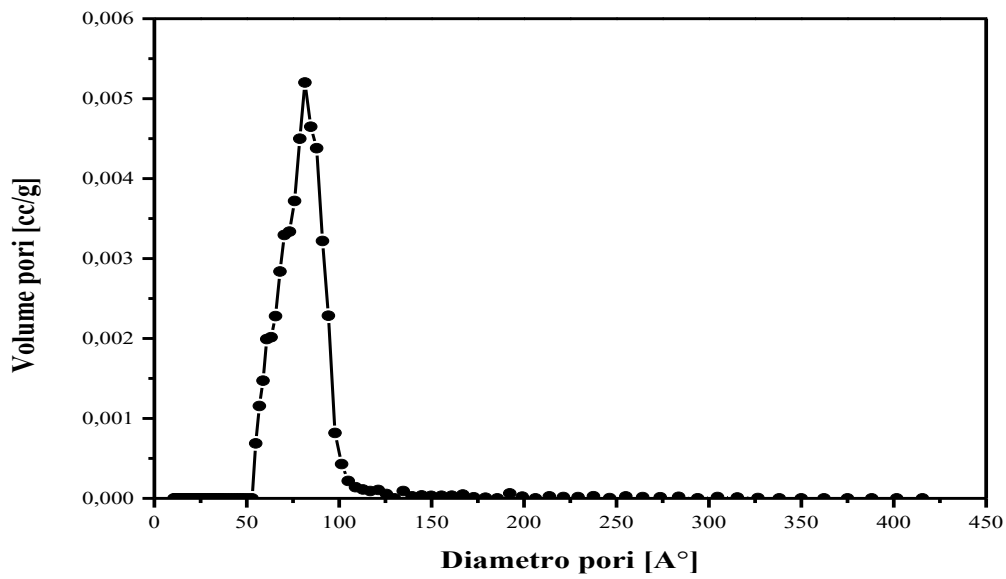


Figura 5.2: Distribuzione porosimetrica di Meso-ZnO

L'area superficiale specifica, calcolata mediante il modello BET, è pari a $75 \text{ m}^2/\text{g}$; il volume dei pori, ottenuto con il modello NLDFT equilibrium, risulta $0.14 \text{ cm}^3/\text{g}$.

5.1.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

La figura 5.3 riporta lo spettro FT-IR dell'ossido di zinco.

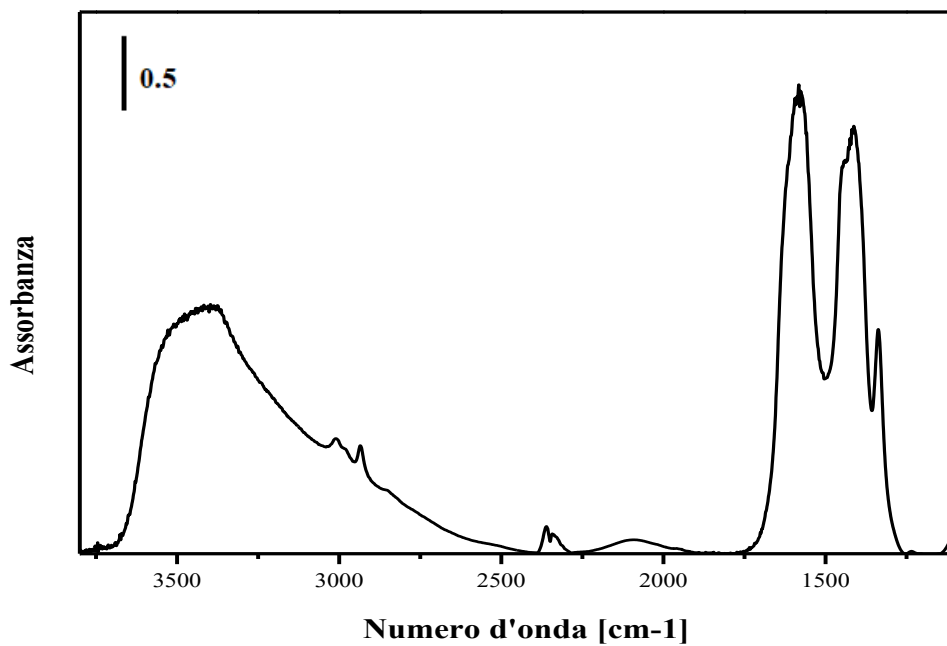


Figura 5.3: Spettro FT-IR di Meso-ZnO

Si può notare una banda larga intorno a 3400 cm^{-1} , legata alle vibrazioni dei gruppi ossidrili superficiali. Le bande strette e intense tra $1600\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ sono tipiche dei carbonati superficiali, dovute al chemisorbimento dell'anidride carbonica sull'ossido di zinco.

I risultati ottenuti sono concordi ai valori riportati in letteratura [51].

5.1.3 Diffrazione a Raggi X

L'analisi diffrattometrica a Raggi X ha prodotto il seguente spettro:

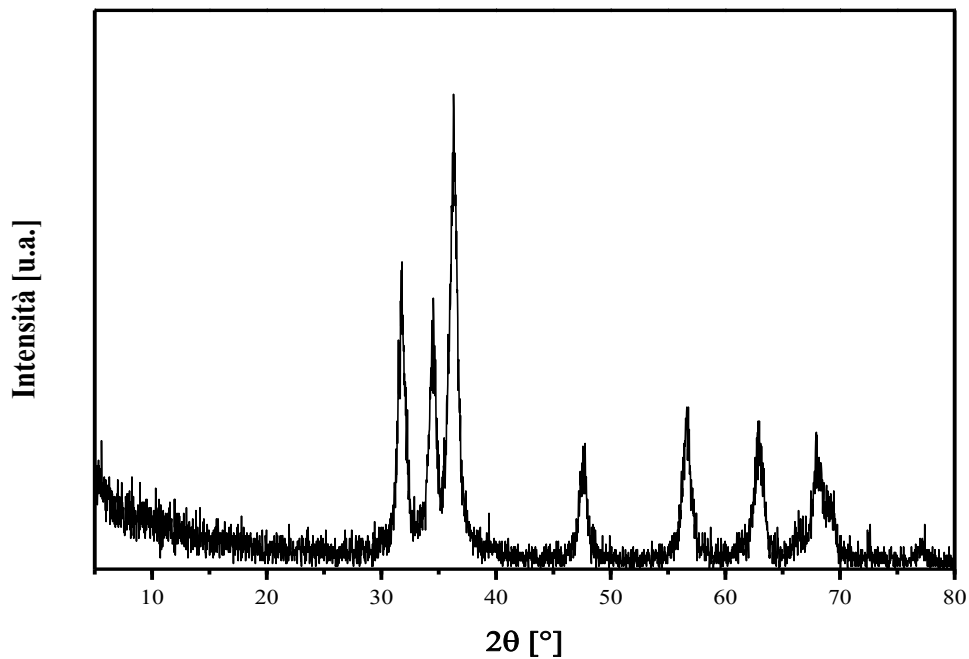


Figura 5.4: Spettro XRD di Meso-ZnO

I riflessi visibili nello spettro a $2\theta = 31.73^\circ, 34.31^\circ, 36.02^\circ, 47.58^\circ, 56.42^\circ, 62.70^\circ, 66.41^\circ, 67.98^\circ, 69.12^\circ, 76.98^\circ$ sono tipici della struttura wurtzite. Dall'articolo di Mitra et al [51] si può notare che i valori sperimentali corrispondono agli stessi della letteratura.

5.2 Caratterizzazione Idrocortisone

5.2.1 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

La seguente figura riporta lo spettro FT-IR dell'idrocortisone, farmaco supportato sull'ossido di zinco mesoporoso:

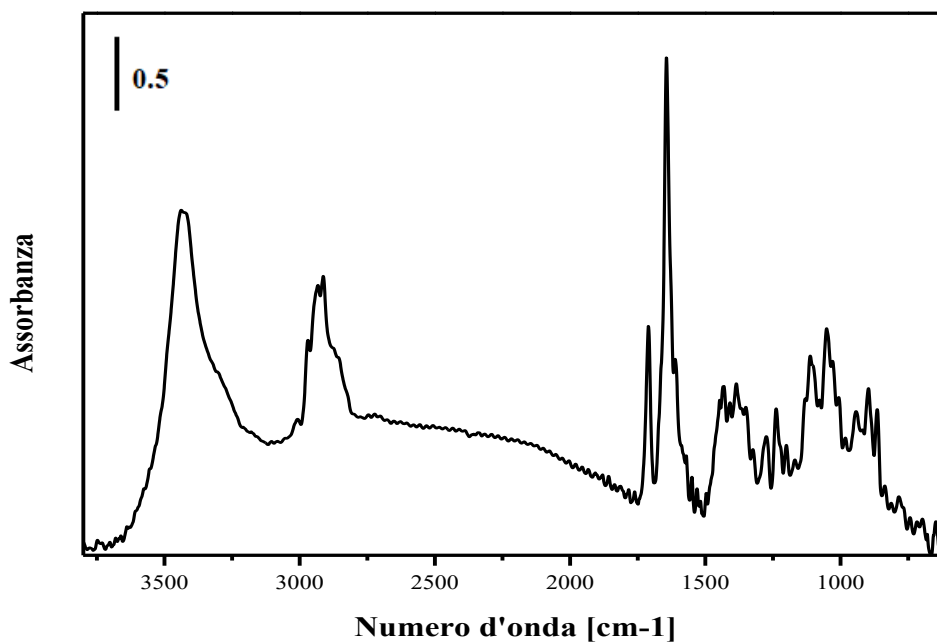


Figura 5.5: Spettro FT-IR dell'Idrocortisone

Lo spettro riporta i picchi caratteristici del farmaco: la banda stretta e intensa a 3435 cm^{-1} corrisponde alle vibrazioni stretching dei gruppi ossidrilici intermolecolari; i modi relativi ai valori di 2972 e 2931 cm^{-1} sono tipici dello stretching dei gruppi C-H. I valori ottenuti sperimentalmente sono in accordo con quelli riportati in letteratura [58].

I picchi intensi a 1710 e 1644 cm^{-1} corrispondono ai due gruppi carbonili presenti nell'idrocortisone. Il primo è il modo del gruppo carbonilico del gruppo carbossilico impegnato in due legami idrogeno intermolecolari; il secondo corrisponde al gruppo carbonile dell'anello a sei atomi di carbonio. La figura seguente evidenzia i due gruppi carbonili:

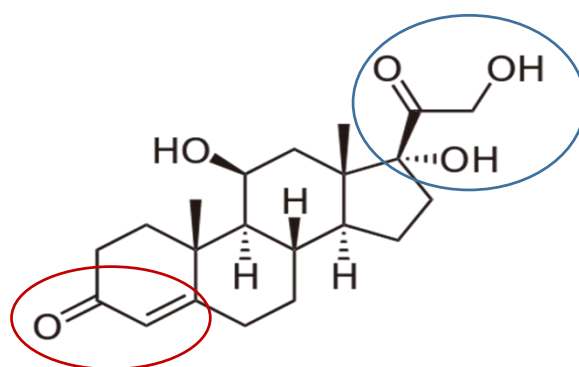


Figura 5.6: Gruppi carbonili dell'idrocortisone

Le vibrazioni bending del gruppo C=O appartengono all'intervallo $1830-1650\text{ cm}^{-1}$; l'involuppo del doppio legame C=C corrisponde al numero d'onda 1650 cm^{-1} [59]. Nell'idrocortisone, perciò, si presenta un doppio effetto in quanto i carbonili sono legati ai gruppi O-H e al doppio legame C=C; l'intensità, quindi, si rafforza ottenendo dei picchi alti.

Alcuni autori [60] hanno assegnato la banda a 1644 cm^{-1} al gruppo (C=O)OH; questa assunzione non è corretta in quanto una banda del carbonile di un gruppo carbossilico non può scendere sotto il valore di 1700 cm^{-1} [61].

5.2.2 Diffrazione a Raggi X

L'analisi a diffrazione a Raggi X è stata effettuata per valutare la cristallinità del farmaco. Lo spettro XRD ottenuto è riportato nella figura seguente:

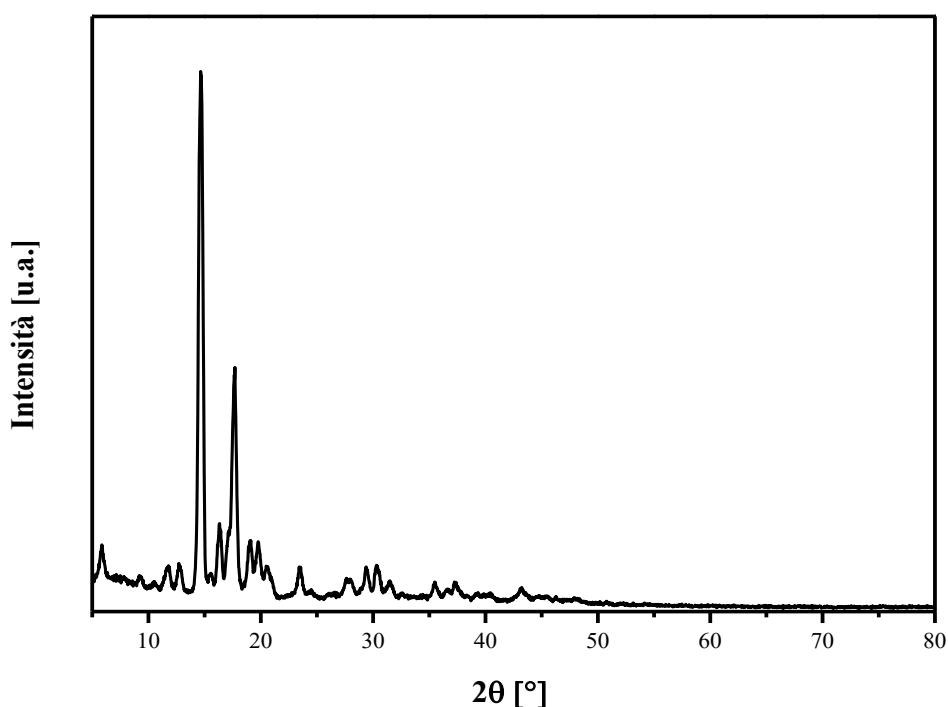


Figura 5.7: Spettro XRD dell'Idrocortisone

Dalla figura è possibile evidenziare un picco intenso a $2\theta = 14.65^\circ$; gli altri picchi corrispondono a $2\theta = 16.33^\circ, 17.69^\circ, 19.11^\circ, 19.77^\circ, 23.42^\circ, 27.54^\circ, 29.38^\circ, 29.48^\circ, 31.48^\circ, 35.47^\circ, 37.23^\circ, 43.25^\circ$.

5.3 Caratterizzazione del Cortisone

5.3.1 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

La figura 5.8 mostra lo spettro del farmaco cortisone ottenuto dall'analisi FT-IR:

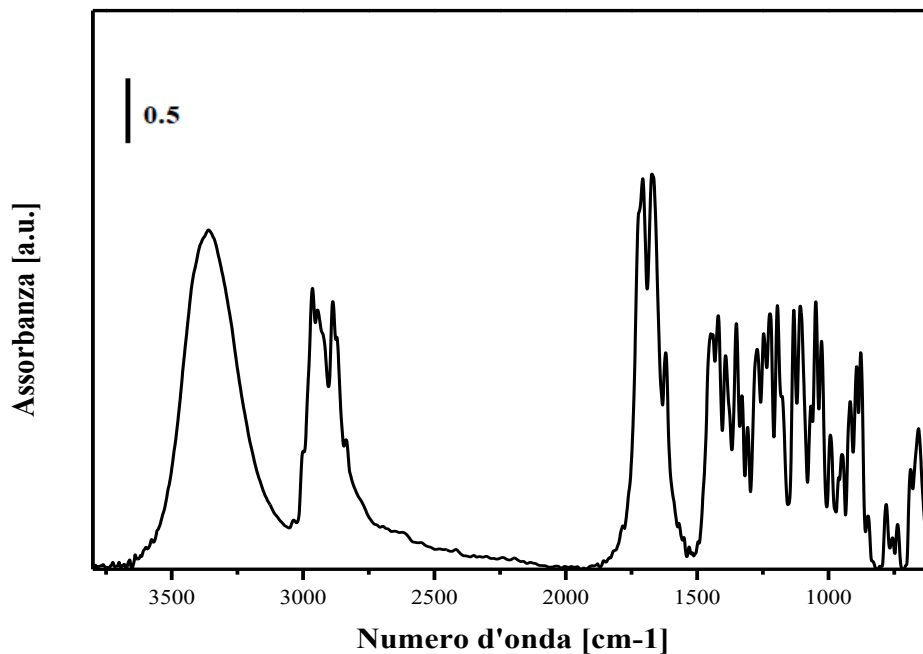


Figura 5.8: Spettro FT-IR del Cortisone

È evidente una banda stretta a 3340 cm⁻¹ corrispondente alle vibrazioni stretching dei gruppi ossidrilici; i modi dei gruppi C-H appartengono all'intervallo compreso tra 2965-2885 cm⁻¹. I picchi tra 2000-1500 cm⁻¹ sono tipici dei gruppi carbonili e carbossilico.

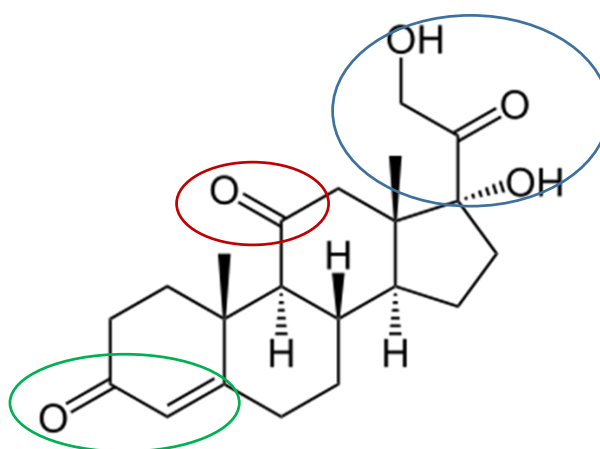


Figura 5.9: Gruppi carbonili del cortisone

5.3.2 Diffrazione a Raggi X

La figura seguente riporta lo spettro del cortisone, farmaco usato per l'impregnazione in ossido di zinco:

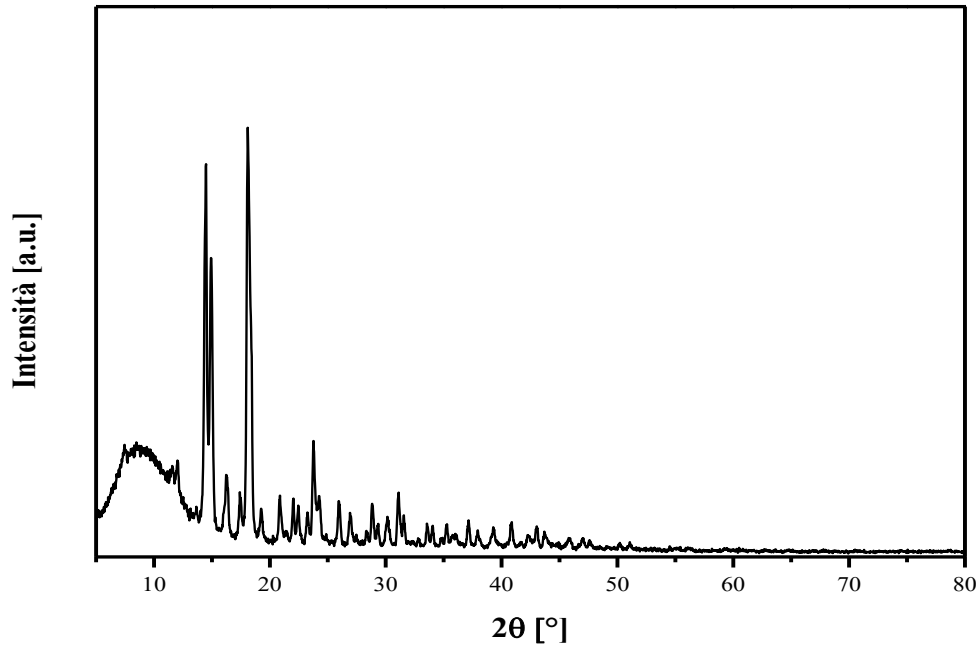


Figura 5.10: Spettro XRD del Cortisone

Lo spettro mostra dei picchi che confermano la natura cristallina del farmaco; i picchi corrispondono a $2\theta = 14.49^\circ, 14.94^\circ, 15.59^\circ, 15.88^\circ, 16.22^\circ, 17.42^\circ, 18.09^\circ, 19.27^\circ, 20.27^\circ, 20.87^\circ, 23.76^\circ$.

5.4 Caratterizzazione di HC@Meso-ZnO dopo adsorbimento da CO₂ supercritica

È stata eseguita la prova di adsorbimento dell'idrocortisone in ossido di zinco con scCO₂; il sistema ottenuto è stato caratterizzato mediante spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier e nella figura 5.11 è riportato lo spettro ottenuto.

Sono evidenti le bande tipiche dell'ossido di zinco ma non quelle relative al farmaco; l'idrocortisone, essendo poco solubile in scCO₂, non è efficacemente adsorbito sul supporto.

Lo spettro mostra i seguenti assorbimenti: una banda larga intorno a 3400 cm⁻¹ dovuta alle vibrazioni dei gruppi ossidrilici superficiali; una banda stretta e intensa sotto i 2000 cm⁻¹ legata ai carbonati superficiali che si formano in seguito ai trattamenti dell'ossido di zinco con scCO₂.

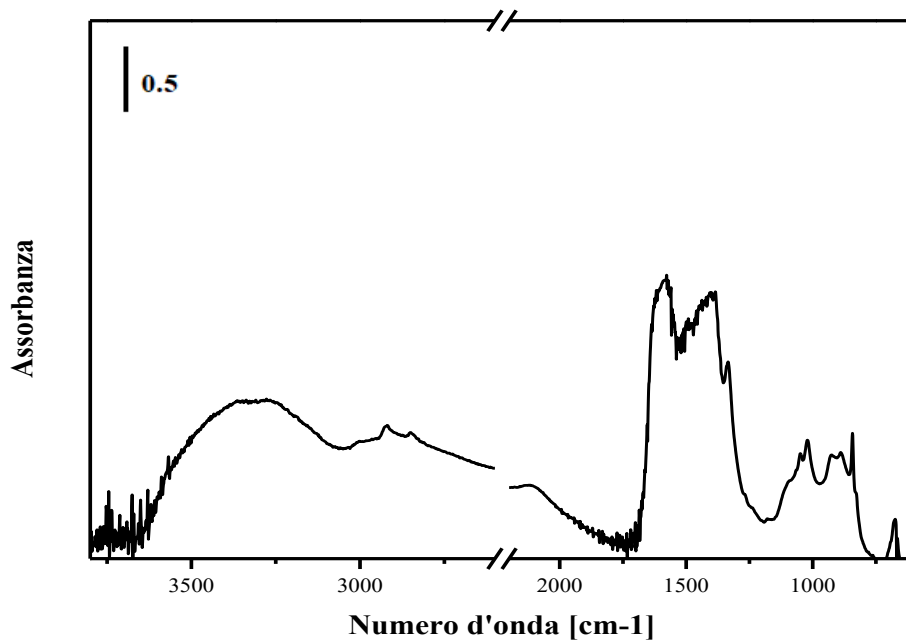


Figura 5.11: Spettro FT-IR di HC@Meso-ZnO_scCO₂

5.5 Caratterizzazione di HC@Meso-ZnO_15% dopo Incipient Wetness Impregnation

5.5.1 Diffrazione a Raggi X

La prova a diffrazione a raggi x permette di affermare che il farmaco è stato supportato sul carrier con successo; lo spettro mostra due fasi cristalline, una dovuta alla struttura wurtzite del supporto, l'altra al principio attivo che non si disperde in modo amorfo.

Nella seguente figura si notano i picchi intensi dell'idrocortisone a $2\theta=14.65^\circ, 16.33^\circ$.

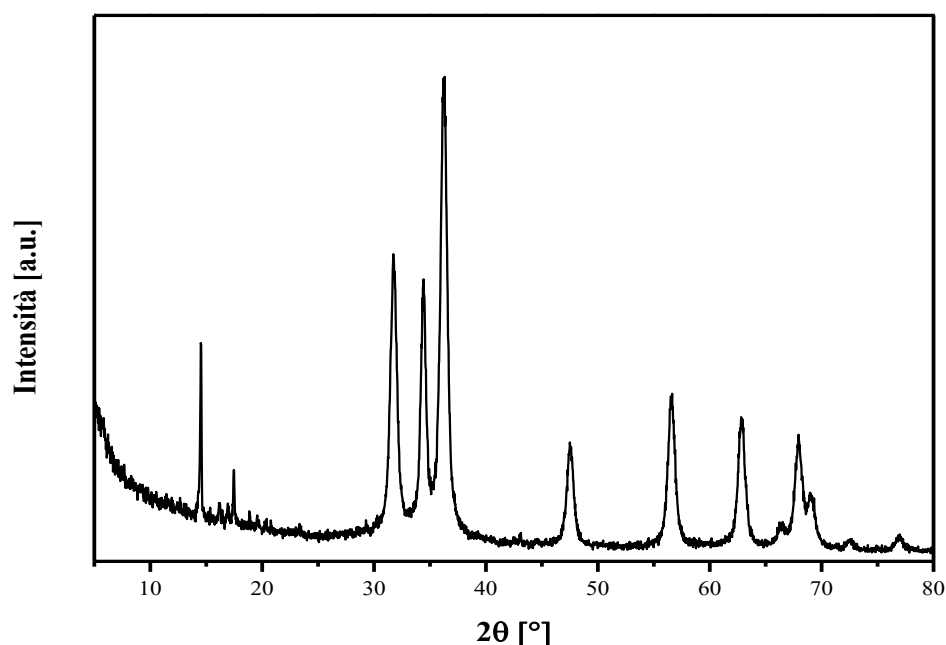


Figura 5.12: Spettro XRD di HC@Meso-ZnO_15%

Dal confronto con la letteratura [60] [62] emerge che l'idrocortisone in matrici organiche tende a disperdersi in modo amorfo; nel lavoro sperimentale di tesi, in matrici inorganiche come l'ossido di zinco, si ottiene la cristallizzazione del farmaco.

La differenza tra i due sistemi è legata al tipo di interazione con il carrier; nel caso di matrice polimerica si verifica un assorbimento del farmaco all'interno del supporto in forma molecolare. Sulla matrice inorganica, al contrario, il principio attivo viene adsorbito e l'interazione tra carrier e idrocortisone svolge un ruolo importante per stabilizzare la forma amorfa. Se l'interazione tra la superficie dell'ossido di zinco e il farmaco non è efficace, l'idrocortisone non si disperde nei mesopori ma le molecole interagiscono tra loro e possono crescere formando dei cristalli.

5.5.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

L'analisi FT-IR mostra la presenza dell'idrocortisone nell'ossido di zinco; nella figura 5.14 sono evidenti delle bande strette che confermano la cristallinità del principio attivo. Nel caso di dispersione amorfa del farmaco, infatti, le bande corrispondenti ai gruppi funzionali sono più larghe [32].

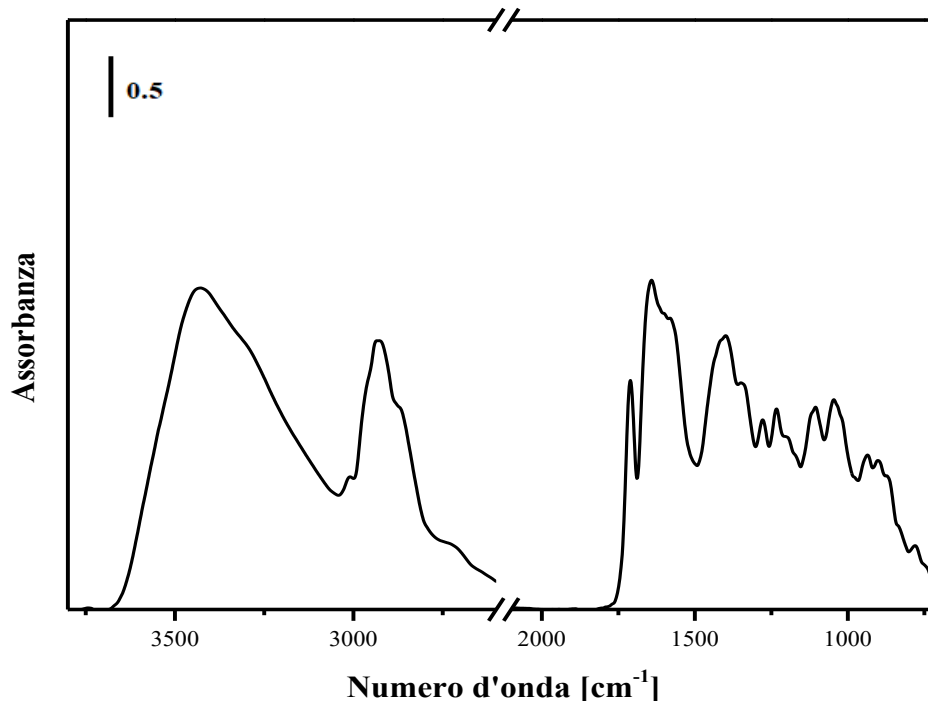


Figura 5.13: Spettro FT-IR di HC@Meso-ZnO_15%

Lo spettro mostra i seguenti assorbimenti: un assorbimento intorno a 3400 cm^{-1} legato alle vibrazioni dei gruppi ossidrilici; una banda intensa a 2900 cm^{-1} relativa ai modi dei C-H dell'idrocortisone e un picco a 1710 cm^{-1} tipico del C=O del principio attivo. Confrontando questo sistema con lo stesso farmaco in matrici polimeriche [60], si può notare la scomparsa della banda a 1710 cm^{-1} ; il gruppo carbossilico, quindi, a contatto con supporti organici si dissocia e diventa carbossilato. In matrici inorganiche, come l'ossido di zinco, il gruppo carbossilico non si trasforma ottenendo nello spettro FT-IR il picco tipico del gruppo funzionale.

Le bande tra 1730 e 1250 cm^{-1} sono tipiche dei carbonati superficiali dell'ossido di zinco.

5.5.3 Analisi di fisisorbimento ad azoto

Dalla prova di caratterizzazione si ottiene l'isoterma di adsorbimento (figura 5.15) del sistema HC@Meso-ZnO; nella tabella 5.1 sono posti a confronto i valori dell'area superficiale e del volume dei pori del sistema impregnato e dell'ossido di zinco sintetizzato:

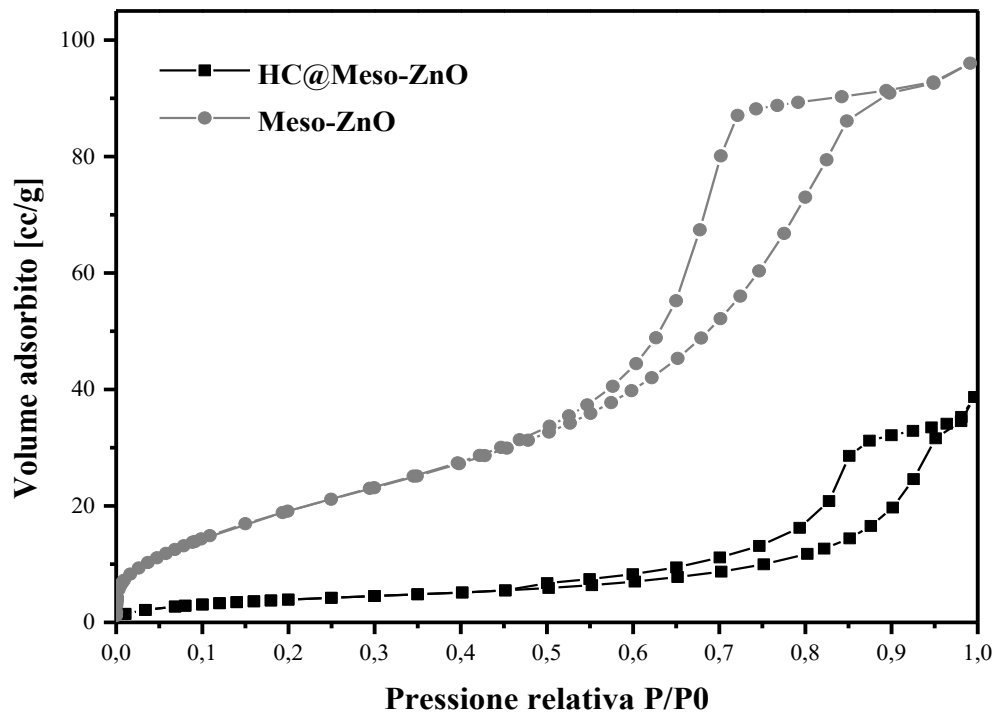


Figura 5.14: Isotherma di adsorbimento di HC@Meso-ZnO_15%

Tabella 5.1: Confronto dei valori di area superficiale e di volume dei pori

	Area superficiale [m ² /g]	Volume dei pori [cc/g]
Meso-ZnO	75	0.14
HC@Meso-ZnO	15	0.06

Dai valori ottenuti dall'analisi BET si osserva una riduzione dell'area superficiale e del volume dei pori; la riduzione può essere associata alla locazione del farmaco nei pori o all'occlusione dei pori. La forma dell'isoterma del sistema HC@Meso-ZnO è cambiata; la variazione indica un intimo contatto del farmaco cristallino con il supporto.

5.5.3.1 Confronto dei sistemi HC@Meso-ZnO e IBU@Meso-ZnO

Si è deciso di confrontare i dati relativi all'analisi BET del sistema impregnato HC@Meso-ZnO con il sistema IBU@Meso-ZnO [63] in cui l'ibuprofene è amorfo nello stesso supporto per valutare il comportamento dell'idrocortisone nell'ossido di zinco. Entrambi i campioni presentano la stessa percentuale di farmaco incorporata, 15% in massa.

Sono state calcolate le variazioni di area superficiale e volume dei pori nei due sistemi:

Tabella 5.2: Variazioni percentuali di area superficiale e volume dei pori nei sistemi HC@Meso-ZnO e IBU@Meso-ZnO

	$\Delta S_{BET}(\%)$	$\Delta V_p (\%)$
HC@Meso-ZnO_IWI	80%	57%
IBU@Meso-ZnO_scCO ₂ [63]	75%	64%

Confrontando i valori ottenuti, si nota una variazione simile dell'area superficiale e del volume poroso tra i due diversi sistemi: l'ibuprofene è completamente amorfo nell'ossido di zinco mesoporoso, l'idrocortisone, al contrario, è parzialmente cristallino. Assumendo che la cristallizzazione del farmaco non avvenga all'interno dei pori molto piccoli dell'ossido (circa 8 nm), le variazioni drastiche di area superficiale e volume indicano l'occlusione dei pori. Il principio attivo, dunque, cristallizza occludendo i pori della superficie esterna e i cristalli finemente dispersi non occupano il volume interno dei mesopori.

La diversa disposizione dei due farmaci anti-infiammatori nello stesso supporto è osservata nella variazione del coppia di isteresi nell'isoterma di adsorbimento:

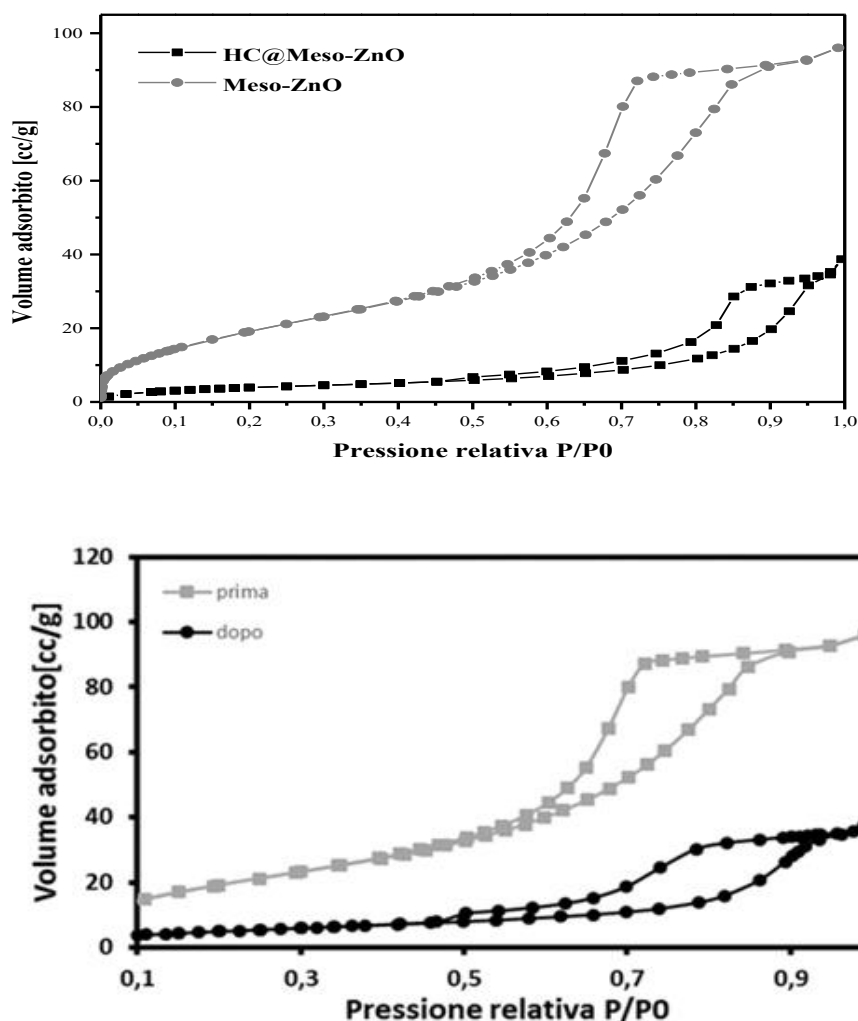


Figura 5.15: Isotherme di adsorbimento di HC@Meso-ZnO_IWI e IBU@Meso-ZnO_scCO₂ [63]

Il coppia di isteresi e la curva di desorbimento sono diverse nelle due isoterme; nel sistema con idrocortisone il coppia è più in alto ed è spostato verso destra, nell'altro caso il coppia si è allargato. Lo step di caduta del desorbimento è meno nitido ed accentuato con l'ibuprofene.

Tali variazioni indicano un contatto intimo dell'idrocortisone con la matrice, infatti, confrontando il sistema con il campione contenente l'ibuprofene, si registrano valori di area superficiali e volume dei pori simili; dalla forma dell'isoterma si può comprendere il comportamento diverso del farmaco parzialmente cristallino rispetto a quello amorfo.

Si può escludere che il sistema HC@Meso-ZnO si comporti come una miscela meccanica; in questo caso si dovrebbe ottenere una riduzione dell'area più piccola. Si suppone, per esempio, di preparare una miscela meccanica in cui l'ossido di zinco e l'idrocortisone al 15% in massa vengono miscelati. Considerando 1g come base di calcolo, il campione è costituito da 850 mg di ZnO e 150 mg di HC. Assumendo che l'area superficiale e il volume poroso misurati dall'azoto dipendano solo dal carrier e non dall'idrocortisone, si ottengono dei valori dovuti alla variazione in massa dell'ossido di zinco. L'area libera dell'ossido, dopo la miscelazione, è pari a $64 \text{ m}^2/\text{g}$, ottenuta dal prodotto dell'area iniziale del carrier ($75 \text{ m}^2/\text{g}$) e della quantità di ossido di zinco presente (0.85 g); si calcola, infine, una variazione percentuale di circa 15%, pari al contenuto di principio attivo aggiunto. Il medesimo calcolo è eseguito per il volume dei pori, ottenendo un volume libero nella matrice pari a 0.4 cc/g . Con una miscela meccanica, l'idrocortisone precipita sul carrier, quindi si ottiene solo un effetto sulla variazione della massa di Meso-ZnO.

Dalle prove BET, però, emergono valori di area e volumi più bassi; questi dati confermano un intimo contatto tra il carrier e il farmaco che presenta una distribuzione omogenea sull'ossido di zinco. L'idrocortisone è finemente disperso e non si può escludere una fase amorfa nei mesopori.

5.6 Caratterizzazione di HC@Meso-ZnO_8% dopo Incipient wetness Impregnation

5.6.1 Diffrattometria a Raggi X

La prova di caratterizzazione a Raggi X mostra l'impregnazione della matrice di supporto dalla soluzione di idrocortisone. Riducendo la quantità in massa del farmaco fino a 8%, si registra la cristallizzazione del principio attivo; sono infatti evidenti i picchi del farmaco e della struttura wurtzite dell'ossido di zinco sintetizzato.

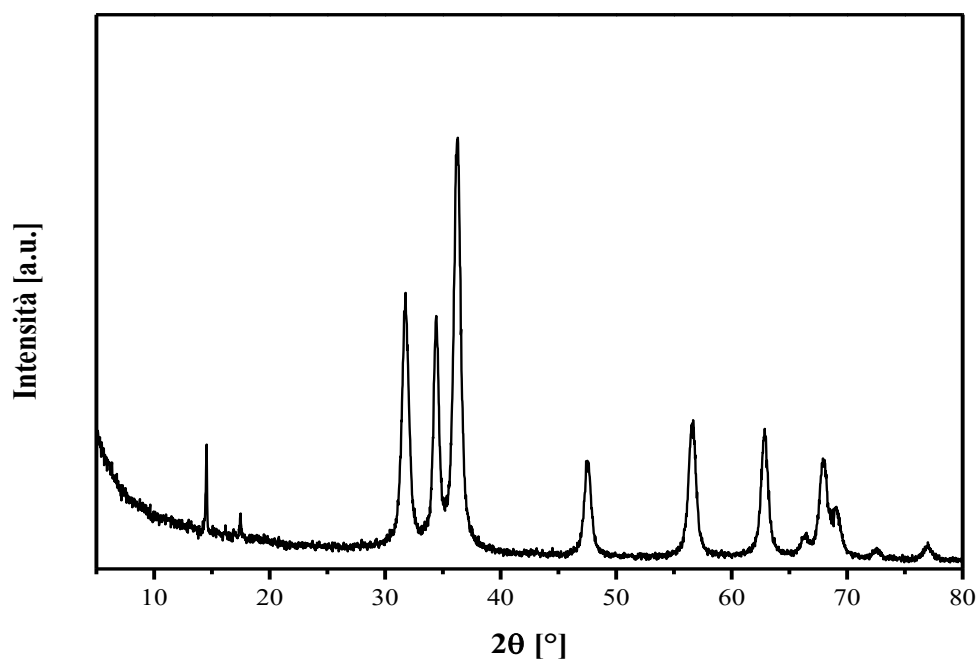


Figura 5.16: Spettro XRD di HC@Meso-ZnO_8%

5.6.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

Dalla prova FT-IR effettuata sul campione HC@Meso-ZnO_8%, emerge il seguente spettro:

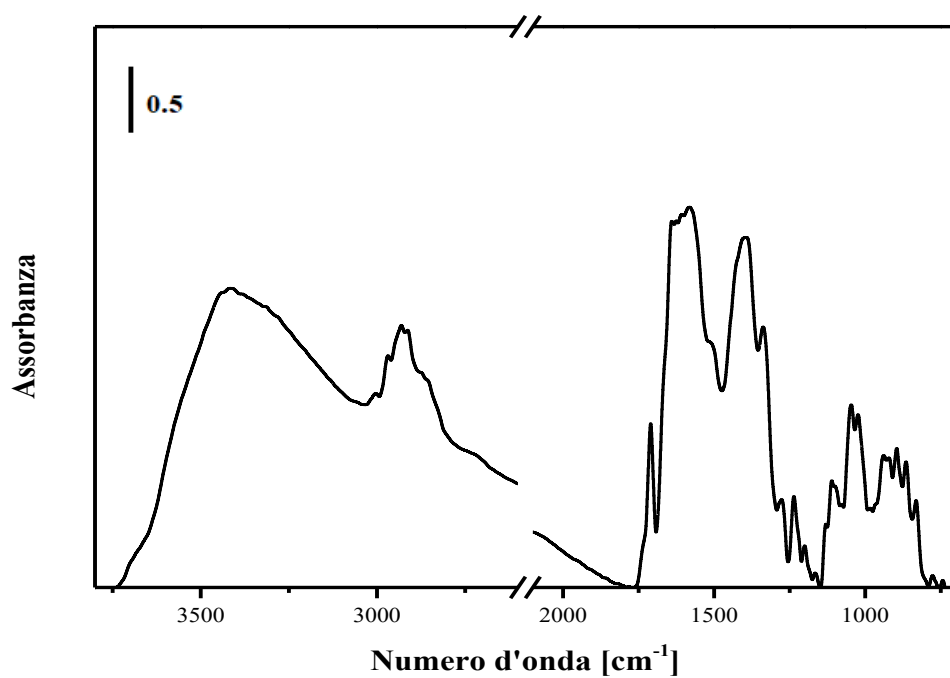


Figura 5.17: Spettro FT-IR di HC@Meso-ZnO_8%

Si osservano i picchi caratteristici dell'idrocortisone, quindi, l'impregnazione è avvenuta con successo. In questo sistema, come nel precedente, si notano delle bande strette che dimostrano la natura cristallina del principio attivo sul carrier.

5.6.3 Analisi di fisorbimento ad azoto

L'analisi di fisorbimento ad azoto ha prodotto l'isoterma riportata in figura 5.18:

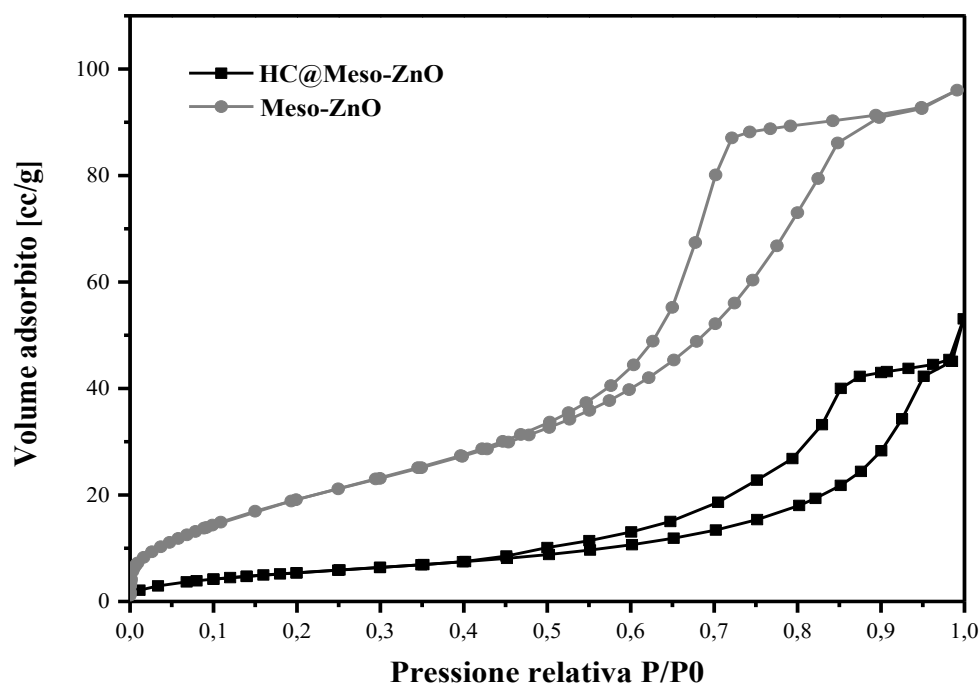


Figura 5.18: Isoterma di adsorbimento di HC@Meso-ZnO_8%

La tabella 5.3 riporta i valori dell'area superficiale e del volume dei pori prima e dopo l'impregnazione:

Tabella 5.3: Confronto dei valori di area superficiale e di volume dei pori

	Area superficiale [m ² /g]	Volume dei pori [cc/g]
Meso-ZnO	75	0.14
HC@Meso-ZnO	21	0.07

Sono stati ottenuti dei valori di area e volume dei pori più bassi rispetto alla matrice iniziale, quindi il farmaco si dispone sulla superficie dei pori occludendoli.

Applicando un ragionamento analogo al sistema HC@Meso-ZnO_15%, si può affermare che il farmaco è intimamente mescolato al carrier e non costituisce una fase segregata. L'idrocortisone è finemente disperso sulla matrice in una distribuzione omogenea e non può cristallizzare in pori di dimensioni piccole.

5.7 Caratterizzazione di COR@Meso-ZnO_8% dopo Incipient Wetness Impregnation

5.7.1 Diffrazione a Raggi X

La prova XRD riporta il seguente spettro in cui è visibile la presenza del farmaco che è stato supportato sulla matrice mediante tecnica di Incipient Wetness Impregnation. Il cortisone tende a formare dei cristalli sul supporto e presenta, perciò, comportamento paragonabile all'idrocortisone.

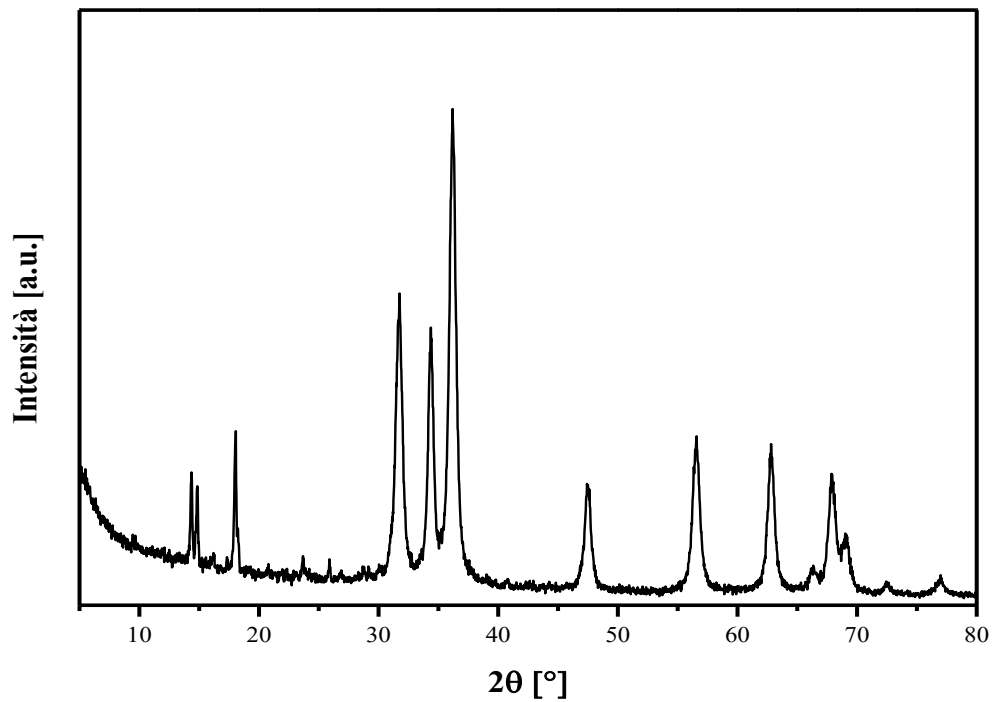


Figura 5.19: Spettro XRD di COR@Meso-ZnO_8%

5.7.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

La tecnica FT-IR viene applicata per valutare i gruppi funzionali del farmaco dopo l'operazione di impregnazione.

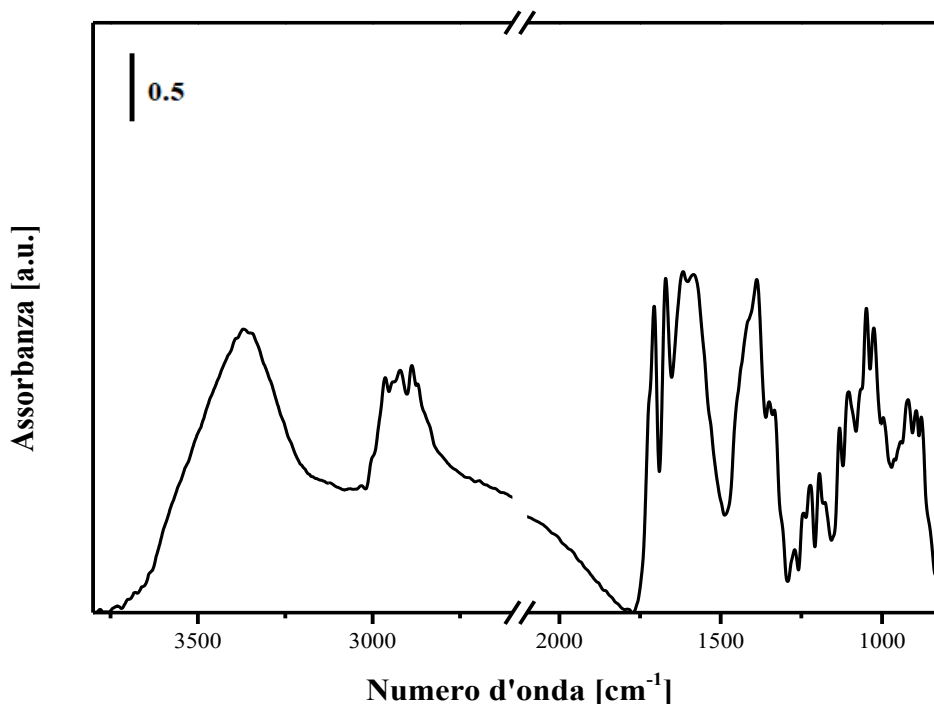


Figura 5.20: Spettro XRD di COR@Meso-ZnO_8%

Lo spettro esibisce i seguenti assorbimenti: una banda intorno a 3400 cm⁻¹ tipica dei gruppi ossidrilici O-H, le vibrazioni dei gruppi C-H appaiono nell'intervallo tra 2970-2880 cm⁻¹. Si osservano dei picchi che cadono tra 1700 e 1300 cm⁻¹; si tratta dei gruppi C=O appartenenti alla molecola del cortisone e dei carbonati superficiali dell'ossido di zinco. Le bande relative al cortisone sono ben marcate e, simile allo spettro ottenuto per HC@Meso-ZnO_15% (figura 5.14), non scompaiono; il carbonile del gruppo carbossilico non si dissocia nelle matrici inorganiche.

5.7.3 Analisi di fisisorbimento ad azoto

Dall'analisi di fisisorbimento ad azoto si ottiene la seguente figura in cui vengono confrontate le isoterme di adsorbimento dell'ossido di zinco e del cortisone supportato:

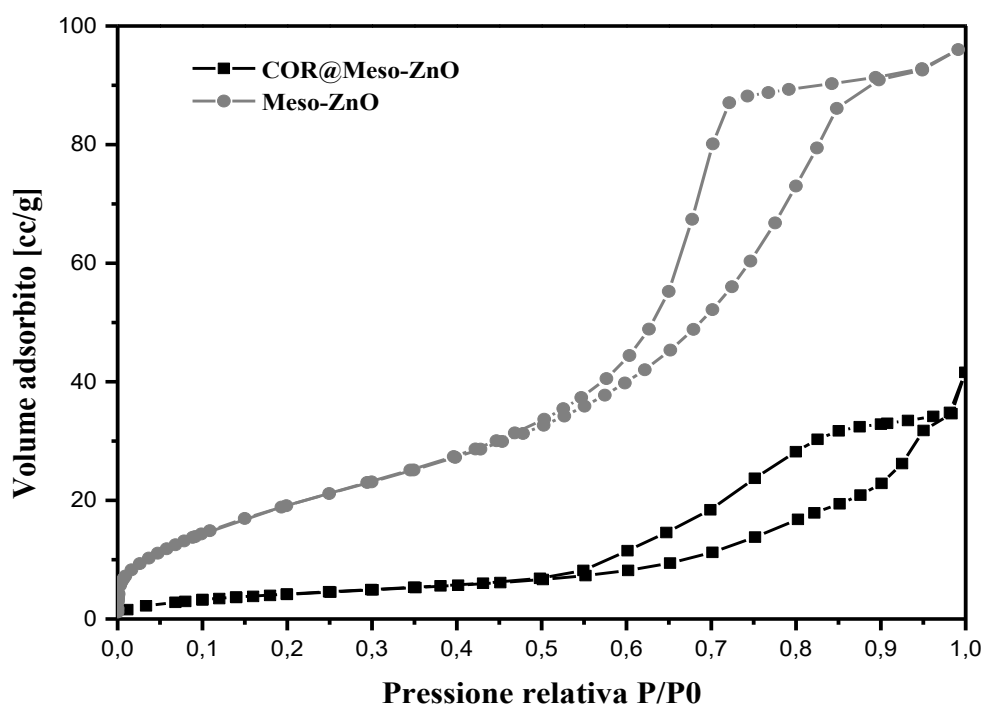


Figura 5.21: Isotherma di adsorbimento di COR@Meso-ZnO_8%

Non si osserva una differenza significativa rispetto all'isoterma di adsorbimento di HC@Meso-ZnO (figura 5.15).

Dall'analisi BET si calcolano l'area superficiale e il volume dei pori; i risultati sono riportati nella tabella 5.4:

Tabella 5.4: Confronto dei valori di area superficiale e di volume dei pori

	Area superficiale [m ² /g]	Volume dei pori [cc/g]
Meso-ZnO	75	0.14
COR@Meso-ZnO	16	0.065

Dai dati ottenuti, si può concludere che il cortisone ha un comportamento equivalente all'idrocortisone; è intimamente mescolato con il supporto disperdendosi sulla sua superficie in forma cristallina. Le variazioni di area superficiale e volume dei pori sono legate all'occlusione del farmaco che cristallizza sulla matrice; simile ai sistemi impregnati da idrocortisone non si può escludere una parziale amorfizzazione.

5.8 Effetto del tempo sulla cristallizzazione di HC@Meso-ZnO_15%

Il sistema HC@Meso-ZnO_15% è stato lasciato ad invecchiare in un ambiente asciutto ma non si riscontra nessuna variazione della cristallinità dell'idrocortisone.

Dalle prove XRD, emerge che il tempo non produce alcun effetto di amorfizzazione del farmaco; l'idrocortisone, infatti, mantiene la sua natura cristallina (figura 5.23). Il supporto, inoltre, risulta essere stabile e non subisce alcuna trasformazione in carbonato di zinco in presenza di anidride carbonica.

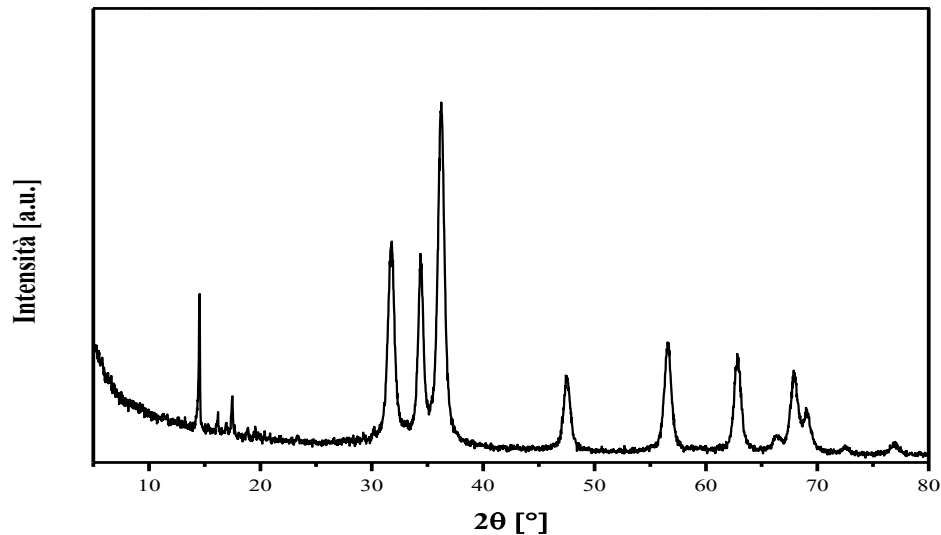


Figura 5.22: Spettro XRD di HC@Meso-ZnO_15%_SECCO

Dal confronto degli spettri prima e dopo invecchiamento, si osserva la stessa intensità dei picchi del principio attivo confermando la presenza dei cristalli sulla superficie del supporto.

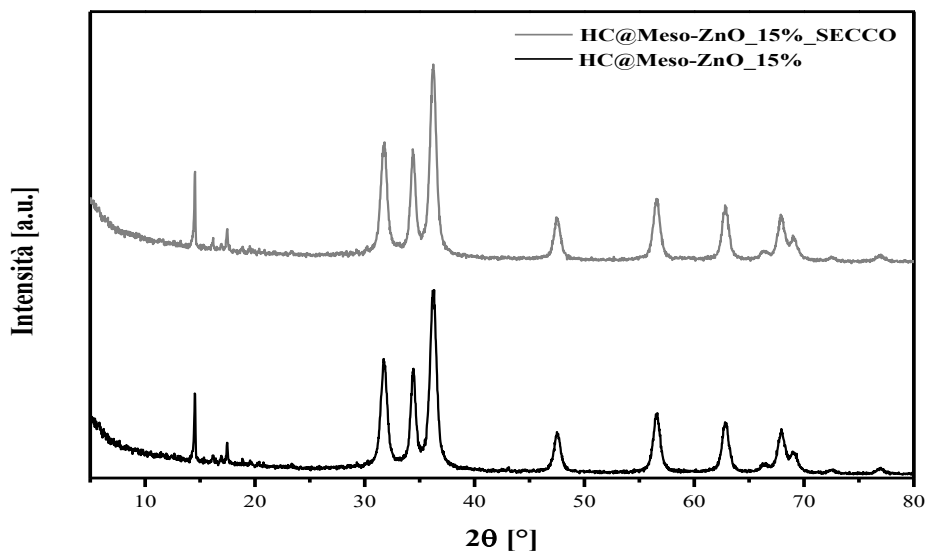


Figura 5.23: Confronto spettri XRD di HC@Meso-ZnO_15% prima e dopo invecchiamento

5.9 Effetto del tempo e dell'umidità sulla cristallizzazione di HC@Meso-ZnO_15%

Il sistema HC@Meso-ZnO_15% è stato lasciato in un ambiente umido e dopo 30 giorni è stato ritrovato con le goccioline di acqua poste sulla superficie della polvere di campione, come rappresentato nella seguente foto:



Figura 5.24: HC@Meso-ZnO_15% dopo invecchiamento in umido

La prova XRD, effettuata dopo un mese, ha prodotto il seguente spettro:

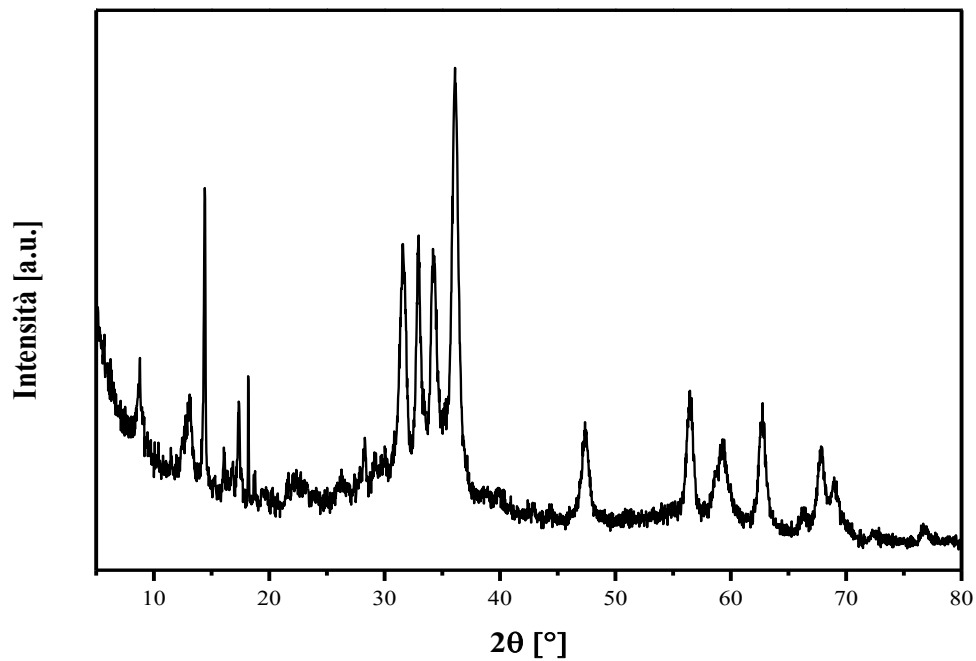


Figura 5.25: Spettro XRD di HC@Meso-ZnO_15%_UMIDO

L'intensità dei picchi relativi all'idrocortisone è più alta rispetto al sistema iniziale, indicando un aumento della cristallinità del principio attivo sulla matrice. L'umidità non favorisce la dispersione amorfa del farmaco ma la formazione di nuovi cristalli.

Dallo spettro emerge un aspetto importante: il sistema è trifasico, infatti, sono presenti dei picchi non legati alle fasi cristalline dell'ossido di zinco e dell'idrocortisone. Per comprendere la natura della nuova fase è stato invecchiato, con lo stesso procedimento, il supporto.

L'analisi diffrattometrica (figura 5.27) dell'ossido di zinco in umido mostra la presenza della nuova fase i cui picchi corrispondono a $2\theta=8.91^\circ, 13.41^\circ, 31.75^\circ, 59.51^\circ$.

Confrontando i valori sperimentali con quelli della letteratura, i dati corrispondono a una specie di idrossido di zinco carbonato, $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2$ [64].

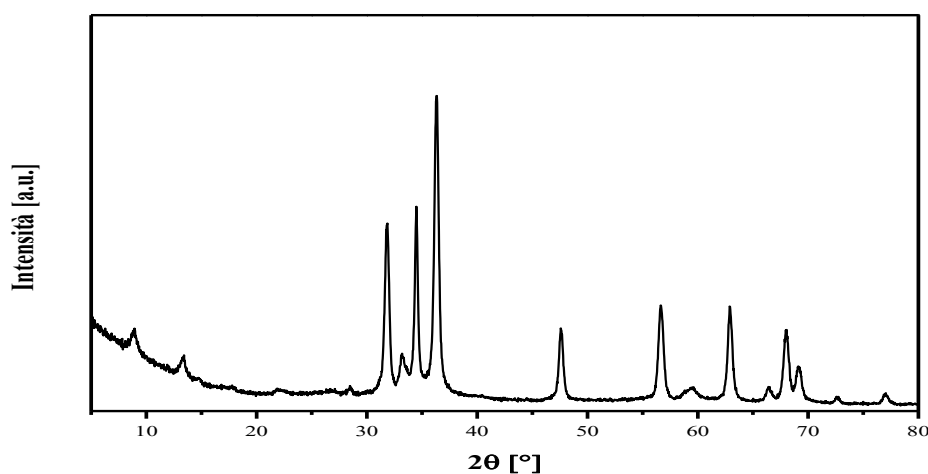


Figura 5.26: Spettro XRD di Meso-ZnO_UMIDO

Dal confronto degli spettri dell'ossido di zinco privo di farmaco e contenente l'idrocortisone, entrambi in umido, si comprende che l'umidità rende instabile il supporto:

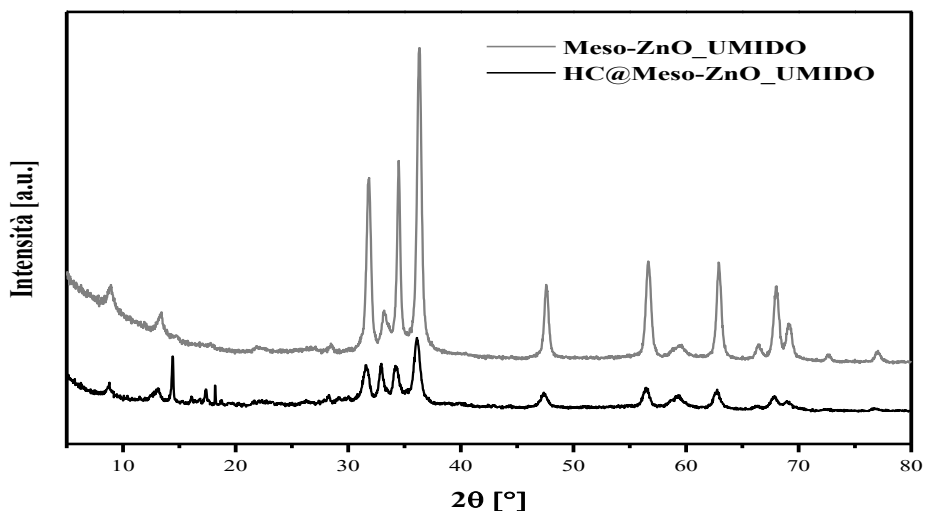
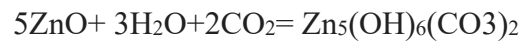


Figura 5.27: Confronto spettro XRD di HC@Meso-ZnO_15%_UMIDO e Meso-ZnO_UMIDO

L'umidità favorisce la formazione della fase cristallina idrozincite $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2$ ottenuta dalla trasformazione dell'ossido di zinco in presenza di acqua e anidride carbonica:



L'idrozincite è usata come precursore dell'ossido di zinco nella sintesi chimica e termica; per decomposizione termica a 154°C , l'idrozincite espelle l'acqua e la CO_2 formando la parte attiva dell'ossido di zinco [65]. La reazione inversa si basa su uno strato di acido carbonico adsorbito ($H_2O + CO_2$) e quindi dipende anche dalle pressioni parziali dell'acqua e dell'anidride carbonica; la trasformazione si verifica rapidamente quanto il rapporto $p_{H_2O}/(p_{H_2O} + p_{CO_2})$ supera il valore di 0.35 causando una modifica delle proprietà dell'ossido di zinco [65].

Capitolo 6

Rilascio di Idrocortisone

In questo capitolo viene descritto il rilascio dell'idrocortisone dal *carrier* e viene confrontato con la curva di rilascio del farmaco puro cristallino per valutare eventuali differenze tra i due sistemi e i vantaggi del sistema di *drug delivery*.

6.1 Retta di taratura

La prima fase della procedura di rilascio consiste nella preparazione della retta di taratura; nella tabella 6.1 e nella figura 6.1 vengono riportati i risultati ottenuti:

Tabella 6.1: Valori di assorbanza in PBS

Concentrazione [ppm]	Assorbanza
19,63	0,813
15,82	0,613
12,80	0,509
9,78	0,369
5,48	0,244
2,03	0,090
0	0

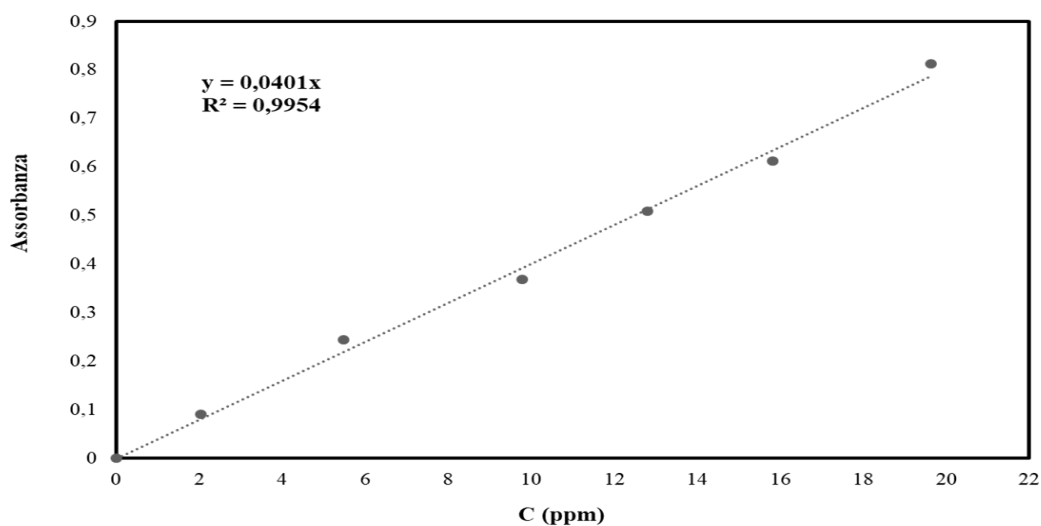


Figura 6.1: Retta di taratura di Idrocortisone in PBS

Il coefficiente di determinazione della retta è circa pari all'unità, il modello scelto approssima bene i dati sperimentali.

6.2 Confronto curve di rilascio di Idrocortisone

La figura 6.2 riporta le due curve di rilascio del farmaco supportato (HC@Meso-ZnO_15%) e dell'idrocortisone cristallino.

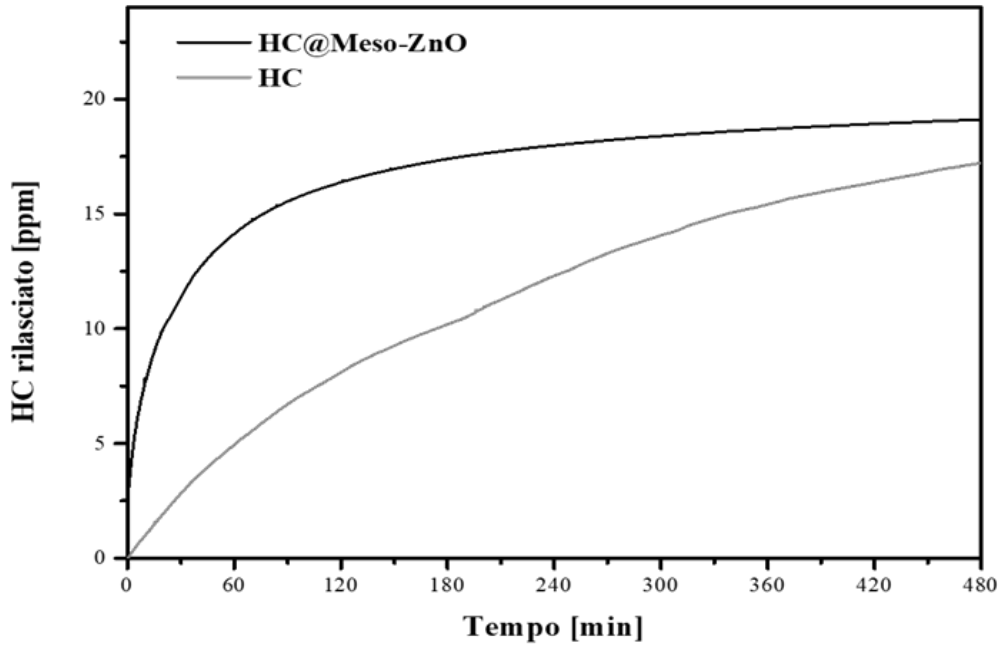


Figura 6.2: Curve di rilascio di HC cristallino e di HC da HC@Meso-ZnO_15%

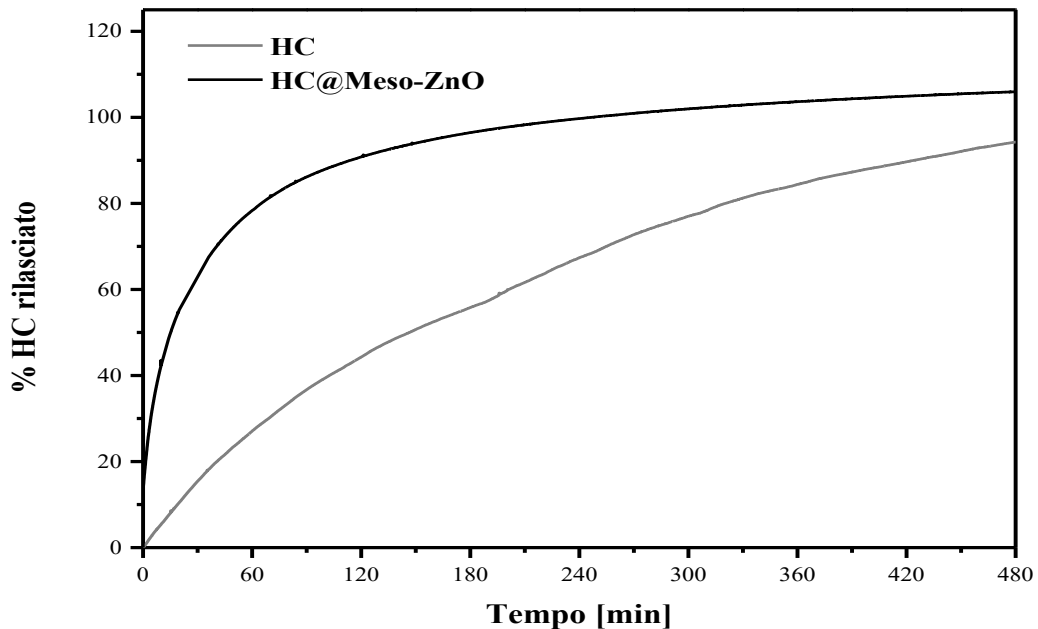


Figura 6.3: Curve di rilascio di HC cristallino e di HC da HC@Meso-ZnO_15%

Si osserva che in 8 ore l'ossido di zinco rilascia tutto il principio attivo, a differenza del farmaco puro che arriva ad una percentuale rilasciata pari a 94%. La cinetica di rilascio del sistema di *drug delivery* è più veloce e dopo tre ore, il supporto espelle il 95% del farmaco.

Il farmaco cristallino sul supporto viene, perciò, rilasciato con una modalità differente rispetto all'idrocortisone puro. La cinetica di rilascio ottenuta sperimentalmente è concorde con i dati riportati in letteratura [66], in cui viene studiato il rilascio del farmaco puro nello stesso solvente, tampone fosfato alcalino.

Il profilo di rilascio è tipico di un farmaco amorfo o finemente disperso. Si deduce che i cristalli dispersi nel supporto di ossido di zinco sono molto fini e si sciolgono più velocemente nel solvente di rilascio. L'ossido di zinco, dunque, rende più biodisponibile il principio attivo diminuendo il tempo di rilascio e mostra i vantaggi dei sistemi di *drug delivery* nonostante l'idrocortisone non sia disperso in forma amorfa.

6.3 Confronto cinetiche di rilascio di HC@Meso-ZnO_15% e di CTZ@Meso-ZnO

È stato confrontato il campione ottenuto in laboratorio con un sistema in cui il farmaco (clotrimazolo) è disperso in forma completamente amorfa nell'ossido di zinco mesoporoso. Il sistema CTZ@Meso-ZnO è stato preparato mediante tecnica di adsorbimento con etanolo e il contenuto di principio attivo è pari a 16% in massa. Nella figura 6.4 è riportata, inoltre, la cinetica di rilascio del clotrimazolo dal sistema ottenuto mediante adsorbimento con scCO_2 .

I sistemi HC@Meso-ZnO_15% e CTZ@Meso-ZnO, preparati con tecniche tradizionali, presentano la medesima quantità caricata e si decide di paragonare le due curve di rilascio per evidenziare le eventuali analogie.

La figura seguente riporta il rilascio del clotrimazolo dall'ossido di zinco [32]:

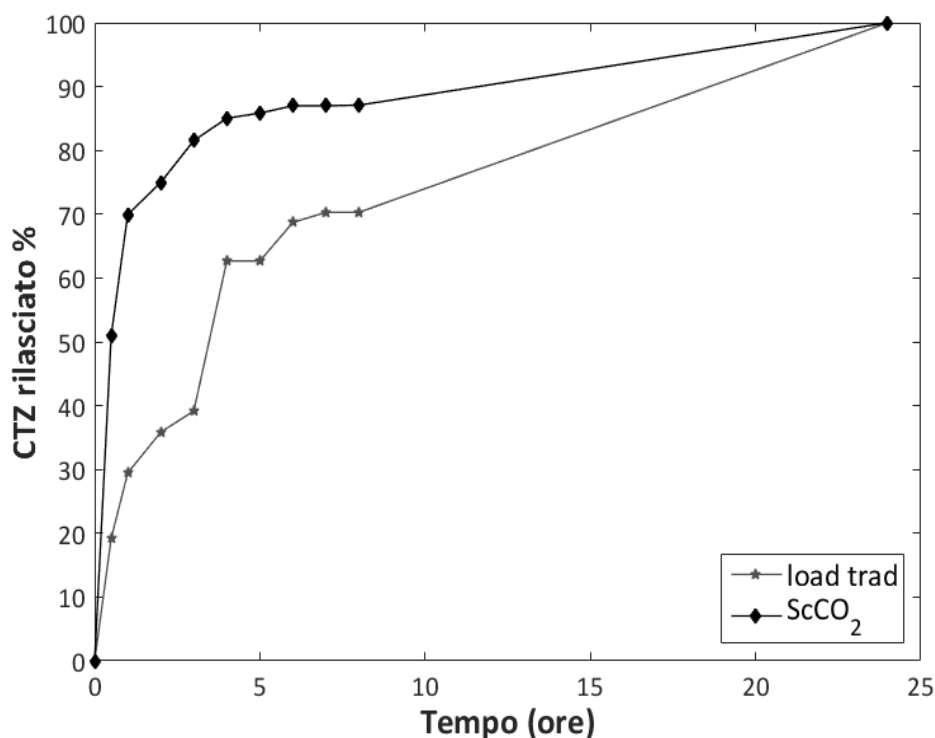


Figura 6.4: Curva di rilascio del clotrimazolo da Meso-ZnO [32]

Si nota un comportamento analogo dell'idrocortisone al clotrimazolo amorfo supportato nello stesso carrier. La curva di rilascio presenta una cinetica più rapida nelle prime ore di somministrazione del farmaco, come nel sistema HC@Meso-ZnO_15%.

Dai confronti si può affermare che l'idrocortisone tende a cristallizzare sull'ossido di zinco mesoporoso rispetto ad altri farmaci, come ibuprofene e clotrimazolo. La fase cristallina che si forma è ben supportata, la matrice inorganica riesce a contenere il farmaco in quantità elevate e paragonabile ai sistemi amorfi. Dalla prova di rilascio, si osserva una cinetica tipica dei sistemi di somministrazione a rilascio controllato e, dunque, differente dall'idrocortisone puro. L'ossido di zinco svolge il ruolo di supporto richiesto dai sistemi di *drug delivery*.

Conclusioni

Negli ultimi anni, l'ossido di zinco è ritenuto un buon candidato per le applicazioni biomediche nei DDs per le sue proprietà di versatilità, biocompatibilità e bassa tossicità. Il nanomateriale è stato caricato con idrocortisone, farmaco poco solubile in acqua.

Nel lavoro di tesi è stato sperimentato, per la prima volta, un nuovo sistema combinando l'azione antibatterica dell'ossido di zinco e la natura antinfiammatoria dell'idrocortisone per la cura delle malattie e infezioni della pelle.

L'ossido di zinco è stato sintetizzato in laboratorio mediante tecnica di precipitazione da soluzione; mostra una struttura wurtzite e un'area superficiale di $75 \text{ m}^2/\text{g}$, il volume dei pori è pari a $0.14 \text{ cm}^3/\text{g}$ e diametro di 8 nm.

Il farmaco è stato adsorbito su ZnO mediante CO_2 supercritica, solvente non tossico rispetto ai solventi di natura organica tradizionale. Dalle analisi FT-IR emerge che l'idrocortisone non è stato efficacemente adsorbito sulla superficie del supporto, essendo poco solubile in anidride carbonica supercritica.

Successivamente, è stata effettuata l'impregnazione del farmaco mediante *Incipient Wetness Impregnation* (IWI) ottenendo un *drug loading* di 15% e 8% in massa nei due sistemi. L'idrocortisone non si disperde in una forma amorfa nel materiale ma tende a formare dei cristalli mostrando una bassa interazione con la superficie del supporto. Dall'analisi BET emergono una riduzione drastica dell'area superficiale e del volume dei pori dell'ossido di zinco e un cambiamento della forma dell'isoterma di adsorbimento ad azoto; questi dati evidenziano un intimo contatto tra la matrice e l'idrocortisone che cristallizza sulla superficie esterna dell'ossido di zinco occludendo i mesopori e non escludendo una fase amorfa del farmaco nel volume poroso.

Dall'invecchiamento del sistema nel tempo, non emergono delle variazioni della cristallinità del principio attivo e il supporto risulta essere stabile non subendo trasformazioni in carbonato di zinco in presenza di CO_2 . L'effetto dell'umidità, durante lo stoccaggio, non favorisce una trasformazione dell'idrocortisone supportato nello stato amorfo, al contrario, aumenta la cristallizzazione. L'ossido di zinco, in ambiente umido, è instabile e, in presenza di acqua e anidride carbonica, si trasforma in una nuova fase, idrozincite.

Nella parte finale del lavoro, sono stati confrontate le cinetiche di rilascio dell'idrocortisone da Meso-ZnO e del farmaco puro cristallino. Si osserva che in otto ore il sistema rilascia tutto l'idrocortisone con un profilo paragonabile ad altri sistemi a rilascio controllato con farmaci amorfi nella matrice. Nello stesso tempo, il principio attivo puro raggiunge il 94% di rilascio in tempi più lenti.

Si può concludere che il farmaco tende a cristallizzare sulla matrice inorganica, i cristalli dispersi sono molto fini e si sciolgono più velocemente nel solvente di rilascio. L'ossido di zinco svolge il ruolo di *drug carrier* nei sistemi di *drug delivery* rendendo l'idrocortisone biodisponibile per le applicazioni topiche.

In futuro si potrebbe cercare di:

- Effettuare un test di rilascio con "Cella di Franz" per simulare il comportamento del farmaco rilasciato attraverso un campione di pelle;
- sviluppare nuovi sistemi di somministrazione a rilascio controllato impregnando in ZnO altri farmaci antinfiammatori o antibiotici per le malattie ed infezioni dermatologiche.

Bibliografia

- [1] W. H. De Jong, P. J. Borm, “Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, pp. 133–49, 2008.
- [2] P. J. P. Espitia, N. de F. F. Soares, J. S. dos R. Coimbra, N. J. de Andrade, R. S. Cruz, and E. A. A. Medeiros, “Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. , pp. 1447–1464, 2012.
- [3] S. A. A. Rizvi and A. M. Saleh, “Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology,” *Saudi Pharm. J.*, vol. 26, pp. 64–70, 2017.
- [4] X. J. Cai and Y. Y. Xu, “Nanomaterials in controlled drug release,” *Cytotechnology*, vol. 63, pp. 319–323, 2011.
- [5] M. S. Roberts, Y. Mohammeda, M. N. Pastore, S. Namjoshi, S. Yousef, A. Alinaghi, I. N Haridass, E. Abda, V. R. Leite-Silva, H.A.E Benson, J. E. Grice, “Topical and cutaneous delivery using nanosystems,” *J. Control. Release*, vol. 247, pp. 86–105, 2017.
- [6] S. Gupta, S. Gupta, N. Jindal, A. Jindal, and R. Bansal, “Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments,” *Indian Dermatol. Online J.*, vol. 4, pp. 267-271, 2013.
- [7] T. W. Prow, J. E. Grice, L. L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E. M. T. Wurm, C. Yoong, T. A. Robertson, H. P. Soyer, M. S. Roberts., “Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, pp. 470–491, 2011.
- [8] X. Liang, Z. Xu, J. Grice, A. Zvyagin, M. Roberts, and X. Liu, “Penetration of Nanoparticles into Human Skin,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, pp. 6353–6366, 2013.
- [9] H. I. Labouta and M. Schneider, “Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: Current status and critical review,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, pp. 39–54, 2013.
- [10] M. Gupta, U. Agrawal, and S. P. Vyas, “Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 9, pp. 783–804, 2012.
- [11] R. Sao, R. Vaish, and N. Sinha, “Multifunctional Drug Delivery Systems Using Inorganic Nanomaterials: A Review,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 15, pp. 1960–1972, 2015.
- [12] F. K. Akomeah, “Topical Dermatological Drug Delivery: Quo Vadis?,” *Curr. Drug Deliv.*, vol. 7, pp. 283–296, 2010.
- [13] G. M. Soliman, “Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges,” *Int. J. Pharm.*, vol. 523, pp. 15–32, 2017.
- [14] C. L. Fang, I. A. Aljuffali, Y. C. Li, and J. Y. Fang, “Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles,” *Ther. Deliv.*, vol. 5, pp. 991–1006, 2014.
- [15] M. A. Bolzinger, S. Briançon, and Y. Chevalier, “Nanoparticles through the skin: Managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals,” *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. , pp. 463–478, 2011.

- [16] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, and S. Garg, "Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances," *Pharmaceutics*, vol. 10, pp. 1–49, 2018.
- [17] L. Palanikumar, S. Ramasamy, G. Hariharan, and C. Balachandran, "Influence of particle size of nano zinc oxide on the controlled delivery of Amoxicillin," *Appl. Nanosci.*, vol. 3, pp. 441–451, 2013.
- [18] A. B. Djurišić, X. Chen, Y. H. Leung, and A. Man Ching Ng, "ZnO nanostructures: Growth, properties and applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, pp. 6526–6535, 2012.
- [19] A. Kolodziejczak-Radzimska and T. Jesionowski, "Zinc oxide—from synthesis to application: A review," *Materials (Basel)*, vol. 7, pp. 2833–2881, 2014.
- [20] A. Naveed, A. Nadhman, I. Ullah, G. Mustafa, M. Yasinzai and I. Khan, "Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles _ The Dilemma of Ecotoxicity" *J. of Nanomaterials*, vol. 2017, 2017.
- [21] A. Król, P. Pomastowski, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, and B. Buszewski, "Corrigendum to 'Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism,'" *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 254, p. 100, 2018.
- [22] D. R. Sahu, C. P. Liu, R. C. Wang, C. L. Kuo, and J. L. Huang, "Growth and application of ZnO nanostructures," *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 10, pp. 814–838, 2013.
- [23] G. Madhumitha, G. Elango, and S. M. Roopan, "Biotechnological aspects of ZnO nanoparticles: overview on synthesis and its applications," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, pp. 571–581, 2016.
- [24] G. Bisht and S. Rayamajhi, "ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent," *Nanobiomedicine*, vol. 3, pp. 3–9, 2016.
- [25] H. Agarwal, S. Venkat Kumar, and S. Rajeshkumar, "A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach," *Resour. Technol.*, 2017.
- [26] D. M. Mirzaeia Hamed, "Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications," *Ceram. Int. J.*, vol. 43, pp. 1–11, 2013.
- [27] J. L. Gomez and O. Tigli, "Zinc oxide nanostructures: From growth to application," *J. Mater. Sci.*, vol. 48, pp. 612–624, 2013.
- [28] 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, pp. 1825–1834, 2017.
- [29] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, H. Hasan, D. mohamad, "Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism," *Nano-Micro Lett.*, vol. 7, pp. 219–242, 2015.
- [30] O. Oprea, E. Andronescu, D. Ficai, A. Ficai, F. Oktar, and M. Yetmez, "ZnO Applications and Challenges," *Curr. Org. Chem.*, vol. 18, pp. 192–203, 2014.
- [31] D. Sharma, J. Rajput, B. S. Kaith, M. Kaur, and S. Sharma, "Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties," *Thin Solid Films*, vol. 519, pp. 1224–1229, 2010.
- [32] "Tesi Sarah Saber Younes Mohamed.", "Ossido di zinco mesoporoso per il rilascio di clotrimazolo", Dicembre 2017.

- [33] J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, and D. G. Wingett, "Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 7, pp. 1063–1077, 2010.
- [34] A. Ebrahimi, M. Saffari, and T. Langrish, "Improving the dissolution rate of hydrophobic drugs through encapsulation in porous lactose as a new biocompatible porous carrier," *Int. J. Pharm.*, vol. 521, pp. 204–213, 2017.
- [35] A. Gignone- Tesi di Dottorato, "Ordered Mesoporous Silica for Drug Delivery in Topical Applications," 2018.
- [36] P. B. Deshpande, G. A. Kumar, G. V. Shari, A. Karthik, M. S. Reedy, and N. Udupa, "Supercritical Fluid Technology: Concepts and Pharmaceutical Applications," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 65, pp. 333–344, 2011.
- [37] K. Byrappa, S. Ohara, and T. Adschiri, "Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology - towards biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, pp. 299–327, 2008.
- [38] P. J. Ginty, M. J. Whitaker, K. M. Shakesheff, and S. M. Howdle, "Drug delivery goes supercritical," *Mater. Today*, vol. 8, pp. 42–48, 2005.
- [39] A. R. C. Duarte, M. S. Costa, A. L. Simplicio, M. M. Cardoso, and C. M. M. Duarte, "Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs," *Int. J. Pharm.*, vol. 308, pp. 168–174, 2006.
- [40] A. A. Barros, J. M. Silva, R. Craveiro, A. Paiva, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, "Green solvents for enhanced impregnation processes in biomedicine," *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 5, pp. 82–87, 2017.
- [41] P. Alessi, I. Kikic, A. Cortesi, A. Fogar, and M. Moneghini, "Polydimethylsiloxanes in supercritical solvent impregnation (SSI) of polymers," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 27, pp. 309–315, 2003.
- [42] C. A. García-gonzález, M. Jin, J. Gerth, C. Alvarez-lorenzo, and I. Smirnova, "Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery," *Carbohydr. Polym.*, vol. 117, pp. 797–806, 2015.
- [43] B. Subramaniam, R. A. Rajewski, and K. Snavely, "Pharmaceutical Processing with Supercritical Carbon Dioxide," vol. 86, pp. 885–890, 1997.
- [44] B. S. Sekhon, "Supercritical fluid technology: An overview of pharmaceutical applications," *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 2, pp. 810–826, 2010.
- [45] 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, pp. 1068–1075, 2007.
- [46] R. Laitinen, K. Lobmann, C. J. Strachan, H. Grohgan, and T. Rades, "Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs," *Int. J. Pharm.*, vol. 453, pp. 65–79, 2013.
- [47] 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.
- [48] N. J. Babu and A. Nangia, "Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals Published as part of the Crystal Growth & Design 10th Anniversary Perspective," *Cryst. Growth Des.*, vol. 11, pp. 2662–2679, 2011.
- [49] "Pubchem idrocortisone." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> .

- [50] "PUBCHEM Cortisone." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> .
- [51] S. Mitra, B. Subia, P. Patra, S. Chandra, N. Debnath, S. Das, R. Banerjee, S. C. Kundu, P. Pramanik and A. Goswami, "Porous ZnO nanorod for targeted delivery of doxorubicin: In vitro and in vivo response for therapeutic applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, pp. 24145–24154, 2012.
- [52] M. Banchemo, L. Manna, S. Ronchetti, P. Campanelli, and A. Ferri, "Supercritical solvent impregnation of piroxicam on PVP at various polymer molecular weights," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 49, pp. 271–278, 2009.
- [53] A. Gignone, L. Manna, S. Ronchetti, M. Banchemo, and B. Onida, "Incorporation of clotrimazole in Ordered Mesoporous Silica by supercritical CO₂," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 200, pp. 291–296, 2014.
- [54] 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.
- [55] R. Ghaderi, P. Artursson, and J. Carlfors, "A new method for preparing biodegradable microparticles and entrapment of hydrocortisone in DL-PLG microparticles using supercritical fluids," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 10, pp. 1–9, 2000.
- [56] M. D. Donohue and G. L. Aranovich, "Classification of Gibbs adsorption isotherms," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 76–77, pp. 137–152, 1998.
- [57] L. Silvestri, M. Pentimalli, F. Padella, "Caratterizzazione di materiali porosi mediante adsorbimento di gas: evoluzione del composito nitrato di boro- grafite ottenuto mediante high energy ball milling", *Enea*, 2013.
- [58] S. Priya, P. Swaminathan, and B. Santhi, "Review on image watermarking attacks," *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, vol. 7, pp. 1385–1392, 2016.
- [59] Socrates G, " Infrared and Raman characteristic group frequencies", *John Wiley and Sons*, vol. 35, 2004.
- [60] Y. Fazli, Z. Shariatnia, I. Kohsari, A. Azadmehr, and S. M. Pourmortazavi, "A novel chitosan-polyethylene oxide nanofibrous mat designed for controlled co-release of hydrocortisone and imipenem/cilastatin drugs," *Int. J. Pharm.*, vol. 513, pp. 636–647, 2016.
- [61] K. I. Takei, R. Takahashi, and T. Noguchi, "Correlation between the hydrogen-bond structures and the C=O stretching frequencies of carboxylic acids as studied by density functional theory calculations: Theoretical basis for interpretation of infrared bands of carboxylic groups in proteins," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 6725–6731, 2008.
- [62] C. M. Lee, S. Lim, G. Y. Kim, D. W. Kim, H. R. Joon, and K. Y. Lee, "Rosin nanoparticles as a drug delivery carrier for the controlled release of hydrocortisone," *Biotechnol. Lett.*, vol. 27, pp. 1487–1490, 2005.
- [63] Tesi Lopez Francesca, " Ossido di zinco mesoporoso come carrier di ibuprofene", Luglio 2018.
- [64] N. Kanari, D. Mishra, I. Gaballah, and B. Dupré, "Thermal decomposition of zinc carbonate hydroxide," *Thermochim. Acta*, vol. 410, pp. 93–100, 2004.
- [65] A. Moezzi, A. M. McDonagh, and M. B. Cortie, "Zinc oxide particles: Synthesis,

- properties and applications,” *Chem. Eng. J.*, vol. 185–186, pp. 1–22, 2012.
- [66] V. P. Shah, J. Elkins, S. Y. Lam, and J. P. Skelly, “Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams,” *Int. J. Pharm.*, vol. 53, pp. 53–59, 1989.

Ringraziamenti

La stesura del lavoro di tesi conclude la fine del mio percorso accademico. Gli anni trascorsi a Torino sono stati colmi di sacrifici e di mancanze ma segnati da gioie, nuove conoscenze e hanno contribuito ad una nuova maturità. Senza aggiungere altre parole, vorrei ringraziare singolarmente tutte le persone che hanno sempre riposto tanta fiducia in me.

Alla mia relatrice, la *Prof.ssa Barbara Onida*, fonte inesauribile di conoscenze, che mi ha seguito in questo lavoro con disponibilità e attenzione facendomi entusiasmare per la tematica trattata. Ai *Professori Mauro Bancho* e *Silvia Ronchetti*, sempre presenti durante il lavoro sperimentale mettendo a disposizione le loro conoscenze.

A *mamma e papà*, che mi hanno sostenuta e supportata in ogni momento nonostante i chilometri di distanza. Grazie per aver compreso i miei stati d'animo ansiosi e altalenanti; grazie per aver trasmesso la forza giusta per continuare questo percorso quando non avevo più voglia. Siete stati, e sarete sempre, la mia forza; vi voglio bene.

A *Ilaria*, sorella e complice, che mi ha sopportata e ha creduto in me fin dall'inizio di questo percorso. Grazie per i tuoi abbracci, i tuoi consigli e i momenti di dolcezza. Grazie per il nostro forte legame.

Ai *miei nonni*, una parte del mio cuore, presenze costanti nella mia vita. Grazie Nonno Matteo e Nonna Netta, per il nostro rapporto speciale, per le chiamate di ogni sera che iniziano con "Hai mangiato?", per il vostro illimitato sostegno e coraggio. Grazie Nonna Pina, per aver sempre creduto in me e per gli abbracci prima di ogni partenza. In questo giorno speciale, siete lontani e sento la vostra mancanza, ma so che siete orgogliosi di me. Grazie alla stella più lucente in cielo.

A *Ale*. Sei entrato velocemente nella mia vita portando felicità e amore. Grazie per la tua dolcezza nascosta dietro i tuoi abbracci, grazie per i tuoi saggi consigli e per esserci sempre, ogni giorno. Grazie perché mi sopporti con pazienza e riesci a tirare fuori la parte migliore di me.

A *Betty e Jessica*, amiche e coinquiline di Casa Barge. Grazie per l'amicizia intensa, consolidata in pochi mesi e per la nostra complicità. Grazie per esservi sempre preoccupate per me. Grazie Betty per esserci stata sempre e anche fisicamente il giorno dell'ultimo esame, grazie per la tua solarità e per i tuoi sorrisi. Grazie Jessica, amica dolce e coraggiosa che si è fidata subito di me condividendo parti delle nostre vite senza riserve; il tuo letto è ancora pronto, quindi, vieni a trovarci presto.

Alle vecchie amicizie, nate da bambina, che non temono distanze e si rafforzano. Grazie per il nostro legame e per tutto quello che abbiamo costruito in questi anni. Grazie per le continue

chiamate per aggiornarci delle rispettive vite e le parole per incoraggiarmi. A *Sophia*, l'amica di una vita, l'amica dai saggi consigli e sempre presente. Ad *Alessia*, simpatica e dolce, che comprende il tuo stato d'animo ascoltandoti o guardandoti negli occhi.

A *Gianna*, amica d'infanzia, amica dai mille impegni che trova il tempo per un caffè al bar o per una chiamata mattutina prima del lavoro. Grazie per il nostro rapporto e per far parte della mia quotidianità nonostante la lontananza fisica.

Alle amiche del gruppo "*Il salotto delle ciofeche*", fantastiche e coraggiose che mi hanno sempre sostenuta e continuano a condividere con me bei momenti. Grazie *Lucia*, la fashion blogger del gruppo, che con la sua simpatia e allegria mi regala sorrisi. Grazie *Ilaria*, miss Ansia con la quale condivido questa caratteristica. Grazie *Laura*, amica forte, che mi accoglie come figlia insieme alla sua dolce metà.

Alle amiche e coinquiline di Casa Aquila. Grazie per gli anni insieme in cui abbiamo condiviso ogni istante della nostra vita, dalle gioie ai sacrifici, alle giornate di studio e alle ricette culinarie. Grazie per il supporto e il vostro bene. Grazie *Fra*, la mia Lopi, amica lontana ma sempre vicina; grazie per le nostre avventure, i nostri brevi viaggi, le confidenze e i momenti indimenticabili. Grazie a *Valeria e Valeria*, per feeling creato tra noi, per il vostro aiuto e la vostra comprensione in ogni momento di difficoltà.

Alla bellissima *città di Torino*, che mi ha accolto in questi anni. Torino è speciale e magica, è capace di migliorare le persone, di rafforzare le vecchie amicizie e far incontrare nuove persone. Non è semplice vivere da sola in nuova città e lontana dagli affetti, ma Torino mi ha fatto crescere superando alcune paure, mi ha reso forte nei momenti più fragili.

Grazie a tutti i presenti che hanno preso aerei e treni per festeggiare con me questo traguardo importante.

