



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA E SCIENZE DELLA SALUTE E DELLA NUTRIZIONE

Dottorato di Ricerca in

Biochimica cellulare ed attività dei farmaci in oncologia

CICLO

XXVII

L'USO DI BIOMATERIALI INNOVATIVI PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI
ANTITUMORALI

Settore Scientifico Disciplinare MED/04 CHIM/03

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Diego Sisci

Tutor:

Ch.mo Prof. Sebastiano Andò

Tutor:

Ch.ma Prof. ssa Maria Luisa Panno

Tutor:

Dott.ssa Adalgisa Tavolaro

Tutor:

Ch.mo Prof. Guglielmo Martino

Dottoranda: Dott./ssa Palmira Tavolaro

indice

Capitolo 1 - I Biomateriali

1.1 Introduzione	1
1.2 Interazione cellula-substrato	9
1.2 Le proprietà fisiche dei substrati	10
1.3 Le proprietà chimiche dei substrati	13

Capitolo 2 - Farmaci antitumorali: Doxorubicina (DOXO) e Bergaptene (5-MOP)

2.1 Generalità sui farmaci antitumorali	18
2.2 Generalità sugli antibiotici antraci clinici	20
2.3 La Doxorubicina (DOXO)	21
2.3.1 Meccanismo d'azione	22
2.3.2 Proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche	24
2.3.3 Effetti collaterali e manifestazioni tossiche	24
2.4 Gli psoraleni o furanocumarine	25
2.4.1 Generalità	25
2.4.2 Proprietà biologiche	26
2.5 Il Bergaptene (5-MOP)	29
2.5.1 Proprietà biologiche	25

Capitolo 3 - Cristalli e membrane Zeolitiche pure ed ibride - Materiali Zeolitici: dai cristalli ai materiali avanzati per applicazioni biomediche.

3.1 Le Zeoliti	32
3.1.1 Definizione e caratteristiche generali	32

<i>3.1.2 Classificazione e struttura</i>	34
<i>3.1.2.1 Cavità e canali</i>	39
<i>3.1.2.2 Dimensioni dei canali e delle cavità nelle Zeoliti</i>	41
<i>3.1.3 Preparazione e caratterizzazioni delle Zeoliti</i>	46
<i>3.1.3.1 Caratterizzazione strutturale delle Zeoliti</i>	48
<i>3.1.4 Applicazioni delle Zeoliti</i>	50
<i>3.1.4.1 Applicazioni di setacci molecolari in processi industriali</i>	52
<i>3.2 Le Membrane Zeolitiche</i>	59
<i>3.2.1. Definizione di Membrana</i>	59
<i>3.2.2 Classificazione delle Membrane Zeolitiche</i>	61
<i>3.2.3. Sintesi delle Membrane Zeolitiche</i>	64
<i>3.2.3.1 Metodi di sintesi</i>	65
<i>3.2.3.2 Fattori che influenzano la sintesi</i>	67
<i>3.2.4 Sostituzione isomorfa nel reticolo cristallino</i>	67
<i>3.2.5 Applicazioni delle Membrane Zeolitiche</i>	68
<i>3.2.5.1 Trasformazioni chimiche nei reattori</i>	69
<i>3.2.5.2 Processi di separazione</i>	69
<i>3.2.5.2.1 Separazioni di gas</i>	69
<i>3.2.5.2.2 Pervaporazione</i>	70
<i>3.2.5.2.3 Applicazioni biomediche</i>	71
<i>3.2.6 Metodi di caratterizzazione delle membrane</i>	73
<i>3.3 Le Membrane polimeriche</i>	74
<i>3.3.1 Generalità</i>	74
<i>3.3.2 Principali tecniche di preparazione delle Membrane polimeriche</i>	76
<i>3.4 L'Acido Polilattico (PLA)</i>	82
<i>3.4.1 Preparazione del PLA</i>	83
<i>3.4.2 Proprietà meccaniche.</i>	84

3.4.3 Proprietà termiche	84
--------------------------	----

Capitolo 4 - Le Metalloproteasi (MMP)

4.1 Classificazione delle MMP	86
4.2 Struttura e attivazione	89
4.3 Attivazione di MMP-2 e MMP-9	90
4.3.1 MMP-2	90
4.3.2 MMP-9	91

Capitolo 5 - Risultati –

Sintesi idrotermale e caratterizzazione chimico-fisica di cristalli zeolitici

5.1 Sintesi di cristalli di Silicalite-1 (Sil-1)	92
5.1.1 Caratterizzazione dei cristalli Sil-1	94
5.2 Sintesi dei nanocristalli di Silicalite-1 (N-Sil-1)	98
5.2.1 Caratterizzazione dei cristalli di N-Sil-1	99
5.3 Sintesi dei cristalli di Boro-Silicalite-1 (B-Sil-1)	100
5.3.1 Caratterizzazione dei cristalli di B-Sil-1	101
5.4 Sintesi dei cristalli di Silicalite-2 (G-Sil-2)	104
5.4.1 Caratterizzazione dei cristalli di G-Sil-2	105
5.5 Sintesi dei cristalli di Sil-2-C	108
5.5.1 Caratterizzazione dei cristalli di Sil-2-C	109
5.6 Sintesi dei cristalli mesoporosi di Silicalite-2 (Sil2C6)	111
5.7 Sintesi dei cristalli mesoporosi di MCM-41	111
5.7.1 Caratterizzazione dei cristalli di MCM-41	112
5.8 Sintesi dei cristalli di Zeolite L (LTL)	116

5.8.1	<i>Caratterizzazione dei cristalli di LTL</i>	116
5.9	<i>Sintesi dei cristalli di Zeolite LA (ZEOA)</i>	119
5.9.1	<i>Caratterizzazione dei cristalli di ZEOA</i>	120
5.10	<i>Sintesi dei cristalli di ZeoL</i>	124
5.10.1	<i>Caratterizzazione dei cristalli di ZeoL</i>	125

Capitolo 6 - Preparazione e caratterizzazione di nuovi scaffolds Zeolitici

6.1	<i>Preparazione di Membrane Zeolitiche Pure</i>	129
6.2	<i>Preparazione di Membrane Zeolitiche Ibride</i>	129
6.2.1	<i>Membrane G-Sil-2</i>	131
6.2.1.1	<i>Caratterizzazione delle Membrane G-Sil-2</i>	131
6.2.2	<i>Membrane MCM-41</i>	137
6.2.2.1	<i>Caratterizzazione delle Membrane MCM41</i>	137
6.2.3	<i>Membrane ZeoL</i>	142
6.2.2.1	<i>Caratterizzazione delle Membrane ZeoL</i>	142
6.2.4	<i>Membrane B-Sil-1</i>	146
6.2.4.1	<i>Caratterizzazione delle Membrane B-Sil-1</i>	146
6.2.5	<i>Membrane LTL</i>	150
6.2.5.1	<i>Caratterizzazione delle Membrane LTL</i>	150
6.2.6	<i>Membrane N-Sil-1</i>	151
6.2.6.1	<i>Caratterizzazione delle Membrana N-Sil-1</i>	151

Capitolo 7– Adesione cellulare delle due linee tumorali MCF-7 e MDA-MB-231 in coltura su Membrane Zeolitiche Pure ed Ibride

7.1.	<i>Introduzione</i>	155
------	---------------------	-----

7.2 Adesione cellulare di due linee di tumore mammario umano MCF-7 e MDA-MB-231 156

7.3 Analisi morfologica di due linee di tumore mammario umano MCF-7 e MDA-MB-231 al FESEM 161

Capitolo 8 – Somministrazione di DOXO e 5-MOP nelle linee MCF-7 e MDA-MB-231 adese su scaffolds Zeolitici Puri ed Ibridi

8.1 Adsorbimento di DOXO 167

8.1.1 Costruzione della retta di taratura per l'analisi spettrofotometrica 169

8.2 Adsorbimento di DOXO su cristalli Zeolitici 170

8.2.1 Analisi spettrofotometrica 171

8.2.2 Prove di adsorbimento di DOXO al variare del tempo di incubazione e della temperatura sui cristalli zeolitici MCM-41 171

8.2.3 Prove di adsorbimento di DOXO al variare del tempo di incubazione e della temperatura sui cristalli zeolitici di 5° 174

8.2.4 Prove di adsorbimento di DOXO al variare del tempo di incubazione e della temperatura sui cristalli zeolitici di SIL-2 176

8.3 Rilasci 178

8.3.1 Analisi spettrofotometrica dei rilasci 178

8.3.2 Risultati del rilascio farmacologico di DOXO da MCM-41 179

<i>8.3.3 Prove di rilascio da 5°</i>	180
<i>8.3.3 Prove di rilascio da Sil-2</i>	181
<i>8.4 Adsorbimento di DOXO su Membrane Zeolitiche</i>	182
<i>8.5 Analisi morfologica delle cellule delle due linee di tumore mammario umano adese su Membrane Zeolitiche Pure ed Ibride trattate con DOXO</i>	187
<i>8.6 Adsorbimento di 5-MOP su Membrane Zeolitiche</i>	191
<i>8.7 Studio morfologico delle cellule MCF-7 e MDA-MB-231 cresciute su Membrane Zeolitiche Pure ed Ibride</i>	193
<i>8.8 Analisi della vitalità cellulare delle due linee MCF-7 e MDA-MB-231 cresciute su membrane Zeolitiche Pure ed Ibride dopo trattamento con farmaci antineoplastici</i>	194
<i>Capitolo 9 – Determinazione delle Metalloproteasi MMP-2 e MMP-9 nei mezzi condizionati di colture di MCF-7 e MDA-MB-231 cresciute su Membrane Zeolitiche Pure ed Ibride</i>	
<i>9.1 Determinazione di MMPs</i>	196
<i>Capitolo 10 – Materiali e Metodi</i>	
<i>Discussione e Conclusioni</i>	220
<i>Riferimenti bibliografici</i>	222

CAPITOLO 1

I BIOMATERIALI

1.1 Introduzione

Biomateriali sono considerati tutti i materiali o le loro combinazioni, (sintetici, naturali e ibridi), progettati per il miglioramento o per la sostituzione di tessuti o parti del corpo umano.

Si può dire che la storia dei biomateriali e quindi la loro utilizzazione in applicazioni biomediche è antichissima, tanto è stato sempre nell'uomo il desiderio e la necessità di sostituire parti del corpo umano difettose, per migliorare la qualità della vita. Così mentre i fenici legavano insieme i denti artificiali a quelli naturali con fili d'oro, in antiche tombe egizie sono state scoperte mummie con protesi di vari metalli principalmente ferro.

Esistono diverse definizioni di biomateriali: nel 1982 il National Institute of Health Consensus Conference, Bethesda, MD, ha definito, in modo generale, i biomateriali con una definizione capace di accettare le sfide in svariati settori medico-chirurgici senza trascurare il punto di vista dello scienziato dei materiali, del chimico inorganico, del biochimico e del bioingegnere. Ai fini di questa conferenza, un *biomateriale* è stata definita come qualsiasi sostanza (diverso da un farmaco) o una combinazione di sostanze, sintetici o di origine naturale, che può essere utilizzato per qualsiasi periodo di tempo, in tutto o in parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo.

Nel 1992 Black ha definito biomateriale "un materiale non vivente usato in un dispositivo medico, progettato per interagire con i sistemi biologici".

I requisiti fondamentali di ogni biomateriale sono: la compatibilità con i tessuti umani e il possedere tutte quelle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche che consentano al materiale di svolgere adeguatamente il compito per cui è stato progettato, come ad esempio costituire un supporto resistente, sostituire tessuti persi, favorire la ricrescita

dei tessuti danneggiati.

Oggi, sempre di più, la ricerca nel campo dei biomateriali è alimentata dalla necessità di trovare nuovi materiali che possano durare a lungo, a causa dell'aumento della vita media della popolazione, dell'aumentata necessità di protesi anche da parte di giovani e della necessità di ridurre il numero di revisioni che gravano sui costi della sanità pubblica. Inoltre i materiali biologici derivanti da trapianti omologhi o eterologhi hanno mostrato importanti problematiche: disponibilità limitata, necessità di un'ulteriore operazione chirurgica, potenziale trasmissione di malattie infettive, minore capacità osteoconduttiva e limitata capacità di incorporarsi nell'osso ospite.

I biomateriali possono essere divisi in tre tipologie principali in base alla risposta che generano nel tessuto ospite: un materiale inerte non provoca una risposta nel tessuto, un materiale bioattivo è integrato dai tessuti circostanti, un materiale degradabile si riassorbe e si incorpora nel tessuto circostante e può anche dissolversi completamente dopo un certo tempo.

A tutt'oggi, i materiali più frequentemente utilizzati nelle applicazioni mediche sono: i metalli, tipicamente inerti e usati per applicazioni sottoposte a carichi, con resistenza a fatica sufficiente a sopportare l'attività giornaliera; le ceramiche, utilizzate per la loro durezza e resistenza allo sforzo in applicazioni come superfici articolari, nei denti e nelle superfici a contatto con l'osso; i polimeri, usati per la loro stabilità e flessibilità, ma anche per la bassa frizione nelle superfici articolari. (Figura 1.1.a).

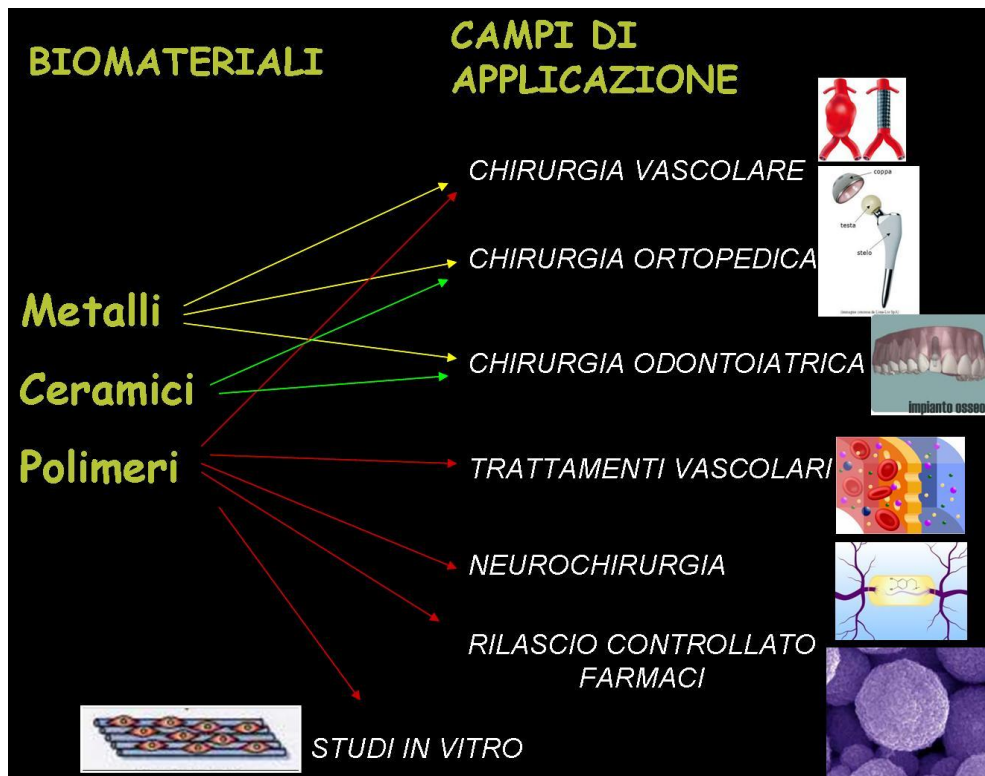


Figura 1.1.a Biomateriali e contesti applicativi.

I metalli possono essere ottenuti da metalli semplici e dalla loro composizione in leghe. Hanno una struttura cristallina, in cui gli atomi si dispongono secondo una struttura geometrica tridimensionale unitaria, detta cella, che si ripete nello spazio. Gli atomi generano tra loro un legame metallico grazie al quale possiedono la caratteristica di essere buoni conduttori di calore ed elettrici, hanno, infatti, una bassa resistività. Per quel che riguarda le leghe, è possibile costruire dei diagrammi di stato che correlano la composizione-temperatura del metallo con il suo stato fisico, che può essere: solido, liquido o in varie composizioni dei due stati, secondo le percentuali dei metalli che le compongono.

Per costruire una lega si parte dal metallo purificato da eventuali sostanze estranee, quindi si miscelano i vari metalli allo stato fuso secondo le proporzioni desiderate. La lega quindi solidifica in varie forme (lingotti o barre), poi con successive colate o con stampaggi a freddo o a caldo si ottengono le forme definitive. In seguito, i biomateriali sono trattati termicamente per raggiungere determinate proprietà meccaniche, da ultimo sono rifiniti in superficie per giungere alla massima biocompatibilità possibile. Questi biomateriali si caratterizzano per la loro duttilità, infatti oltre un certo carico il

biomateriale si deforma anziché rompersi; inoltre hanno un elevato carico di snervamento, in altre parole possono sopportare carichi elevati senza rompersi né deformarsi. Resistono molto bene alla fatica meccanica, dove non importa la frequenza dei cicli di lavoro. Purtroppo venendo a contatto con i liquidi biologici tendono ad usurarsi. Tra i metalli più usati troviamo: il titanio, l'acciaio inossidabile, le leghe di cobalto e il tantalio.

I polimeri sono materiali organici generati da polimerizzazioni controllate di singole molecole dette monomeri. Le reazioni di polimerizzazione possono essere a step (reazioni di condensazione) per ottenere ad esempio poliesteri, oppure reazioni radicali che di addizione per ottenere polistirene o polietilene (Grabb and Smith, 1991).

Gli impianti costituiti da biomateriali polimerici posseggono alcuni vantaggi, alcuni dei quali sono:

- essere facilmente fabbricati in diverse forme (solidi, film, materiali viscoelastici ecc.);
- possibilità di modulazione delle proprietà chimiche, fisiche e meccaniche formando copolimeri o miscele utilizzando differenti monomeri nello stesso polimero;
- rispetto ai metalli non vengono corrosi;
- la densità dei polimeri è simile a quella dei tessuti naturali (1 g/cm³);
- vista la loro somiglianza con i tessuti naturali (ad esempio il collagene) è possibile incorporare altre sostanze (ad esempio l'eparina) per legame diretto.

Gli svantaggi legati al loro utilizzo sono invece:

- il basso modulo elastico, soprattutto per i polimeri degradabili, che limita il loro uso nelle applicazioni dove è richiesta una grande resistenza al carico;
- la natura stessa della polimerizzazione che li rende materiali biodegradabili nel corpo;
- la difficoltà nell'ottenere polimeri utilizzabili come biomateriali senza utilizzare additivi, antiossidanti e plasticizzanti.

I polimeri possono presentare diverse strutture: copolimeri alternati, random, ramificati, a blocchi, possono costituire network interpenetrati, oppure possono costituire miscele compatibili o incompatibili secondo la miscibilità dei polimeri (Figura 1.1.b).

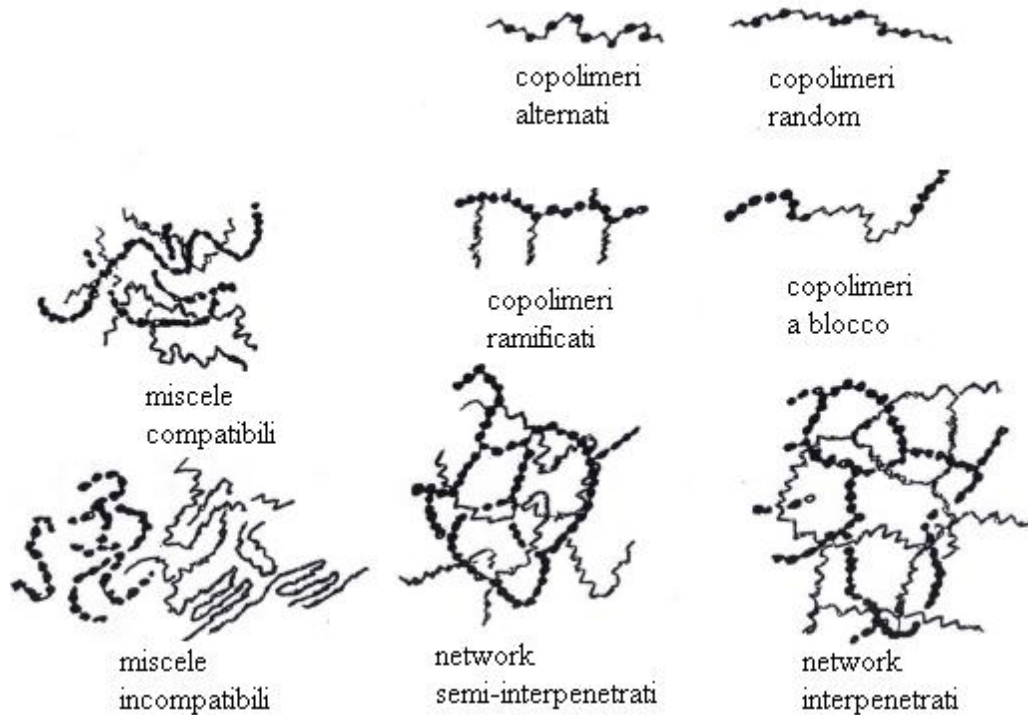


Figura 1.1.b Diverse morfologie in cui possono presentarsi i polimeri.

I polimeri biomedici, a seconda del loro comportamento dopo l'impianto o quando sono in contatto con i fluidi biologici, possono essere classificati in non degradabili o biodegradabili. Tipici polimeri non degradabili sono: polietilene ad elevato peso molecolare, usato in ortopedia; polimetilmetacrilato, polimerizzato *in situ* per i cementi ossei o utilizzato per lenti a contatto; polidimetilsilossano, usato per tessuti molli e lenti intraoculari. In questa tesi saranno trattati esclusivamente polimeri biodegradabili.

Le principali caratteristiche dei polimeri biodegradabili sono:

- avere adeguate proprietà meccaniche, restando sufficientemente resistente fino a quando il tessuto circostante non sia guarito;
- non provocare reazioni infiammatorie o tossiche;
- essere metabolizzati dal corpo dopo aver compiuto il loro compito non lasciando nessuna traccia;
- essere facili da lavorare per ottenere il prodotto finale;
- essere resistenti al tempo di scaffale;
- essere facili da sterilizzare.

I polimeri biorassorbibili sono materiali polimerici, generalmente poliesteri alifatici, che si degradano in ambiente fisiologico attraverso l'idrolisi del legame estereo. Per questa proprietà sono studiati per applicazioni a breve termine che richiedono solo la presenza temporanea dell'impianto polimerico: materiali di sutura, mezzi di fissaggio ortopedici, membrane periodontali, sistemi a rilascio controllato di farmaci. Queste diverse applicazioni richiedono impianti con velocità di biodegradazione diversa, che quindi deve essere programmata e predeterminata sulla base delle specifiche applicazioni cliniche. A questo proposito è importante identificare i fattori che influenzano la velocità di biodegradazione e il suo meccanismo: la diminuzione di peso molecolare, un maggiore grado di disordine strutturale accelerano la degradazione. Inoltre, cambiando la composizione del polimero è possibile modulare le proprietà della degradazione.

Il principale meccanismo di degradazione della maggior parte dei polimeri bioassorbibili è la degradazione idrolitica (Sniadecki N. J., et al. 2006), schematizzata in figura 1.1.c. In particolare, l'acido polilattico viene degradato a glicina e successivamente a piruvato, successivamente entra nel ciclo di Krebs, dando come prodotti finali CO₂, H₂O ed energia.

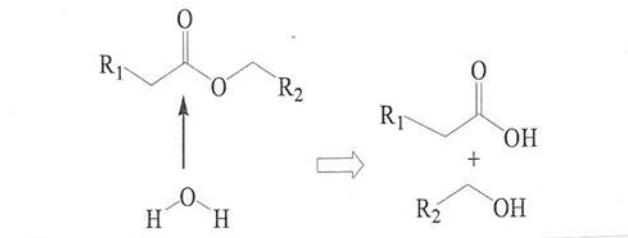


Figura 1.1.c Meccanismo di degradazione dei poliesteri

In base alla struttura del polimero assorbibile, essi possono anche subire degradazione enzimatica, in cui il polimero è degradato o assorbito da alcuni enzimi. La composizione del polimero influenza molto la degradazione enzimatica ed essa avviene sempre in connessione alla degradazione idrolitica.

L'idrolisi dei polimeri sintetici con legami idroliticamente deboli può essere divisa in due categorie: meccanismo di degradazione di bulk e meccanismo di erosione superficiale. Nella degradazione di bulk la velocità di penetrazione dell'acqua è

maggiore della velocità di rottura dei legami, nell'erosione avviene il processo inverso.

I poliesteri usati come supporto sono ad esempio: acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), policaprolattone (PCL) e loro copolimeri. L'acido polilattico possiede uno stereocentro che quindi genera 2 possibili isomeri: un polimero costituito da isomeri L è semi-cristallino, mentre quello D è più amorfo.

I materiali ceramici o materiali compositi sono una combinazione eterogenea, su scala macroscopica, di materiali diversi per composizione, morfologia e proprietà fisiche, sintetizzati per ottenere specifiche proprietà fisiche, chimiche e meccaniche. Il vantaggio dei compositi è quello di mostrare le migliori caratteristiche dei diversi costituenti e talvolta di possederne altre che i singoli componenti non hanno (Salernitano, 2003).

Solitamente consistono di una matrice a cui una è aggiunta fase rinforzante e adeguatamente dispersa. Le fibre possono essere in vetro, carbonio o polimeri a loro volta e possono essere lunghe (compositi a matrice continua) o piccole (discontinui).

I materiali compositi hanno finora trovato applicazione in quasi tutti i campi della medicina rigenerativa (applicazioni cardiovascolari, materiali e protesi dentarie, materiali ortopedici, cementi e articolazioni artificiali).

I compositi biodegradabili devono avere parametri strutturali che possono essere ottimizzati usando matrici appropriate e il giusto grado di rinforzo; l'interfaccia cellule/polimero e la biosintesi cellulare possono essere ottimizzate scegliendo la matrice, le fibre e le particelle appropriate (fattori di crescita, medicinali).

A causa della maggiore complessità dei materiali compositi, solo pochi di essi hanno trovato applicazioni cliniche: i dati clinici sui materiali compositi sono ancora molto scarsi, la progettazione è notevolmente più complessa rispetto ai materiali tradizionali a causa delle maggiori variabili in fase di sintesi, i metodi stessi di sintesi sono spesso costosi e complicati, inoltre non esistono ancora standard di riferimento per le proprietà dei materiali compositi. Poiché però le potenzialità di questa classe di materiali sono molto incoraggianti, la ricerca di nuovi materiali compositi con migliori caratteristiche e maggiore facilità di produzione è particolarmente importante.

In questo lavoro di tesi sono stati studiati materiali compositi di diversa natura: a matrice polimerica con rinforzo ceramico (compositi caprolattone-carbonato apatite) e a matrice continua polimerica di caprolattone con fibre lunghe di acido polilattico.

Storicamente, lo studio dei biomateriali si è concentrato principalmente sulle

caratteristiche meccaniche dei materiali: il progresso nello studio delle altre problematiche relative all'uso di impianti e protesi sintetiche è testimoniato dalle diverse generazioni di impianti. I materiali biomedici di prima generazione erano impianti ad hoc, specificati dai chirurghi utilizzando materiali comuni; i successi ottenuti erano accidentali piuttosto che derivanti dal loro design, ad esempio: capsule d'oro, piatti ossei di acciaio, occhi di vetro. La seconda generazione di impianti è costituita da protesi ingegnerizzate utilizzando materiali comuni sviluppati attraverso collaborazioni tra medici e ingegneri; furono costruiti sulle esperienze degli impianti di prima generazione, utilizzando i progressi nella scienza dei materiali e in altri campi della ricerca. Esempi di questo tipo sono: protesi di anca con superfici sotto sforzo in polietilene UHMW (Ultra High Molecular Weight), impianti dentali e ortopedici in lega di titanio e valvole cardiache.

La terza generazione di materiali biomedici è stata bioingegnerizzata utilizzando tecnologie, materiali e cellule più sofisticati, con ancora pochi esempi sul mercato e molti in fase di sviluppo (Tavolaro A. et al. PCT 2011). Appartengono a questo gruppo gli impianti pensati per far ricrescere piuttosto che rimpiazzare i tessuti tramite l'uso di componenti biologici geneticamente ingegnerizzati.

I biomateriali ceramici sono dei composti contenenti elementi metallici e non metallici. Per fare alcuni esempi citiamo l'allumina (Al_2O_3), l'ossido di magnesio (MgO), e la silice. Sono in genere aggregati policristallini, a volte però sono amorfi o monocristalli. Hanno un'elevata temperatura di fusione, sono ottimi isolanti e cattivi conduttori termici. Risulta impossibile lavorarli plasticamente perché sono molto fragili, inoltre la forza deformante tende a concentrarsi in un unico punto anziché distribuirsi su tutta la superficie; questo indebolisce molto il materiale e rende difficile prevederne l'esatta resistenza.

Sono sinterizzati ossia si ottengono dalla conglobazione di polveri che a temperature elevate si legano per fenomeni di diffusione atomica. Possono essere suddivisi in ceramici bioinerti e bioattivi: i primi sono tali da non essere turbati dal contatto con i fluidi biologici e a loro volta non disturbano gli equilibri esistenti, per questo sono impiegati nella costruzione di valvole cardiache: le proteine che vengono a depositarsi sulla loro superficie, non risultano alterate e pertanto non si attiva la cascata coagulativa; un esempio è dato dal carbonio pirolitico. Sempre dei bioinerti fa parte l'allumina che è utilizzata nei giunti articolari. I materiali ceramici bioattivi sono in

grado di favorire reazioni positive nel tessuto dove sono impiantate. La loro bioattività è intrinseca; citiamo il fosfato di calcio che cristallizza in determinate condizioni come idrossiapatite- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ -. Questa sostanza è in grado di contrarre legami chimici con le sostanze organiche dei tessuti duri, i quali riconoscono tale materiale e lo inglobano. L'altra categoria di ceramiche bioattive è costituita dai biovetri che sono costituiti da precipitati di rame, argento e oro. Sono molto fragili ma si integrano bene nei tessuti duri e il loro impiego principale è costituito dai tendini artificiali.

Così alle caratteristiche che il biomateriale deve possedere, si deve aggiungere anche la capacità di interfacciarsi con l'ambiente biologico e di modulare in modo "specifico" la risposta cellulare. Il biomateriale diventa così, non solo un supporto per la rigenerazione di un tessuto o un veicolo per il trasporto di un farmaco, ma parte attiva nella regolazione delle funzioni cellulari. Nella progettazione di un biomateriale, perciò, bisogna tener conto dei diversi parametri che possono influenzare l'interazione cellula-materiale. Tali parametri rappresentano le caratteristiche del materiale, che possono essere chimiche, quali la natura del materiale e la presenza di segnali biochimici, e fisiche, quali le proprietà meccaniche del materiale, la forma e le dimensioni.

1.2 INTERAZIONE CELLULA-SUBSTRATO

Per andare ad analizzare le interazioni cellula-substrato, è richiesto innanzitutto l'utilizzo di substrati al fine di fornire il microambiente ottimale per la crescita delle cellule seminate; tali substrati sono anche chiamati *scaffolds*. Negli ultimi anni è aumentato l'utilizzo di substrati sintetici, che imitano il sistema fisiologico naturale.

L'analisi dell'interazione cellula-substrato è di fondamentale importanza al fine di progettare scaffolds biomimetici in grado di sostituire gli organi vitali danneggiati, o tessuti, o per assistere ai processi di guarigione naturale del corpo. La capacità di una cellula di riconoscere ed interagire con il substrato rappresenta il primo indispensabile passo, senza il quale processi come proliferazione, migrazione, adesione e differenziamento cellulare non sarebbero possibili. Uno dei requisiti

fondamentali richiesti a un biomateriale è la capacità di promuovere efficientemente l'adesione delle cellule da cui verrà colonizzato. Affinchè tale adesione avvenga ci deve essere una fase precedente in cui la cellula riconosce il substrato. Pertanto la comprensione dei meccanismi che determinano le fasi precoci dell'adesione cellula-materiale, nonché il loro controllo, è indispensabile per la progettazione dei biomateriali. Sia le proprietà meccaniche che biochimiche del materiale determinano l'efficacia e l'avidità con cui le cellule riconoscono il materiale (Nori, 2008).

1.2 LE PROPRIETA' FISICHE DEI SUBSTRATI

Le proprietà fisiche come la cristallinità, la morfologia e la rigidità dei materiali vengono analizzate di seguito in quanto influenzano l'adesione cellulare e conseguentemente il loro comportamento.

Cristallinità del substrato

La cristallinità in un polimero rappresenta uno stato in cui gli atomi, molecole o ioni di cui è costituito hanno una disposizione geometrica regolare, che si ripete indefinitamente nelle tre dimensioni spaziali. A causa delle loro dimensioni e complessità, le molecole polimeriche sono spesso solo parzialmente cristalline, in quanto le regioni cristalline sono disperse nel materiale amorfo. Il grado di cristallinità dipende dalla velocità di raffreddamento durante la solidificazione del polimero, dalla configurazione della catena e dal tempo di raffreddamento. Ad esempio un tempo sufficiente di raffreddamento favorisce un allineamento delle catene. La cristallizzazione è favorita nei polimeri con una struttura chimicamente semplice. I polimeri cristallini sono generalmente più forti e resistenti al calore. La cristallinità oltre a influire sulle proprietà meccaniche come la forza e la resistenza alla fatica del polimero, gioca un ruolo importante nella determinazione delle proprietà fisico-chimiche della superficie, gli stati chimici, la polarità, la rugosità superficiale e la bagnabilità, che influenzano la risposta cellulare.

Controllando la microstruttura amorfo-cristallina dello strato superficiale del substrato si può ad esempio migliorare la compatibilità delle superfici al sangue. Sono state testate superfici con differenti gradi di cristallinità e si è potuto notare un incremento dell'adesività delle piastrine su substrati che presentavano la cristallinità

minore. La particolare microstruttura amorfo-cristallina della superficie modificava anche la denaturazione delle proteine adsorbite. Ad esempio la particolare microstruttura amorfo-cristallina di superfici apolari come il propilene (con cristallinità dello strato superficiale del 55%) ha mostrato di ridurre l'attività piastrinica (Kawamoto, 1997).

Durante la progettazione di scaffolds per l'impianto in vivo, la cristallinità può influenzare anche la biodegradabilità dello scaffold e conseguentemente la risposta cellulare. La regione cristallina infatti risulta più resistente all'infiltrazione dell'acqua e quindi ritarda la degradazione del biomateriale. Ad esempio è stata testata l'adesione, la proliferazione e la morfologia dei condrociti umani della cartilagine articolare in funzione della cristallinità di vari polimeri degradabili. I risultati hanno suggerito che la proliferazione cellulare risulta più lenta su polimeri cristallini rispetto a polimeri amorfi. Questo mette in evidenza l'interessante dinamica tra cellula e substrato in funzione della cristallinità del materiale.

Una variazione nella cristallinità può anche influire sulla rugosità superficiale, su scala nanometrica. Di conseguenza si è analizzata la risposta cellulare a substrati di materiale polimerico con differente cristallinità. Le variazioni nella cristallinità comportavano delle variazioni nella rugosità superficiale su scala nanometrica, di conseguenza anche sul comportamento cellulare, poiché è stato dimostrato che le cellule sono estremamente sensibili a questi cambiamenti. Per questo motivo sono stati generati substrati con differenti gradi di cristallinità e si sono analizzate le superfici risultanti con microscopia a forza atomica. Degli osteoblasti sono stati seminati in seguito sui substrati polimerici e il loro numero è stato misurato utilizzando la microscopia a fluorescenza. I risultati hanno dimostrato che il tasso di proliferazione era maggiore sulle regioni lisce dei substrati, mentre era minore sulle regioni rugose; è stata osservata una variazione monotona decrescente della proliferazione in funzione della rugosità. La rugosità critica sopra la quale si verifica una riduzione significativa del tasso di proliferazione è 1.1 nm. Si è dimostrato quindi che le cellule rispondono direttamente alla topografia del substrato, in quanto sono sensibili a variazioni nanometriche della topografia del substrato.

Morfologia del substrato

La morfologia del substrato può influenzare l'adesione cellulare, influenzando la

capacità del substrato di adsorbire proteine e/o alterando la conformazione delle proteine adsorbite. L'adesione cellulare al substrato è quasi sempre mediata da queste proteine che vengono adsorbite sulla superficie.

Ad esempio la rugosità ha dimostrato di alterare l'adesività delle piastrine alle superfici idrofobe e idrofile. Il sangue normalmente coagula quando viene esposto a superfici differenti da quelle endoteliali biologiche, per questo motivo sono stati effettuati vari tentativi per trovare un materiale sintetico che sia biocompatibile con il sangue. Quando le superfici sono state testate in una cella a flusso laminare si è potuto notare che una rugosità aggiunta della superficie ha portato ad una diminuzione dell'adesione piastrinica su superfici idrofile, mentre un incremento dell'adesione piastrinica si è riscontrata su superfici idrofobe. Questo a dimostrazione che la morfologia influenza le proprietà del materiale e quindi l'interazione che esso ha con le cellule.

Un altro aspetto della morfologia da tenere in considerazione al fine di controllare la risposta cellulare è la topografia superficiale. La topografia, accoppiata con i segnali biochimici e fisici, regola le funzioni cellulari quali la migrazione, l'adesione, la morfogenesi, la differenziazione e l'apoptosi. La topografia non solo consente lo studio sistematico delle interazioni cellula-substrato, ma può anche controllare l'orientamento e la morfologia cellulare, che a sua volta controlla le altre risposte cellulari. Quindi acquisiscono molta importanza le tecniche utilizzate per creare le superfici dei substrati (le tecniche sono di seguito elencate nella successiva tabella). Inoltre è importante anche la risoluzione con cui le tecniche riescono a generare le topografie. Fino ad ora si potevano generare topografie con un livello di risoluzione che arrivava ai micrometri, ma con l'avanzamento delle tecniche di modellazione e della tecnologia, il livello di risoluzione ha raggiunto la scala nanometrica. Questo è importante in quanto la maggior parte delle strutture in vivo si trovano su scala nanometrica (come le fibrille di collagene della membrana basale).

Come è stato detto in precedenza la topografia può indurre cambiamenti nella morfologia cellulare, influenzando quindi le risposte cellulari quali la proliferazione, l'espressione genica e la funzione cellulare. Queste risposte variano anche a seconda del tipo di cellule che vengono utilizzate nella semina. Per esempio la sperimentazione condotta con superfici su cui sono stati prodotti dei canali ha rivelato che molti tipi di cellule tendono ad allinearsi lungo l'asse principale dei

canali stessi e che spesso anche l'organizzazione dei componenti citoscheletrici e dei contatti focali risulta orientata nella medesima direzione. Il grado di allineamento cellulare nella direzione individuata dai canali dipende in modo complesso dalle caratteristiche proprie della struttura topografica della superficie.

Infine, è stato osservato che anche la simmetria e la regolarità della struttura topografica, a parità di altre sue caratteristiche morfologiche e dimensionali, sono proprietà importanti del substrato che influenzano il comportamento cellulare. I risultati hanno mostrato che la topografia regolare riduce l'adesione delle cellule molto marcatamente, mentre delle discontinuità sulla superficie hanno migliorato l'adesione cellulare. Questo dimostra che la topografia del substrato è importante per l'adesione cellulare e quindi per l'interazione cellula-substrato.

Rigidità del substrato

La rigidità di un materiale viene misurata con il modulo di elasticità o modulo di Young. È importante avere una rigidità sufficiente del substrato affinché le cellule ancoraggio-dipendenti possano aderire alla superficie. La rigidità, caratteristica propria del substrato, è fondamentale per la caratterizzazione delle interazioni che modulano le vie di segnalazione intracellulare e gli eventi cellulari, dalla espressione genica alla locomozione cellulare. Il movimento cellulare può essere guidato dalla manipolazione della rigidità dei substrati. E' stato dimostrato come le proprietà meccaniche della matrice influiscono sulla differenziazione delle cellule staminali. Come si può vedere dalla seguente figura al variare della rigidità del substrato variava la proliferazione e la mobilità cellulare. In particolare sono stati creati diversi tipi di substrati con rigidità differenti, che sono poi stati seminati con NSPC2. I risultati hanno dimostrato che la rigidità ottimale per la proliferazione era di 3.5 kPa; mentre la rigidità ottimale per la differenziazione dei neuroni è inferiore a 1 kPa.

1.3 LE PROPRIETA' CHIMICHE DEI SUBSTRATI

Le proprietà chimiche influenzano la caratterizzazione superficiale di un polimero e di conseguenza, il comportamento cellulare. Quando le cellule vengono esposte ad una superficie polimerica, uno strato di proteine vengono adsorbite sulla superficie entro pochi millisecondi. Così le cellule "vedono" lo strato di proteine adsorbite

piuttosto che l'effettiva superficie polimerica. La chimica della superficie di un polimero può essere messa a punto al fine di controllare l'adsorbimento delle proteine, che a sua volta controlla l'adesione cellulare. A seconda del risultato desiderato, le caratteristiche chimiche della superficie di un polimero possono essere modificate per modulare le interazioni delle cellule aderenti al substrato, con conseguente influenza sulla morfologia, migrazione, differenziazione, proliferazione e apoptosi della cellula. L'effetto sul comportamento cellulare inizia nel punto di interazione. Inoltre la conformazione chimica della superficie influenza anche la via di immobilizzazione delle proteine e l'adsorbimento di queste sulla superficie.

Ad esempio, substrati polimerici con maggiore idrofobicità hanno dimostrato di promuovere maggiore osteogenesi in vivo. L'idrofobicità del biomateriale infatti, molto probabilmente, è un criterio di progetto importante per scaffold polimerici che dovrebbero favorire la guarigione di difetti ossei. È stato proposto un confronto tra due materiali cioè: 70:30 (NVP3:BMA4) e la controparte più idrofoba 50:50. I risultati hanno mostrato che il materiale più idrofobo è meno citotossico, più biocompatibile e favoriva la osteoconduzione in vivo. Una possibile spiegazione di questa differenza può risiedere nel fatto che il materiale 50:50 ha un equilibrio più favorevole tra proprietà idrofobe e idrofile. Perciò al materiale 50:50 può essere associato una migliore adesione delle cellule.

Superfici idrofiliche sembrano invece inibire l'adesione dei leucociti e le cellule adese mostrano una diminuzione della risposta della citochina. Ciò provoca una reazione infiammatoria attenuata e una ridotta fusione dei macrofagi. Così le superfici polimeriche idrofiliche possono offrire un approccio per limitare l'adesione dei leucociti e di conseguenza migliorare la biocompatibilità di un impianto. Le modifiche delle caratteristiche chimiche della superficie di un biomateriale consentono di modificare le interazioni del materiale con le cellule senza cambiare le proprietà proprie del materiale. Questo risultato è ottenuto principalmente mediante un rivestimento dello strato superficiale o da un trattamento al plasma.

Nel contesto delle biointerazioni, l'importanza delle proprietà chimiche della superficie polimerica deve essere raggruppata in base alla bagnabilità e alla carica.

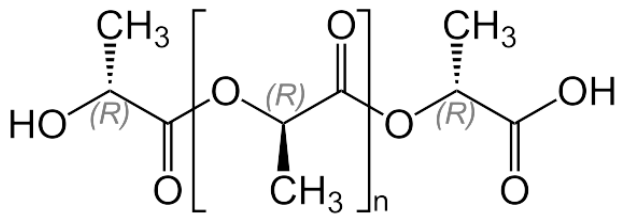
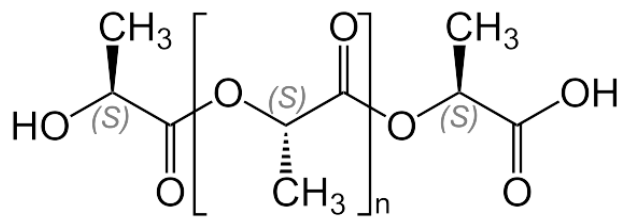
Bagnabilità della superficie

La bagnabilità di una superficie polimerica è una misura della sua idrofobicità e

idrofilicità. Le molecole d'acqua su una superficie polimerica si riorganizzano attorno alle proteine, causando il dispiegamento e l'adsorbimento irreversibile delle proteine native sulla superficie del substrato. Le molecole d'acqua non sono in grado di formare legami a idrogeno con i substrati idrofobici, quindi, formano dei legami a idrogeno tra di loro generando una struttura più ordinata con minore entropia. Le proteine presenti nel siero possono fungere da surfattanti, ovvero possono abbassare la tensione superficiale di un liquido, i domini idrofobici interagiscono col substrato e i domini idrofilici formano legami a idrogeno con le molecole d'acqua, agevolando quindi la bagnabilità delle superfici. Questo comporta un rilascio di molecole d'acqua ordinate il che è energeticamente favorevole a causa dell'aumento di entropia; questo è noto come effetto idrofobico. In generale le proteine vengono preferenzialmente adsorbite su superfici idrofobiche, mediate dai loro domini idrofobici. Le cellule invece di vedere la superficie sottostante, vedono lo strato di proteine adsorbite sulla superficie del substrato, che modulano quindi l'adesione cellulare.

Carica superficiale

La carica superficiale di un polimero influisce sull'adsorbimento e sul dispiegamento delle proteine sulla sua superficie. A differenza della bagnabilità, la forza motrice per il dispiegamento delle proteine su una superficie carica è l'interazione ionica, e non le interazioni idrofobiche. Lo svolgimento delle proteine dipende dalla carica netta che le proteine e le cellule incontrano sulla superficie. Molte proteine hanno una carica netta superficiale negativa, che promuove il loro adsorbimento su una superficie carica positivamente.



Uno scaffold è un componente critico della TE, in quanto destinato a rilasciare, contenere e formare il nuovo tessuto *in vitro* o a promuovere la riparazione del tessuto in vivo. La porosità, l'architettura e la velocità di degradazione sono aspetti importanti del materiale che permettono la crescita delle cellule che guidano la formazione dell'osso.

Uno scaffold ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- biocompatibilità appropriata, non inducendo nessuna reazione avversa nel tessuto ospite;
- velocità di degradazione appropriata in modo da corrispondere al processo di rigenerazione dei tessuti;
- adeguata distribuzione delle dimensioni dei pori per permettere alle cellule sufficiente spazio per crescere, accesso ai nutrienti e ai metaboliti;
- elevata area superficiale per fornire alle cellule sufficiente area per aderire;
- appropriata interazione con le cellule per favorirne la differenziazione e la crescita delle cellule;
- parametri strutturali appropriati per modulare la biosintesi cellulare.

Uno scaffold sintetico ha funzioni essenzialmente osteoconduttive e quindi non rappresenta l'ideale: quest'ultima condizione è realizzata solamente impiegando osso autogeno che infatti fornisce le cellule osteogenetiche e i fattori di crescita

osteoaduttivi propri del paziente, ma può essere utilizzato in un numero limitatissimo di casi a causa dello scarso volume di osso ottenibile e della possibile infezione del sito di prelievo.

Nelle procedure di laboratorio, le cellule vengono seminate sullo scaffold in modo da essere poi trapiantate nel sito necessario. Quando le cellule aumentano di numero iniziano a entrare nei pori interni dello scaffold. Se la porosità e l'interconnessione tra i pori sono buone, le cellule crescono e colonizzano tutto lo scaffold rilasciando la loro matrice extracellulare. Lo strato superiore delle cellule consuma più ossigeno e nutrienti, limitandone quindi la quantità disponibile per le cellule che stanno migrando all'interno dello scaffold; la massima profondità alla quale le cellule riescono a sopravvivere corrisponde alla profondità di penetrazione cellulare.

CAPITOLO 2

FARMACI ANTITUMORALI: DOXORUBICINA (DOXO) E BERGAPTENE (5-MOP)

2.1 Generalità sui farmaci antitumorali.

I farmaci antitumorali, antineoplastici o antiblastici sono sostanze che inibiscono la progressione tumorale. Nel sistema di classificazione anatomico- terapeutico e chimico sono classificati come L01D. Questi farmaci vengono efficacemente utilizzati anche per cercare di diminuire la massa tumorale e di conseguenza migliorare notevolmente le condizioni del paziente; le terapie a base di farmaci possono essere di due categorie: ormonale e citotossica; mentre la prima dà inferiori effetti collaterali ma risulta efficace solo per alcuni tipi di tumore, la seconda, più comunemente conosciuta con il nome di chemioterapia, comporta la necrosi delle cellule tumorali avendo effetti anche sul resto dell'organismo .

La funzione della chemioterapia è quella di bloccare la duplicazione cellulare, interferendo nel fenomeno della mitosi, impedendo così l'originarsi di nuove cellule tumorali e interrompendo di conseguenza la crescita del tumore stesso, portando alla sua eliminazione. Il trattamento chemioterapico prende di mira le cellule con una maggiore frequenza di divisione, risultato dall'alterata funzionalità di un determinato prodotto genico aberrante; essendo però poco selettiva nei confronti del tipo di cellula attaccata, i tessuti che presentano naturalmente un' alta frequenza di turnover cellulare possono divenire bersaglio indesiderato della terapia. Ne sono esempi il midollo osseo, la membrana interna dell'intestino, i follicoli piliferi.

I farmaci utilizzati in terapia sono di genere diverso e seguono meccanismi d'azione a volte totalmente differenti; data la complessità di evoluzione di uno stato canceroso essi sono spesso sfruttati in terapie combinate al fine di bloccare l'evoluzione neoplastica in diversi punti chiave e raggiungere la massima efficacia terapeutica; infatti, ove un determinato farmaco agisce seguendo un meccanismo definito si potrebbero presentare

cellule resistenti al suo effetto, mentre l'adozione di una multiterapia garantisce una miglior efficacia e, talvolta, il limitarsi di sgradevoli effetti collaterali. L'effetto di una associazione di farmaci è in genere superiore (*sinergismo*) alla somma degli effetti dei singoli agenti utilizzati in monoterapia: questo consente di ottenere gli stessi risultati con un dosaggio più basso e conseguentemente con minori effetti tossici per l'organismo. Questo è particolarmente importante per farmaci che hanno un basso indice terapeutico.

La classificazione non è ancora stata uniformata ma si possono distinguere alcune ampie categorie:

- Citotossici generali
 - Citotossici in senso stretto
 - Agenti alchilanti (interazione diretta con il DNA)
 - Agenti antimetaboliti (interazione con la via biosintetica dei precursori del DNA e dell'RNA)
 - Antibiotici antitumorali
- Ormoni e anti-ormoni (terapia endocrina o ormonale)
- Antimitotici

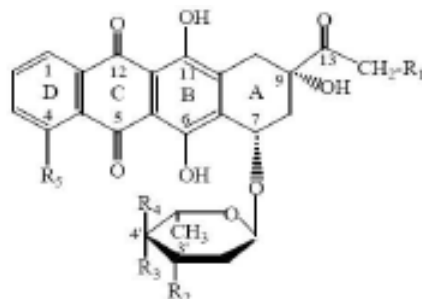
I farmaci citotossici (o citostatici o antiproliferativi) sono una categoria di antineoplastici che agisce interagendo con il DNA, bloccandone la duplicazione, o con i componenti del DNA impedendone la formazione. Possono infatti interferire su enzimi che svolgono attività sintetica di precursori del DNA, sia direttamente come antimetaboliti e antagonisti dei siti recettoriali, sia in modo indiretto bloccando i gruppi prostetici e i siti attivi. Gli alchilanti agiscono direttamente sul DNA di qualsiasi tipo di cellula tumorale senza specificità. Possono intervenire sulle basi del DNA oppure rompendo l'intera molecola di DNA o ancora bloccando la trascrizione o la duplicazione. L'azione principale di un alchilante consiste però nel legarsi all'altezza della posizione N-7 della guanina formando un legame trasversale tra due eliche complementari. Questo legame (detto anche legame a ponte o *cross-link*) porta alla rottura della catena polinucleotidica di DNA che viene quindi danneggiato e non è più in grado di duplicarsi e completare la sintesi proteica. Essendo dei farmaci aspecifici, gli alchilanti vengono solitamente iniettati per endovena in quanto la loro efficacia non dipende dal tempo di esposizione quanto dalla loro concentrazione. Esiste una vasta

gamma di antibiotici naturali che possiedono effetti citotossici tali da poterne razionalizzare il loro uso nella terapia anti-tumorale. La loro azione principale è quella di formare legami covalenti con gli acidi nucleici, interferendo con la sintesi del DNA. Alcuni antibiotici tuttavia agiscono con meccanismi molecolari differenti. Probabilmente, il primo antibiotico antitumorale usato è stato la puromicina. Questo analogo dell'adenina è capace di "ingannare" il sistema dei ribosomi operanti la sintesi proteica cellulare, sostituendosi ad un RNA di trasporto (tRNA) per gli amminoacidi e provocando la terminazione prematura della proteina nascente. Fu però quasi subito abbandonata data l'estrema non-specificità ed alta tossicità sistemica. Dalla metà degli anni '50 venne introdotta nella chemioterapia l'actinomicina D, isolata dallo *Streptomyces griseus* e risultata attiva in alcuni sarcomi, nel coriocarcinoma e nei linfomi. Questo antibiotico possiede una certa specificità nei confronti delle regioni del DNA ricche delle basi guanina e citosina ed impedisce la genesi dell'RNA messaggero dal filamento corrispondente di DNA. Verso gli anni '60 venne scoperta l'Adriamicina (o doxorubicina) da un altro streptomicete. Oggi l'adriamicina è largamente impiegata nella maggioranza dei carcinomi e sarcomi umani, sia come tale che come derivati (Idarubicina, Daunoblastina, ecc.). Ha lo svantaggio di essere molto tossica per il miocardio (tessuto cardiaco): la sua tossicità è molto veloce e può causare per questo anche la morte del paziente. I derivati menzionati sono sensibilmente migliori e hanno una minore cardiotossicità.

2.2 Generalità sugli antibiotici antraciclinici.

Gli antibiotici antraciclinici sono ad oggi una delle classi più importanti di antitumorali. Essi sono di origine naturale e trovano impiego per via della loro caratteristica di agenti intercalanti. Fanno parte di questa classe idarubicina, epirubicina, daunorubicina, doxorubicina. Derivano dal fungo *Streptococcus peucetius* varietà *caesius*. Gli antibiotici antraciclinici hanno una peculiare struttura costituita da anelli tetraciclici legati ad uno zucchero, la daunosamina (Figura 2.2).

Tutti i composti citotossici di questa classe presentano gruppi chinonici e idrochinonici sugli anelli adiacenti che consentono la perdita e l'acquisizione di elettroni (generando coppie redox).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Daunorubicyna (DRB)	H	NH ₂	OH	H	OCH ₃
Idarubicyna (IDA)	H	NH ₂	OH	H	H
Doksorubicyna (DOX)	OH	NH ₂	OH	H	OCH ₃
Epidoksorubicyna (EDOX)	OH	NH ₂	H	OH	OCH ₃

Figura2.2: Formula generale e gruppi sostituenti degli antibiotici antraciclinici

2.3 Doxorubicina (DOXO)

La Doxorubicina fa parte degli antibiotici antraciclinici utilizzati per il trattamento delle neoplasie.

Come è possibile notare in Figura 2.3, la Doxorubicina è costituita da due parti fondamentali: una porzione glucidica costituita dallo zucchero esaatomico denominato daunosamina, ed una parte agliconica a sua volta costituita da uno scheletro carbonioso di quattro anelli condensati, detto tetracene. L'anello A reca sul C-7 il legame con la daunosamina, mentre sul C-9 si trovano un gruppo ossidrilico ed un gruppo idrossiacetile. L'anello B ha una struttura idrochinonica ed è legato all'anello C che ha invece una struttura chinonica. L'anello D reca sul C-4 un gruppo metossile.

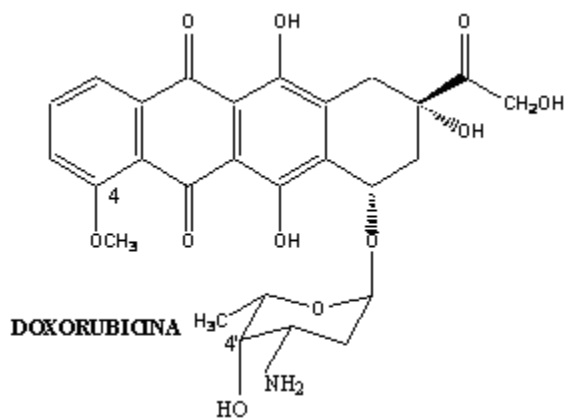


Figura 2.3: Struttura chimica della Doxorubicina.

La daunosamina forma, come accennato in precedenza, un legame O-Glicosidico con il C-7 dell'anello A ed è costituito da una porzione 3-ammino-2,3,6-trideossi-L-fucosidica.

La caratteristica strutturale che differenzia la Doxorubicina dalla Daunorubicina risiede nella catena nel gruppo carbonilico legato sul C-9 del tetracene che nel caso della Doxorubicina presenta una porzione terminale alcolica (gruppo idrossiacetile), mentre per la Daunorubicina è costituito da un semplice gruppo acetile. Questa piccola differenza determina importanti ripercussioni sullo spettro d'azione e sulla potenza relativa dei due antibiotici antraciclinici.

Il gruppo carbonilico in posizione 14 dell'anello antracenicico risulta essere importante sia dal punto di vista farmacodinamico, sia da quello tossicologico. La sua trasformazione metabolica a gruppo alcolico secondario, operata da alcune reductasi citosoliche, riduce in maniera significativa l'attività del farmaco, mentre la formazione di questi derivati alcolici secondari risulta essere alla base della cardiotoxicità cronica che si manifesta in seguito a somministrazioni di dosi cumulative maggiori di 450-600 mg/m².

2.3.1 Meccanismo d'azione.

Diversi e importanti sono gli effetti delle antracicline a livello biochimico che ne determinano l'azione terapeutica e tossica nel contempo. E' stata suggerita una loro azione come agenti intercalanti del DNA, influenzando a tal modo direttamente la

trascrizione e la replicazione, mentre risulta chiara l'importanza della formazione di un complesso a tre, i cui attori risultano essere il farmaco, il DNA e le topoisomerasi di tipo II. Il ruolo svolto dalle topoisomerasi II è di cruciale importanza nella replicazione e nella riparazione dell'acido desossiribonucleico: esse infatti sono degli enzimi ATP-dipendenti in grado di legare il DNA attraverso un ponte fosfodiesterico tra l'OH della tirosina dell'enzima (Tyr805 nella topoisomerasi umana) e di tagliare la doppia catena a livello di un gruppo 3'-fosfato consentendo il passaggio di un frammento di doppia catena attraverso un'apertura transitoria nella sequenza di un'altra e il bilanciamento del DNA superavvolto, per poi richiudere il taglio e ripristinare la continuità dell'elica. La formazione del complesso ternario, nel quale la Doxorubicina si pone tra il sito attivo della topoisomerasi e il sito di cleavage del DNA interagendo con una regione di quattro paia di basi che vanno dalla posizione -2 alla posizione +2 rispetto al sito di taglio, blocca dunque quest'ultimo passaggio, impedendo il ricongiungersi del DNA e portando la cellula verso il processo di morte cellulare noto con il nome di apoptosi.

Le antracicline, inoltre, generano radicali liberi sia in tessuti sani che in tessuti neoplastici in quanto sarebbero in grado di interagire grazie ai loro gruppi chinonici con la Cyt P450 riduttasi in presenza di NADPH. La formazione di radicali intermedi semichinonici e la contemporanea presenza di ossigeno può portare alla genesi di radicali anione superossido e ossidrilici in grado di ossidare le basi stesse del DNA, mentre le antracicline stesse sono libere di reagire con le membrane cellulari alterandone le funzioni e generando così effetti indesiderati o possibili effetti terapeutici.

Dati i siti bersaglio per l'azione di questi antineoplastici si possono osservare i seguenti meccanismi di resistenza, che possono anche essere dovuti a fenomeni di cross-resistance:

- Aumento dell'efflusso del farmaco tramite una pompa specifica;
- Aumento della glutathione reduttasi;
- Diminuzione della topoisomerasi II.

2.3.2 Proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche

La via di somministrazione utilizzata per la terapia con questa classe di farmaci è quella endovenosa con singola infusione rapida in dosi di 50-70 mg/m² ripetuta dopo 21 giorni, vengono eliminate rapidamente dal plasma e la principale via di escrezione è biliare, dopo un complesso sistema di metabolismo epatico. Bisogna essere particolarmente attenti al momento della somministrazione nel prevenire lo stravasamento, in quanto potrebbe verificarsi un'azione vescicante a livello locale accompagnata da necrosi tissutale.

Esistono diverse specialità contenenti Doxorubicina, e alcune presentano sistemi particolari come ad esempio formulazioni liposomiali PEGilate che consentono un rilascio graduale e costante, di fondamentale importanza dato che questo principio attivo ha un basso indice terapeutico.

Tutte le antracicline sono convertite in un alcol intermedio attivo che svolge un ruolo variabile dal punto di vista terapeutico, la Doxorubicina viene infatti convertita a doxorubicinolo. Per la Doxorubicina la curva di eliminazione è multifasica, con emivita di eliminazione di 3 ore e circa 30 ore. Daunorubicina e Doxorubicina sono eliminate per conversione metabolica a formare una serie di agliconi e di altri prodotti inattivi. Per tutti esiste una rapida captazione nel cuore, nei reni, nei polmoni, nel fegato e nella milza, mentre è escluso che possano attraversare la barriera emato-encefalica. L'eliminazione di questi farmaci dipende in gran parte dal fegato e resta spiegata la ridotta e ritardata clearance epatica in pazienti che presentano disfunzioni e insufficienze a livello di tale organo, tanto che in pazienti con alterati livelli sierici di bilirubina è opportuno riconsiderare la dose iniziale del 50%.

2.3.3 Effetti collaterali e manifestazioni tossiche

Le manifestazioni tossiche della Doxorubicina sono molteplici. La principale complicanza che comporta una riduzione della dose è la mielodepressione, con un picco massimo della leucopenia alla seconda settimana e recupero alla quarta; la trombocitopenia e l'anemia seguono un andamento simile ma comunque meno

pronunciato come effetto collaterale. Stomatite, alopecia e disturbi gastrointestinali sono comuni ma reversibili, mentre la cardiomiopatia è un effetto caratteristico dovuto a questo farmaco.

Si possono distinguere due forme di cardiomiopatia:

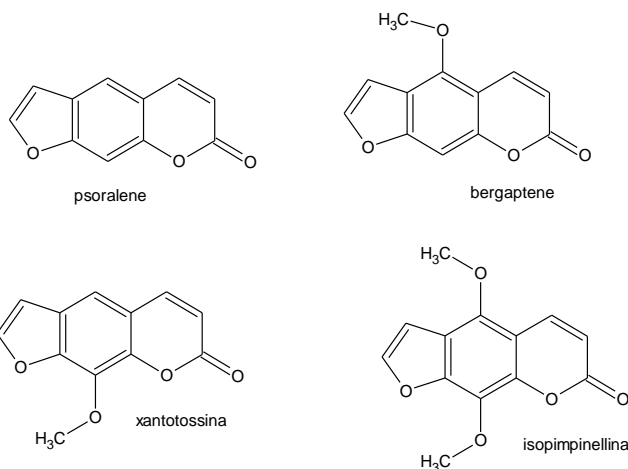
- *Forma acuta* caratterizzata da alterazione dell'elettrocardiogramma, incluse alterazioni del tratto ST-T e aritmie;
- *Forma cronica* dovuta alla dose totale del farmaco. Dosi totali inferiori a 450 mg/m² hanno come frequenza di cardiomiopatia dall' 1% al 10%, mentre con dosi superiori a 550 mg/m² si arriva al 20%.

Le antracicline sono risultate agenti cancerogeni, mutageni, teratogeni e genotossici nei ratti e nell'uomo.

2.4 Gli psoraleni o furanocumarine

2.4.1 Generalità

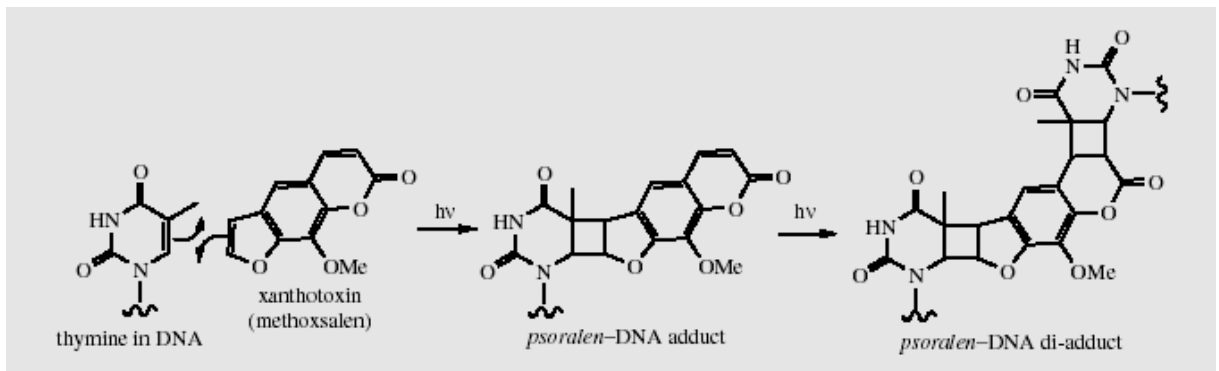
Gli psoraleni sono furanocumarine lineari, molto diffusi in tutte le piante, ma in particolare nelle umbelliferae e nelle rutaceae. Gli esempi più comuni sono lo psoralene, il bergaptene, la xantotossina e l'isopimpinellina.



Le piante contenenti psoraleni sono state impiegate per uso esterno ed interno per

promuovere la pigmentazione della pelle e l'abbronzatura. L'olio di bergamotto, il bergamotto è una rutacea, può contenere fino al 5% di bergaptene ed è usato nella preparazione di abbronzanti per uso esterno. Lo psoralene grazie al suo esteso cromoforo assorbe nel vicino UV e fa sì che questa radiazione stimoli la produzione di pigmenti melaninici. La xantotossina (o metossalene) viene utilizzato per via orale insieme a trattamenti UV nel caso di vitiligine (trattamento PUVA cioè psoralene +UV-A).

A causa della loro struttura planare gli psoraleni si intercalano facilmente nel DNA e questo permette una reazione di cicloaddizione promossa dalla radiazione UV tra le basi pirimidiniche dal DNA e l'anello furanico degli psoraleni. La reazione con gli psoraleni inibisce la duplicazione del DNA e riduce la velocità di divisione cellulare.



Le furanocumarine sono molto interessanti per la loro attività fotobiologica e fototerapeutica. (Diawara MM. et al. 1997). L'attività fotoindotta caratteristica delle molecole psoraleniche è oggi utilizzata per la cura di patologie dell'epidermide in combinazione a luce UVA. Questo tipo di terapia viene chiamata appunto PUVA (psoralen plus UVA). Il trattamento consiste nella somministrazione orale di 8-metossipsoralene (8-MOP) seguito da esposizione della pelle del paziente a luce UVA. Questa cura viene usata per il trattamento della psoriasi, e per altre patologie dell'epidermide come la vitiligine.

2.4.2 Proprietà biologiche

I principali rappresentanti della famiglia degli psoraleni sono il 5-metossipsoralene (5-MOP o Bergaptene), l'8-metossipsoralene (8-MOP) ed il 4, 5, 8-trimetilpsoralene

(TMP). Gli psoraleni sono utilizzati nella terapia fotodinamica; infatti, la fotoattivazione del 5-MOP, attraverso l'azione dei raggi UVA (320-400nm), può indurre reazioni di fotosensibilizzazione.

□ Reazione di fotosensibilizzazione di tipo II: lo psoralene, eccitato da fotoni UVA reagisce con l'ossigeno molecolare, producendo forme di ossigeno reattive, come l'anione superossido o il radicale idrossile, che possono causare lesioni, sia a livello del DNA che della membrana plasmatica.

□ Reazione di fotosensibilizzazione di tipo III: in cui il processo si attua attraverso la fotosensibilizzazione di un atomo di idrogeno o attraverso un processo di trasferimento dell'elettrodo. Il risultato è una ciclo addizione in C4, una coniugazione con le proteine ed una cicloaddizione alle basi pirimidiniche.

In linea generale, gli psoraleni hanno due siti fotoreattivi: doppi legami 3,4 e 4',5'. Le interazioni con il DNA nucleare sono biologicamente molto rilevanti. Ciò determina una mancata interazione tra il DNA, la transcriptasi e la polimerasi, non permettendo, quindi, la replicazione cellulare (Rocha MS. et al. 2004).

Questo meccanismo consiste di 3 principali steps:

- intercalazione tra le basi nucleotidiche del DNA
- assorbimento di un fotone UVA e formazione di un legame covalente tra il doppio legame dell'anello furano e la base timina (T2) della molecola del DNA,
- assorbimento di un secondo fotone UVA e formazione di un legame covalente tra il doppio legame dell'anello lattone ed un'altra base timina (T1); da ciò alla fine si otterrà un cross-linked tra psoralene e DNA (Spielmann H.P et al. 1995) (Figura 1).

Nello specifico, il primo doppio legame che viene attivato è quello al 3,4-pirone e così, si forma un monoaddotto con un filamento di DNA, che presenta una configurazione cis-syn, come è stato recentemente confermato da diffrazione a raggi X5. Nel caso degli psoraleni lineari come il 5-MOP e l'8-MOP, grazie alla loro geometria, è possibile la formazione di due legami con i filamenti di DNA. I due siti fotoreattivi sono i doppi legami posti al 3,4-pirone e 4',5'-furano, i quali, dopo aver assorbito fotoni dai raggi UVA, possono reagire con le basi pirimidiniche. Dopo che è stato assorbito un fotone dallo psoralene, infatti, si forma un legame covalente tra il doppio legame al 3,4-pirone e il doppio legame della pirimidina. Nel caso degli psoraleni lineari come il 5-MOP, dopo l'assorbimento di un nuovo fotone anche il doppio legame nell'anello furanico può formare un legame covalente con un residuo di pirimidina del filamento di DNA

opposto. In questo caso si forma un cross link (fig.6). La situazione cambia invece, per gli psoraleni angolari; quali ad esempio l'angelicina, che infatti, forma solo un legame con un filamento di DNA, perché stericamente il doppio legame al 4',5'-furano non è vicino ai residui pirimidinici del filamento opposto come mostrato in fig.6. (Vos JM, Hanawalt PC: Processing of psoralen adducts in an active human gene: Repair and replication of DNA containing monoadducts and interstrand cross-links. Cell 50:789–799, 1987)

Queste reazioni possono interessare sia il DNA cellulare che quello mitocondriale, ma possono interessare altre strutture biologiche, quali ad esempio, i fosfolipidi di membrana. Dopo il trattamento con raggi UVA gli psoraleni possono determinare per via diretta (reazioni con proteine di membrana o citoplasmatiche, ciclo-addizioni ad acidi grassi insaturi) o indiretta (generazione radicali liberi o derivati tossici dell'ossigeno:

- Modificazioni di membrana a carico di cellule funzionalmente importanti come le cellule di Langerhans, i linfociti e gli stessi cheratinociti con conseguente inattivazione funzionale;
- Modificazioni nell'espressione di recettori per CK e chemochine;
- Incapacità di produrre molecole di adesione, mediatori, fattori di crescita, citochine.

La terapia PUVA (psoraleni +UVA) è stata utilizzata nel trattamento della psoriasi, una malattia cronica, caratterizzata dalla presenza di placche rilevate, arrossate, coperte da squame e margini tra la placca e la cute normale, nonché è risultata efficace in molti altri casi di dermatosi, come ad esempio, la vitiligine, caratterizzata dalla perdita locale o diffusa dei melanociti (McNeely W. Et al. 1998).

È verosimile, che tutti i principali meccanismi di azione della PUVA (effetto antiproliferativo, antinfiammatorio ed immunosoppressivo) agiscono sinergicamente. La fotochemioterapia è efficace nel 70-80% dei casi, ma è in grado di indurre anche molteplici effetti collaterali che possono essere evitati o ridotti osservando scrupolosi criteri e dosando in maniera accurata l'intensità delle radiazioni UVA. (

2.5 Il bergaptene (5-MOP)

2.5.1 Proprietà biologiche

Il bergaptene (5-metossipsoralene) è una sostanza che si trova principalmente nell'olio essenziale di bergamotto e in molti altri oli essenziali agrumari. (HPLC profile of citrus essential oils from different species and geographic origin; Calvarano I., Calvarano M., Gionfriddo F., Bovalo F., Postorino E.; *Essenze Derivati Agrumari* 65, 488-502 (1995)). Il bergamotto è un agrume classificato come *Citrus bergamia* Risso, appartenente alla famiglia delle Rutacee, genere *Citrus*, che cresce in modo pressoché esclusivo lungo la costa più a sud della Calabria in provincia di Reggio Calabria. Per spremitura a freddo dell'epicarpo e parte del mesocarpo del frutto fresco si ottiene l'olio essenziale di bergamotto che, com'è noto, viene ampiamente utilizzato in cosmetica, così come nell'industria alimentare ed in quella farmaceutica. L'olio essenziale di bergamotto è costituito da una frazione volatile (93-96% del totale) contenente idrocarburi mono e sesquiterpenici ed i loro derivati ossigenati, quali alcoli, aldeidi, esteri, ossidi, ed una frazione non volatile (4-7% del totale) contenente cumarine e furanocumarine, quali bergamottina, 5-geranossi-7-metossicumarina, ciproptene, bergaptene (5-metossipsoralene) (Di Giacomo A. & Mincione B. (1993) In "Olio Essenziale di Bergamotto, *Citrus Bergamia* Risso" Laruffa Editore, pp. 1-30) Fin dal secolo scorso l'olio essenziale di bergamotto ha trovato impiego nella medicina popolare principalmente come cicatrizzante ed antisettico disinfettante ad uso topico (Consorzio del Bergamotto di Reggio Calabria, www.bergamottoconsorzio.it). La letteratura scientifica relativa alle proprietà biologiche dell'olio essenziale di bergamotto è estremamente limitata. Al contrario, molto è noto circa alcuni costituenti della frazione non volatile dell'olio essenziale, quali gli psoraleni. Tali composti, per la loro capacità di ridurre la proliferazione dei cheratinociti per formazione di addotti al DNA, vengono impiegati nella PUVA-terapia per la cura della psoriasi; tuttavia, essi sono responsabili della fototossicità del fitocomplesso non defurocumarinizzato per la loro capacità di trasferire energia all'ossigeno molecolare e dare origine a specie reattive dell'ossigeno (ROS)

In aggiunta al bergamotto, importante fonte naturale di bergaptene è *Ficus carica* L, una delle piante più diffuse in Cina e tradizionalmente utilizzata, date le proprietà medicamentose, nel trattamento delle emorroidi e degli attacchi di cuore (Yin et al. 1997 and 1998). Essa, inoltre sembra avere effetti anti-ipertensivi e anti-tumorali. Analisi HPLC di estratti grezzi di *Ficus carica* L, hanno evidenziato la presenza di due componenti in elevate quantità relative: lo psoralene (con il 69,3% di purezza) ed il bergaptene (al 30,7% di purezza). L'estrazione del bergaptene dalle foglie di tali piante, necessita dunque di un metodo che ne permetta, al contempo la separazione e la purificazione dal restante psoralene. Le tecniche storicamente usate in tal senso si dimostrano particolarmente lunghe e complesse, data la necessità di passaggi cromatografici multipli su colonna di silica gel. Per tale ragione, è stata di recente messa a punto una metodica alternativa, la tecnica HSCCC (High-speed countercurrent chromatography). A mezzo di tale tecnica si ottengono, mediamente, a partire da 4,4 mg di foglie di *Ficus carica*, 2,1 mg di bergaptene, puro al 98,2% (Figura 2.5.1).

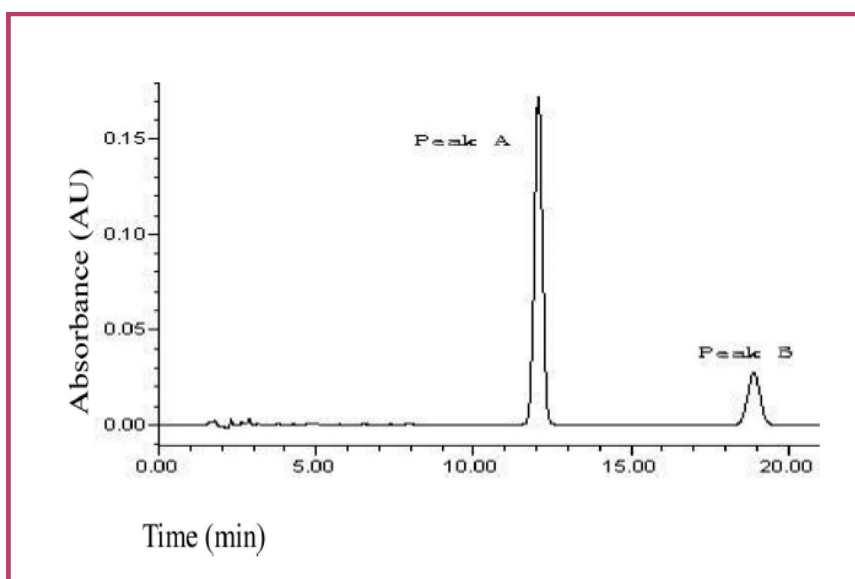


Fig.2.5.1: Cromatogramma ottenuto a seguito di analisi HPLC di estratto grezzo di *Ficus carica* L. il picco A rappresenta lo psoralene, mentre il picco B il bergaptene.

Oltre ad agire come molecola fotoattivata, il bergaptene di per sé è in grado di arrestare la crescita cellulare, soprattutto di cellule di tumore mammario, e di innescare risposte apoptotiche. In effetti, lo psoralene induce una “up-regulation” di alcune proteine

implicate nell'arresto proliferativo, contrastando in modo efficace i segnali di sopravvivenza cellulare (Panno ML et al. 2010).

CAPITOLO 3

CRISTALLI E MEMBRANE ZEOLITICHE

PURE ED IBRIDE

MATERIALI ZEOLITICI: DA CRISTALLI A MATERIALI AVANZATI PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE

3.1 Le Zeoliti

3.1.1 Definizione e caratteristiche generali

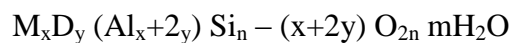
La parola zeolite, dal greco “ζεῖν”, "bollire" e “λίθος” "pietra" fu coniata nel 1756 dal mineralogista svedese Axel Fredrik Cronstedt alludendo al comportamento di questi solidi, che, se sottoposti a riscaldamento, sembrano bollire per la veloce perdita dell'acqua che contengono intrappolata nelle cavità, liberando vapore acqueo. Le zeoliti sono appunto minerali di natura cristallina che possono essere sia naturali sia ottenuti mediante processi di sintesi. La loro composizione può essere schematizzata e identificata come una struttura di allumino-silicati cristallini idratati in presenza di elementi del primo e del secondo gruppo, in particolare Litio, Sodio, Calcio e Stronzio. La distribuzione che gli atomi di Silicio e Alluminio, uniti da ponti con l'Ossigeno, assumono nello spazio determina la presenza di una struttura regolare e ripetuta contraddistinta da pori e canali, da cavità regolari e gabbie. I mattoni costituenti le zeoliti sono unità tetraedriche $[\text{SiO}_4]^{4-}$ e $[\text{AlO}_4]^{5-}$ legate insieme dalla condivisione di un vertice per ogni coppia di tetraedri, a formare dei ponti di ossigeno non-lineari.

Mentre i tetraedri TO_4 nelle strutture zeolitiche sono in genere regolari, i valori degli angoli T-O-T sono distribuiti in un range tra circa 125°C e 180°C. I tetraedri si possono quindi combinare a dare una varietà di strutture. I tetraedri SiO_4 sono elettricamente neutri quando legati tra loro in un reticolo tridimensionale come il quarzo. La sostituzione di Si(IV) con Al(III) nella struttura provoca uno squilibrio di carica e, per

conservare la elettroneutralità, ogni tetraedro AlO_4 deve essere controbilanciato da una carica positiva. La carica proviene da cationi legati in modo elettrostatico alla zeolite. La presenza di cationi del primo e del secondo gruppo negli spazi e nei canali della struttura microporosa è legata all'effetto controione, in quanto bilanciano la formale carica negativa derivante dalla sostituzione del silicio con l'alluminio nel sito tetraedrico.

Il rapporto Ossigeno/(Si + Al) è sempre 2, considerando la struttura. Il legame tra ossigeno e silicio risulta essere più forte rispetto al legame ossigeno-alluminio. Ciò implica che la stabilità termica e chimica aumenta all'aumentare del rapporto Si/Al, in quanto ciò indica una maggiore presenza del silicio nella struttura cristallina della zeolite.

Si può esprimere la composizione chimica di una singola cella zeolitica utilizzando la seguente equazione:



dove:

- “n” rappresenta il numero di tetraedri nella cella unitaria
- $(Al_x + 2y) Si_n - (x + 2y) O_{2n}$ rappresenta l'intelaiatura del reticolo cristallino
- “m” rappresenta l'acqua di costituzione

Le zeoliti naturali si ritrovano in zone di natura vulcanica, evidenza del fatto che per la loro formazione sono necessarie condizioni particolari di pressione e temperatura come vedremo in seguito. L'importanza delle zeoliti naturali sia da un punto di vista geologico che applicativo, messa in ombra per molti anni dallo sviluppo delle ricerche sulle zeoliti sintetiche e loro applicazioni, è stata gradualmente rivalutata a partire dagli anni 50 in seguito al loro ritrovamento come costituenti fondamentali di diversi tipi di rocce. Dopo i lavori pionieristici e per molto tempo ignorati che segnalavano zeoliti nei fondi marini (Murray & Renard, 1891) e in formazioni tufacee (Johannsen, 1914), il crescente utilizzo dei raggi X ha permesso la segnalazione di più di 1000 ritrovamenti di rocce piroclastiche (tufi, tufiti, ignimbriti) a predominante composizione zeolitica. Tali zeoliti, in cristalli submicroscopici uniformemente distribuiti nella roccia di cui costituiscono parte fondamentale, note con il termine improprio di “zeoliti sedimentarie”, hanno destato immediato interesse scientifico per le problematiche connesse alla ricostruzione delle condizioni chimico-fisiche (temperatura, pressione, ambiente geochimico) della loro genesi e applicativo per l'enorme loro disponibilità in

sostituzione delle più costose zeoliti sintetiche in alcuni consolidati processi industriali (separazione ossigeno-azoto, essiccazione e purificazione di gas naturali) ed in settori (agricoltura, trattamento acque, alimentazione animale ecc.) che richiedono grandi quantità di materiale non necessariamente ad elevato grado di purezza ma a limitati costi commerciali.

3.1.2 Classificazione e struttura

Le zeoliti si distinguono per avere strutture aperte, in grado di poter assorbire reversibilmente molecole d'acqua o molecole più grandi, e che contengono grandi cationi non legati al network che possono essere facilmente scambiati. Nel precedente paragrafo si identificano come costituenti base della struttura zeolitica le unità tetraedriche $[\text{SiO}_4]^{4-}$ e $[\text{AlO}_4]^{5-}$ legate insieme dalla condivisione di un vertice per ogni coppia di tetraedri. Un'unità di base composta da due tetraedri uniti tra loro, è mostrata in Figura 3.1.2a.

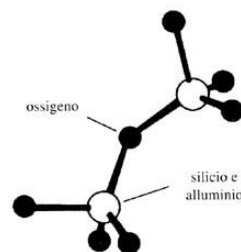


Figura 3.1.2.a Rappresentazione dell'unione tra due tetraedri

I tetraedri si possono combinare a dare una varietà di strutture in base al valore che assume l'angolo avente come vertice l'Ossigeno a ponte tra i due atomi tetraedrici. I tetraedri TO_4 formano anelli: unità molto comuni nelle zeoliti sono cicli a 4, a 5 e a 6 membri. Le configurazioni che può adottare un anello a 4 membri illustrano la flessibilità dei tetraedri come *building blocks* strutturali (Figura 3.1.2.b).

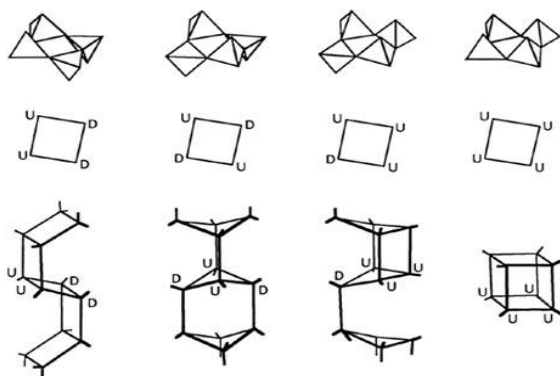


Figura 3.1.2.b Possibili configurazioni di anelli a 4 membri.

Gli apici dei quattro tetraedri TO_4 possono puntare in su (U, up) o in giù (D, down), generando tipi diversi di catene. Nelle strutture zeolitiche si osserva la presenza di tutti questi modi di connessione.

In genere i tetraedri uniti in questo modo sono rappresentati disegnando solo le linee congiungenti i centri di tetraedri adiacenti (Si-Si, Si-Al etc.). In questo modo la rappresentazione della struttura si semplifica, ma va sempre ricordato che i legami Al-O-Si etc. non sono lineari (Figura 3.1.2.c).

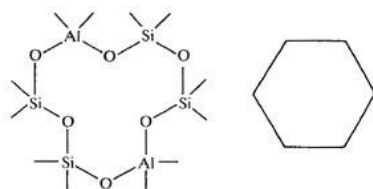


Figura 3.1.2.c Rappresentazione schematica dei tetraedri.

La struttura di molte zeoliti è basata sull'unità di 24 tetraedri di Si o Al uniti insieme, l'*unità sodalitica* (o gabbia β), illustrata in Figura 3.1.2.d.

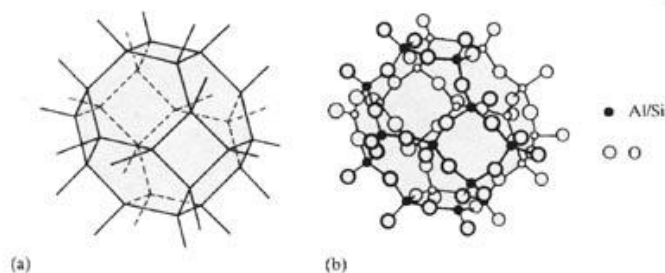


Figura 3.1.2.d Rappresentazione dell'unità sodalitica.

Si possono riconoscere anelli a sei e a quattro tetraedri uniti tra loro a formare un ottaedro troncato. Questa è l'unità base della sodalite. Molte delle zeoliti più comuni sono basate sull'unità sodalitica. Si noti che nella sodalite la 'cavità interna' definita dalle otto unità sodalitiche è anch'essa una unità sodalitica. Come sappiamo, infatti, l'ottaedro troncato è uno dei poliedri che riempiono completamente lo spazio. La struttura risultante è altamente simmetrica e contiene canali che viaggiano paralleli ai tre assi del sistema cubico.

La struttura sodalitica può fungere a sua volta da "monomero", in quanto più sodaliti possono (e sono) connesse tra loro, generando una struttura più complessa con reticoli e cavità connesse tra loro. Nella Figura 3.1.2.e sono mostrati esempi di quanto affermato.

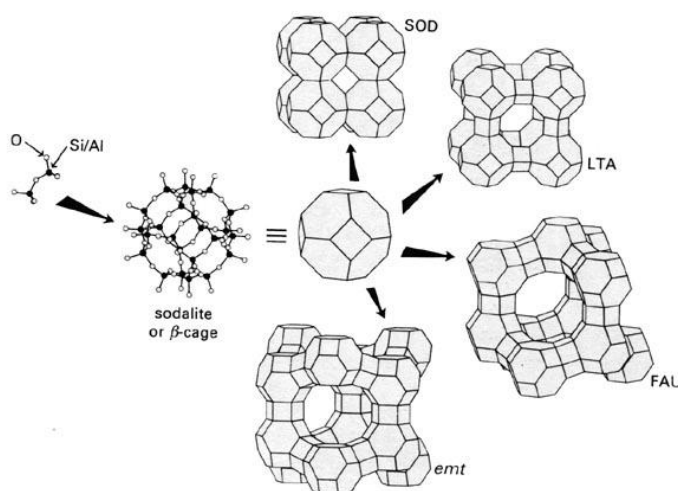


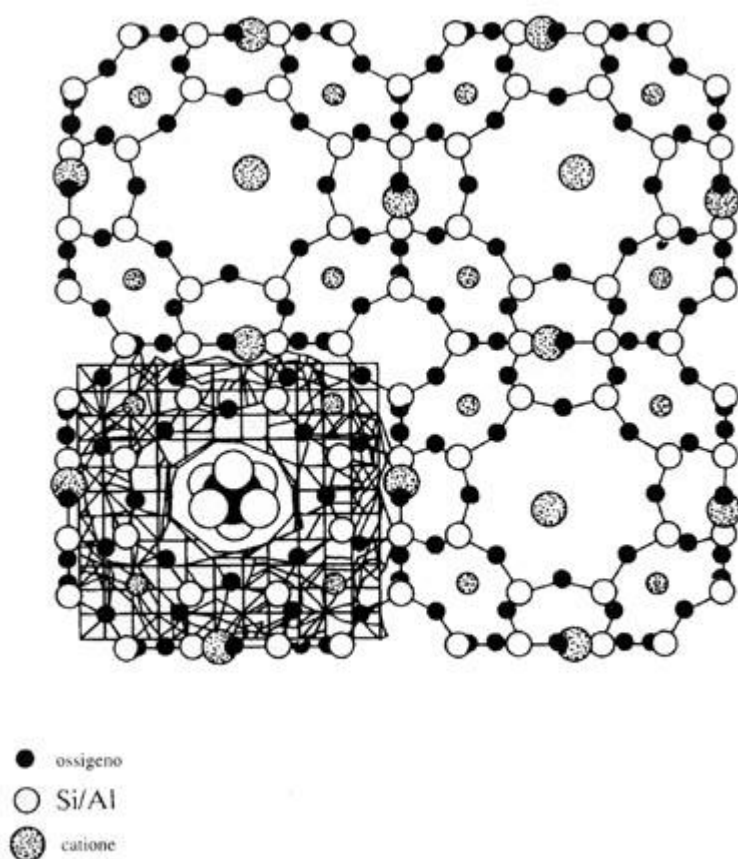
Figura 3.1.2.e Unità sodalitiche nella sodalite (SOD), nella zeolite A (LTA) e nella faujasite (FAU).

La Figura 3.1.2.e mostra oltre alla sodalite, una zeolite sintetica, la zeolite-A o LTA. Questa è correlata alla struttura della sodalite, ma con le unità sodalitiche di base unite mediante ponti ad ossigeno tra gli anelli a 4 membri. La formula della zeolite-A è $\text{Na}_{12}[(\text{SiO}_2)_{12}(\text{AlO}_2)_{12}] \cdot 27 \text{H}_2\text{O}$. Il rapporto Si/Al è quindi 1:1 e gli atomi dei due elementi si alternano *regolarmente* nel reticolo. Nella stessa Figura è mostrata la struttura della faujasite (FAU), un minerale,. Le unità sodalitiche sono legate da ponti a ossigeno tra quattro degli otto anelli a 6 membri, in arrangiamento tetraedrico, formando prismi esagonali.

Un efficace sistema di classificazione delle zeoliti in base alla tipologia della loro

struttura fu proposto alla fine degli anni settanta da Meier. Egli distinse le diverse strutture considerando isotropiche le strutture identiche seppur differenti per composizione, distribuzione degli atomi e dimensione delle celle cristalline. In accordo con la nomenclatura IUPAC, Meier adottò una regola mnemonica consistente in tre lettere maiuscole per identificare ciascun tipo di struttura, illustrata su *“Atlas of Zeolite Structure Type”*.

Oltre alle zeoliti convenzionali, diverse nuove classi di materiali zeolitici sono stati preparati come gli AIPO (alluminofosfati), i SAPO (alluminofosfati Si sostituiti) etc. Il reticolo Si-O-Al nelle zeoliti è relativamente rigido; i cationi non fanno parte integrante della struttura e sono spesso chiamati cationi intercambiabili. Sono relativamente mobili e possono essere sostituiti da altri cationi. La presenza e posizione dei cationi nella zeolite è importante per varie ragioni. Le sezioni degli anelli e dei canali nella zeolite possono venire modificate cambiando la carica (e quindi il numero) dei cationi.



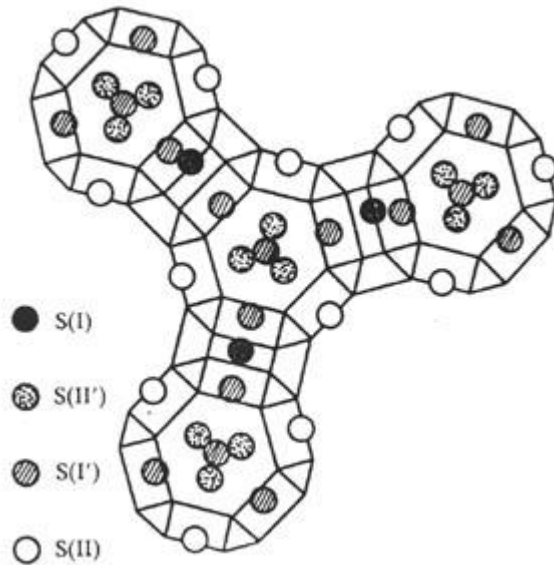
di una possibile collocazione. Nella Figura a lato sono mostrati alcuni siti di assorbimento di ioni K^+ nella zeolite-A.

Alcuni cationi occupano il centro degli anelli a 6, mentre altri sono all'interno degli

Questo ha una grande importanza per il tipo di molecole che possono venire assorbite nella zeolite. Una variazione nella occupazione dei siti da parte dei cationi porta anche a cambiare le proprietà catalitiche del sistema. Per questa ragione è diventato molto importante determinare la posizione dei cationi all'interno della zeolite. I cationi all'interno della zeolite possono avere più

anelli ad 8.

La presenza dei cationi in queste posizioni *riduce la dimensione* del canale e impedisce l'entrata di altre molecole. Se, ad esempio, si vuole introdurre una molecola organica come l'etano, si possono sostituire gli ioni K^+ con ioni divalenti in modo da dimezzare il numero di cationi presenti nella zeolite. Inoltre, gli ioni divalenti preferiscono posizionarsi all'interno degli anelli a 6, lasciando liberi i canali di accesso alle cavità zeolitiche (Figura sopra).



I principali siti cationici nel minerale faujasite (e, per analogia, nelle zeoliti X e Y) sono illustrati nella Figura a sinistra.

Questi siti sono collocati :

nei prismi esagonali, S(I), occupati da cationi che preferiscono alte coordinazioni;

immediatamente adiacenti ai precedenti nelle gabbie β , S(I'), occupati solo in alternativa ai siti S(I);

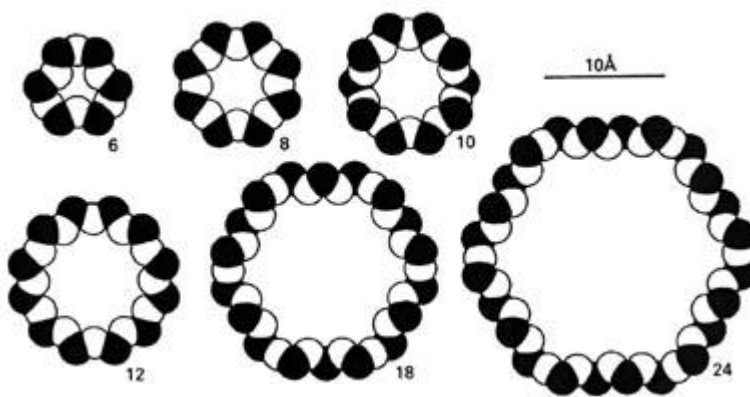
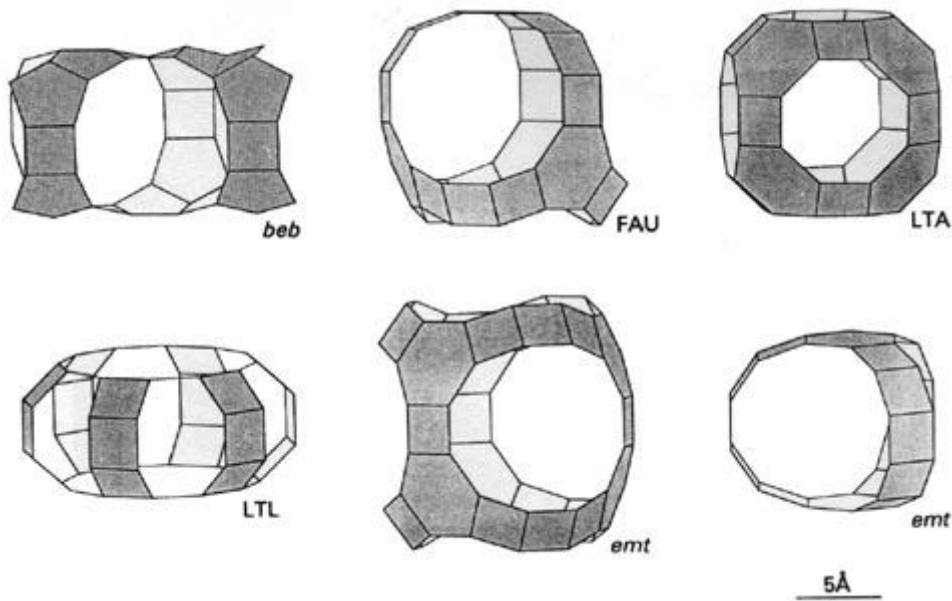
sulle pareti della supergabbia, S(II), quasi tutti occupati;

nella parte centrale delle gabbie β , S(II'), quasi sempre vuoti.

Le zeoliti cristalline contengono molecole di acqua che sono coordinate agli ioni scambiabili. Le strutture possono essere disidratate mediante riscaldamento sotto vuoto, con la conseguenza che anche i cationi si spostano e in genere si collocano in siti con basso numero di coordinazione. Le zeoliti disidratate sono ottimi agenti essiccanti.

3.1.2.1 Cavità e canali

L'aspetto strutturale di maggior importanza nelle zeoliti è la presenza di cavità e pori collegati tra loro mediante dei canali a formare una vera e propria rete di canali all'interno della struttura. Queste cavità hanno dimensioni molecolari e possono assorbire specie chimiche abbastanza piccole da passare attraverso i canali. Un fattore che controlla la possibilità o meno di assorbire molecole nella zeolite è la dimensione della finestra o apertura del poro (Figura sottostante).



Questa finestra a sua volta dipende dal numero di tetraedri, atomi T, e di ossigeni, O, uniti tra loro e quindi dalla dimensione degli anelli. Le dimensioni delle finestre sono ottenute usando i

raggi di van der Waals di O, 1.35 Å, e Si, 1.40 Å.

Una cavità nella sodalite ha aperture costituite da anelli a 4 tetraedri con un diametro di circa 260 pm; questo diametro è abbastanza piccolo e permette solo l'ingresso di molecole d'acqua. L'apertura dei pori nella zeolite-A è di 410 pm, ed è determinato dalla dimensione degli anelli a 8. La cavità interna però misura 1140 pm in diametro. La

faujasite ha aperture costituite da anelli a 12 con diametro di 740 pm e una supercavità di 1180 pm in diametro.

3.1.2.2 Dimensioni dei canali e delle cavità nelle zeoliti

Zeolite	No. Tetraedri	Diametro finestra (pm)	Diametro cavità (pm)
Sodalite	4	260	
Zeolite-A	8	410	1140
Erionite-A	8	360 x 520	
ZSM-5	10	510 x 550, 540 x 560	
Faujasite	12	740	1180
Mordenite	12	670 x 700, 290 x 570	

Tabella 3.1.2.2.a Dimensioni delle finestre e cavità delle zeoliti.

Le dimensioni delle finestre dei pori variano quindi tra 300 e 1000 pm, da cui il nome di setaccio molecolare dato a questi alluminosilicati. Di conseguenza, le zeoliti hanno una elevatissima area superficiale, con la possibilità di adsorbire grandi quantità di specie chimiche, una caratteristica di grande importanza in catalisi. Valori tipici di area superficiale per le zeoliti sono 300-700 m² g⁻¹ e in cristalliti della dimensione di 0.1-5 mm più del 98% dell'area superficiale totale è interna.

La dimensione dei pori nelle zeoliti raffrontata con quelle di una serie di specie molecolari è rappresentata in Figura 3.1.2.2.a. I diametri delle specie molecolari (a destra) sono determinati da misure cinetiche. I tratti scuri nel diagramma rappresentano l'aumento di dimensioni dei pori per un aumento della temperatura nell'intervallo 77-420 K.

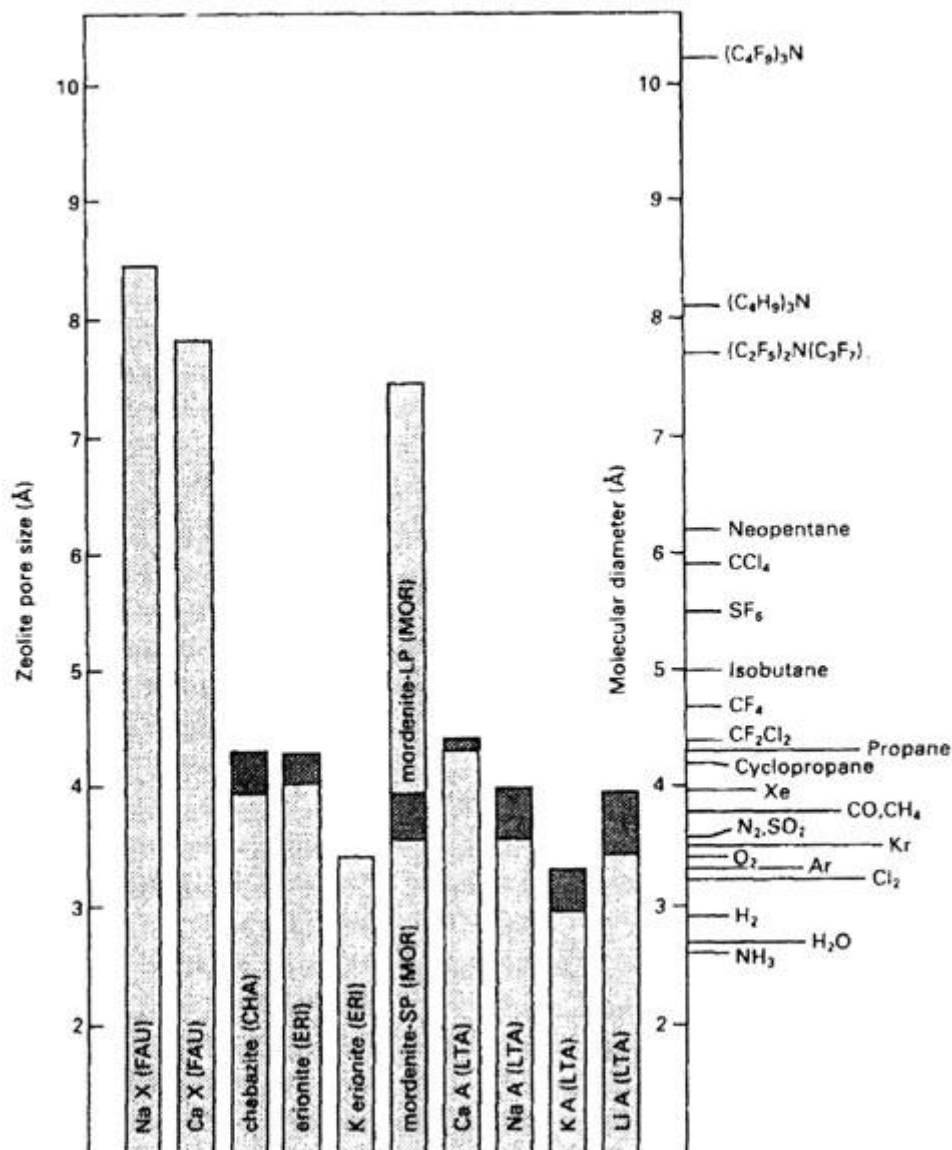


Figura 3.1.2.2.a Raffronto tra le dimensioni dei pori zeolitici ed il diametro cinetico di alcune molecole.

Le zeoliti sono suddivise in tre grandi categorie. I canali possono essere paralleli a: (1) una singola direzione (si parla di zeoliti fibrose); (2) due direzioni distribuite su dei piani (zeoliti lamellari); (3) tre direzioni (zeoliti a framework). Come sempre accade, esistono strutture che non appartengono in modo netto a nessuna di queste categorie. Un tipico esempio di zeolite fibrosa è la edingtonite, $Ba[(AlO_2)_2(SiO_2)_3] \cdot 4H_2O$, che ha una caratteristica forma a catena legata alla ripetizione regolare di cinque tetraedri (Figura 3.1.2.2.b).

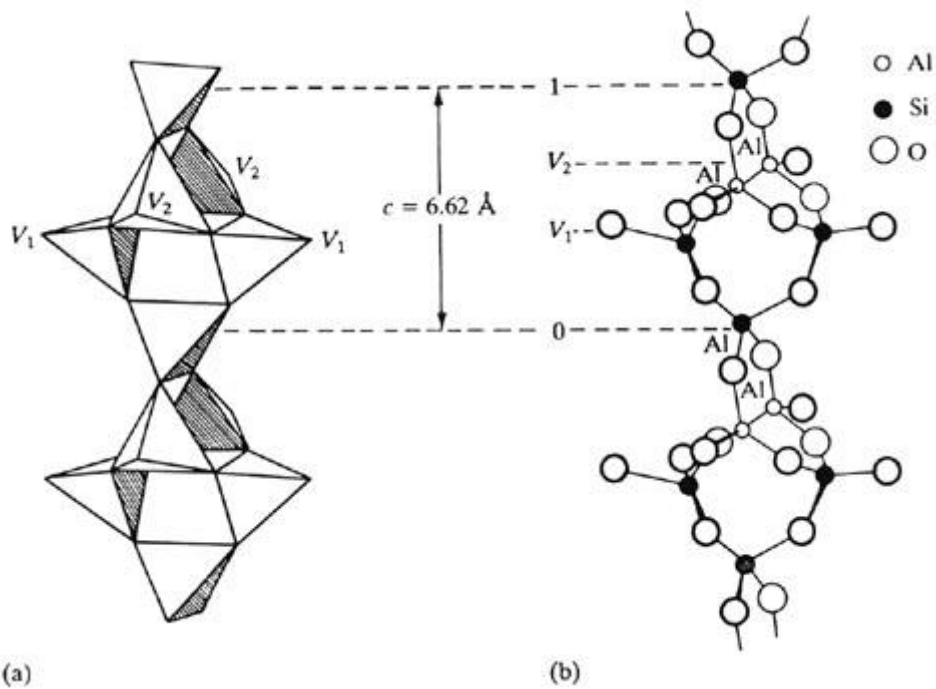


Figura 3.1.2.2.b Struttura dell' edingtonite, $Ba[(AlO_2)_2(SiO_2)_3] \cdot 4H_2O$.

Le catene sono connesse tra loro attraverso ponti di ossigeno, secondo modalità diverse (vedi Figura 3.1.2.2.c, i tetraedri ombreggiati contengono Al, cationi e acque sono disposti tra le catene), ma la concentrazione di atomi nelle catene conferisce al materiale il suo carattere fibroso.

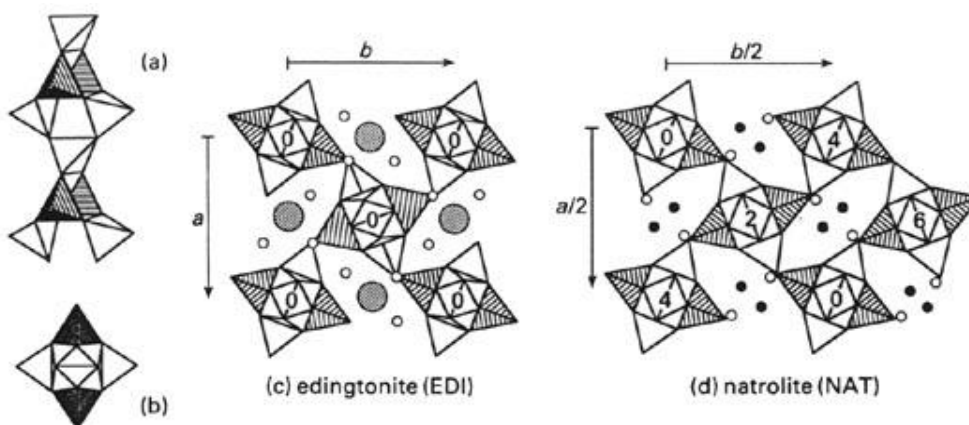


Figura 3.1.2.2.c Strutture zeolitiche a catena.

Una zeolite con canali disposti lungo le tre dimensioni spaziali è la zeolite-A (Figura 3.1.2.2.d). La cavità centrale ha la forma di un cubottaedro troncato; le varie cavità

formano dei canali paralleli alle tre direzioni degli assi della cella cubica.

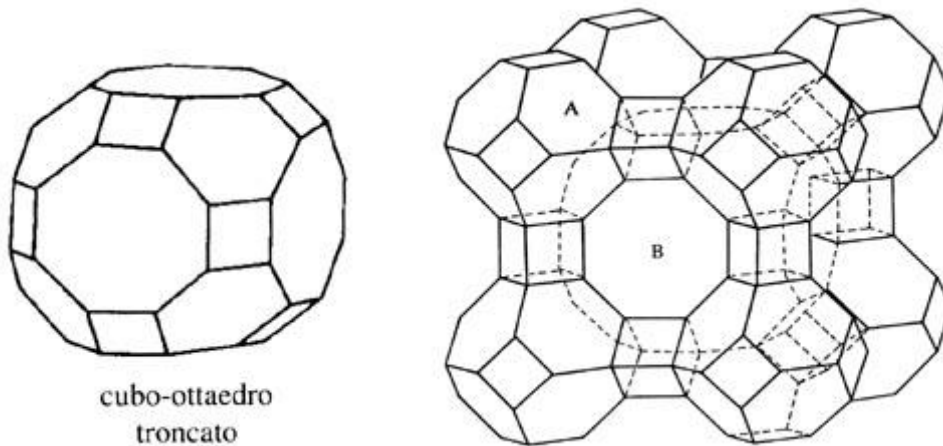
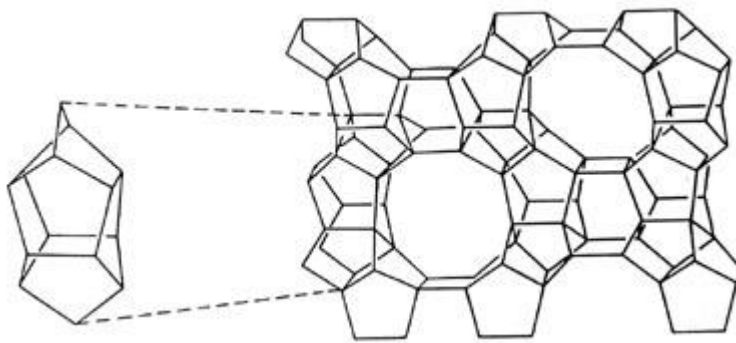


Figura 3.1.2.2.d Struttura della Zeolite A.

Nella metà degli anni '70 furono sintetizzate alcune zeoliti con struttura completamente nuova, che hanno portato a significativi sviluppi nell'area. Si tratta di una famiglia di zeoliti a framework 3D, che includono le specie sintetizzate presso i laboratori della compagnia petrolifera Mobil, note come ZSM-5 e ZSM-11 (dette anche *silicaliti* 1 e 2, rispettivamente) e alcune altre zeoliti naturali, che sono chiamate con il nome generale di pentasil.



La struttura della ZSM-5 (ZSM = Zeolite Socony Mobil), un catalizzatore utilizzato industrialmente in tutto il mondo, è riportata in Figura. L'unità di base pentasil è

mostrata a sinistra (si noti che può essere descritta come un poliedro con 8 facce pentagonali). Queste unità di base sono collegate in catene unite tra loro a formare degli strati. La sovrapposizione appropriata di questi strati genera poi le diverse strutture pentasil.

Sia la ZSM-5 che la ZSM-11 sono caratterizzate da canali controllati da anelli a 10, con diametro di circa 550 pm (Figura sopra).

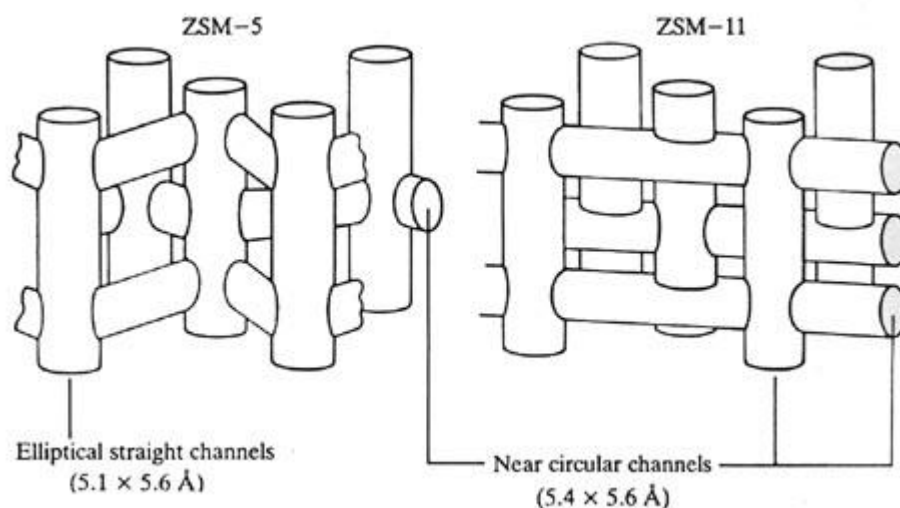
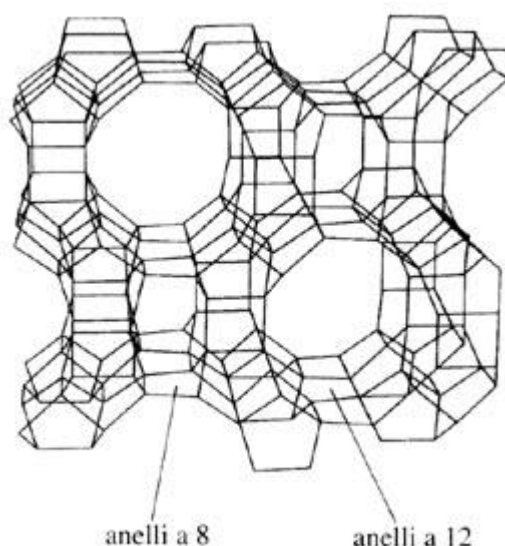


Figura 3.1.2.2.e Sistemi di canali nella ZSM-5 e nella ZSM-11.

Il sistema dei pori in queste zeoliti non unisce grandi cavità ma contiene zone di intersezione dove lo spazio disponibile permette che possano manifestarsi interazioni molecolari. La struttura del sistema dei pori della ZSM-5 con canali circolari a zigzag che si intersecano con canali lineari a sezione ellittica è mostrata in Figura. Nella ZSM-11 invece i canali che si intersecano hanno sezioni praticamente circolari.



Il sistema di canali della mordenite è mostrato in Figura 3.1.2.2.d. Si distinguono due tipi di canali, governati da anelli a 8 e 12 membri interconnessi da piccoli anelli a 5 e 6 membri.

Figura 3.1.2.2.f Struttura della Mordenite.

3.1.3 Preparazione e Caratterizzazione di zeoliti

Le zeoliti vengono preparate da soluzioni contenenti silicati e alluminati, $[Al(OH)_4]^-$, di sodio, ad alti pH realizzati usando l'idrossido di un metallo alcalino o una base organica. Si forma un *gel* attraverso un processo di copolimerizzazione degli ioni silicato e alluminato. Il gel viene poi riscaldato moderatamente a 60-100 °C in un recipiente chiuso per circa 2 giorni, producendo una zeolite condensata (si parla di condizioni idrotermali). Il prodotto ottenuto è determinato dalle condizioni di sintesi: temperatura, tempo, pH e movimento meccanico. Alcuni microcristalli di zeoliti diverse osservati al SEM sono mostrati in Figura 3.1.3.a.

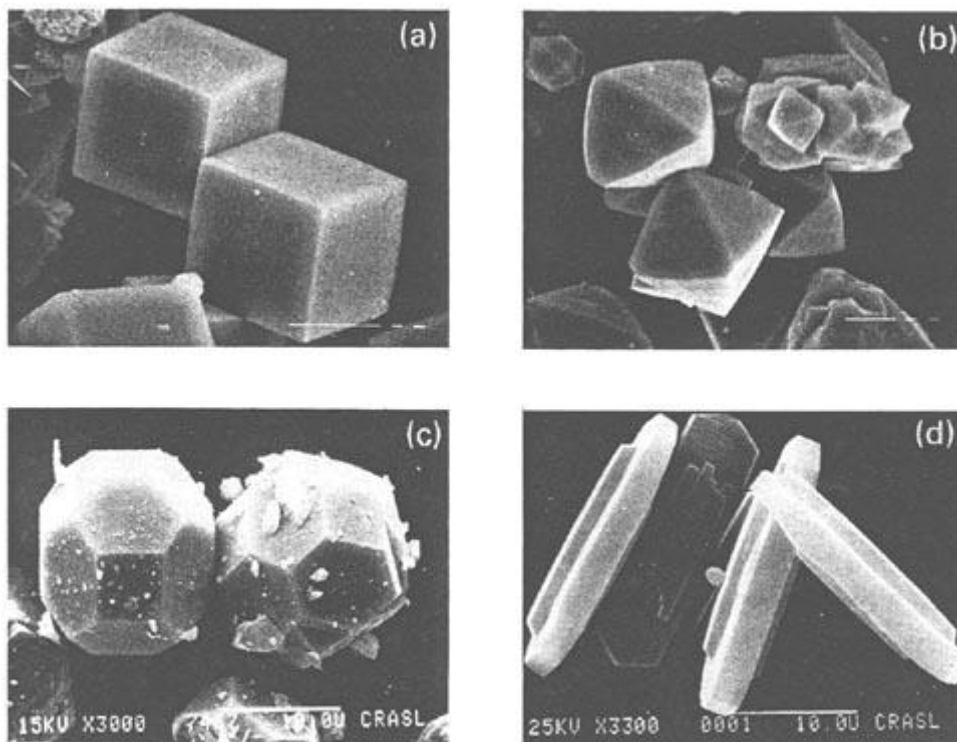


Figura 3.1.3.a Immagini SEM di cristalli zeolitici: (a) Zeolite ZK-4 (LTA); (b) Zeolite X (FAU); Sodalite (SOD) e (d) Silicalite-1 (MFI).

La presenza di basi organiche favorisce la formazione di fasi ricche di silicio. La formazione di nuove fasi sintetiche ricche di Si è stata facilitata dall'uso di templanti. Questo metodo è un caso particolare di precipitazione molto usato per la sintesi di zeoliti. Il processo implica la cristallizzazione da una soluzione acquosa basica

contente gli ioni costituenti più una sostanza detta templante, generalmente uno ione a base organica. La forma della molecola di templato dirige la cristallizzazione dei tetraedri di alluminio e silicato e determina la struttura del prodotto finale. Tipicamente vengono usati sali di ammonio quaternario a grandi dimensioni, come tetrapropilammonio. Il catione tetrametilammonio viene usato nella sintesi di ZK-4. La Figura 3.1.2.b illustra i cationi tetra-alchilammonio occlusi nelle cavità della sodalite (a) e tetrapropilammonio in un canale di intersezione nella zeolite sintetica ZSM-5 (b).

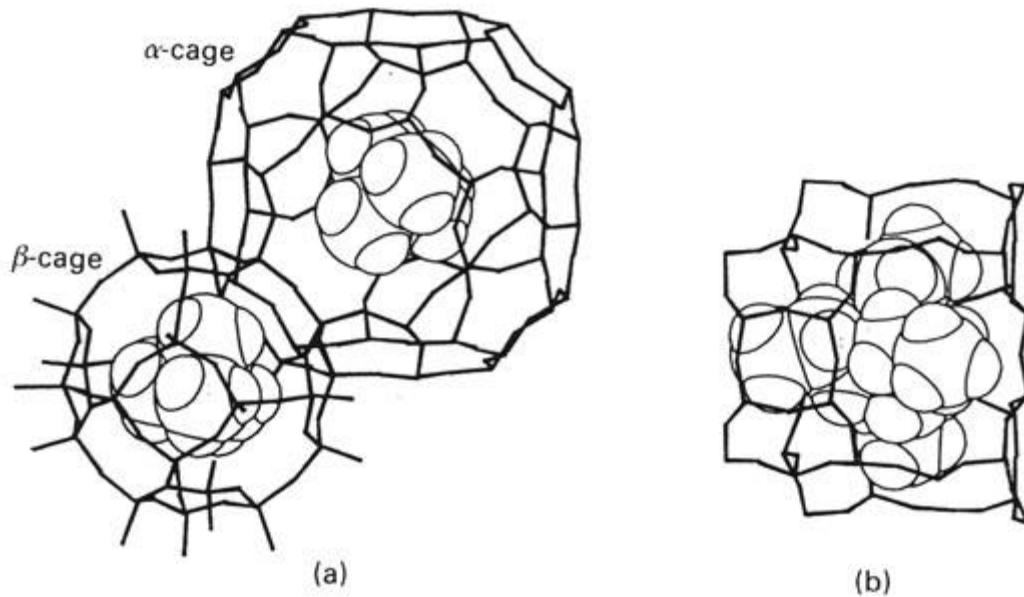


Figura 3.1.3.b ICatione Tetrapropilammonio nelle gabbie zeolitiche: (a) Sodalite; (b) ZSM-5.

Una volta terminata la sintesi, il templato viene rimosso per decomposizione termica o per via chimica.

Un esempio importante di zeolite sintetica è la ZMS-5. Si parte da una miscela di acido silicico ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), idrossido di sodio, solfato di alluminio, acqua, n-propilammina e bromuro di tetrapropilammonio che viene scaldata a $160\text{ }^\circ\text{C}$ per parecchi giorni. Il templato organico dirige la crescita con i gruppi alchilici che riempiono le cavità della zeolite.

La preparazione di zeoliti ricche in silicio, come la zeolite-Y, può essere effettuata variando la composizione del materiale di partenza, ma anche per rimozione successiva degli ioni Al^{3+} dal reticolo della zeolite mediante acidi minerali o agenti complessanti. Il pH è un fattore molto importante nella sintesi. Piccole variazioni di pH infatti

possono variare sensibilmente la quantità di prodotto ottenuto.

3.1.3.1 Caratterizzazione strutturale delle zeoliti

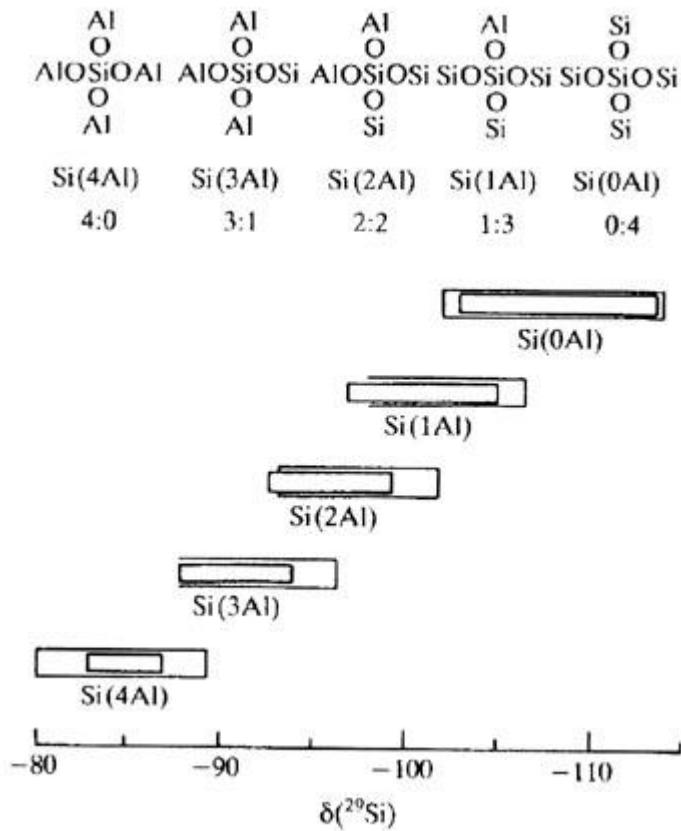
Le strutture delle zeoliti sono state determinate mediante tecniche cristallografiche di diffrazione di raggi X e neutroni. Alcune delle zeoliti naturali furono caratterizzate già negli anni trenta, mentre le zeoliti sintetiche sono state investigate dal 1956 in poi. Purtroppo è piuttosto difficile caratterizzare in modo univoco la struttura di una zeolite per questa via. Dato la vicinanza di Al e Si nella tavola periodica, la diffrazione dei raggi X da parte della nuvola elettronica dei due atomi è simile (Al e Si hanno fattori di diffrazione atomica molto vicini). Di fatto Al e Si all'interno della struttura sono praticamente indistinguibili ai raggi X.

Le posizioni di Al e Si nella zeolite possono essere determinate applicando la regola di Leowenstein che proibisce la presenza di un legame Al-O-Al nella struttura. Un corollario di questa regola è che quando il rapporto Si/Al è 1, la quantità di Al nella zeolite è massima e gli atomi dei due elementi si alternano nel reticolo. Quando si tratta di localizzare la posizione dei cationi si incontra un altro problema. Non tutti i siti cationici sono occupati, e la occupazione dei siti è statistica. Inoltre le zeoliti sono materiali microcristallini e occorrerebbero grandi cristalli singoli per poterne studiare la diffrazione (ma il problema può essere ovviato utilizzando il metodo delle polveri, soprattutto con la diffrazione di neutroni).

Una delle tecniche maggiormente usate per studiare la struttura delle zeoliti è la spettroscopia NMR col metodo della rotazione ad angolo magico (*magic angle spinning*, MAS NMR). Questa tecnica elimina l'allargamento di riga che normalmente si osserva nei solidi. L'allargamento di riga è dovuto a varie interazioni anisotropiche le quali contengono un termine $(3\cos^2\theta - 1)$. Quando $\cos\theta = (1/3)^{1/2}$, ossia $\theta = 54^\circ 44'$, questo termine va a zero. Ruotando il campione attorno a un asse inclinato a questo angolo "magico" rispetto alla direzione del campo magnetico elimina le origini dell'allargamento e migliora la risoluzione dello spostamento chimico (*chemical shift*) nello spettro.

Il nuclide ^{29}Si ha uno spin nucleare $I = 1/2$ e pertanto dà linee spettrali strette senza allargamento di quadrupolo o asimmetria; la sensibilità è elevata e l'abbondanza

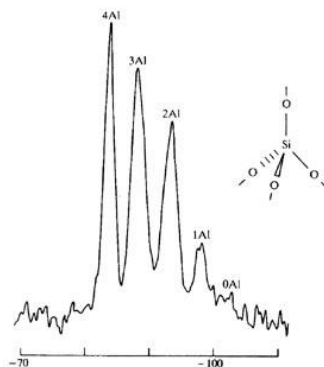
naturale è del 4.7%. Lavori compiuti verso la fine degli anni '70 hanno mostrato la potenzialità di questa tecnica per lo studio delle zeoliti.



Si è visto che si possono distinguere sino a 5 picchi per il nucleo ^{29}Si di varie zeoliti e che questi corrispondono ai cinque diversi intorno chimici del Si nella struttura.

Figura 3.1.3.1.a Chemical shifts.

Ogni atomo di Si è coordinato a quattro ossigeni ma ogni O è a sua volta legato a un Si o a un Al dando 5 possibilità: $\text{Si}(\text{OAl})_4$, $\text{Si}(\text{OAl})_3(\text{OSi})$, $\text{Si}(\text{OAl})_2(\text{OSi})_2$, $\text{Si}(\text{OAl})(\text{OSi})_3$, e $\text{Si}(\text{OSi})_4$. Ancora più importante è il fatto che ogni coordinazione ha un valore particolare del *chemical shift*. Questi valori (o intervalli di valori) possono quindi essere utilizzati nello studio di altre zeoliti. Gli intervalli dei *chemical shift* sono mostrati in Figura 3.1.3.1 a



Uno spettro MAS NMR della zeolite analcite è rappresentato nella seguente Figura. L'analcite contiene tutti e cinque i tipi di coordinazione. Anche con questa informazione è piuttosto complicato decidere dove ogni tipo di legame si presenta nella struttura. Le posizioni dei cationi possono dare ulteriori informazioni in quanto tendono ad essere il più vicino possibile ai siti Al carichi negativamente.

Il nuclide ^{27}Al ha una abbondanza naturale del 100% e uno spin nucleare $I = 5/2$ dando luogo a una risonanza molto pronunciata, allargata da effetti di asimmetria e quadrupolari. Dato che la regola di Loewenstein stabilisce che non possono esistere legami Al-O-Al, ogni Al deve avere un intorno del tipo $\text{Al}(\text{SiO})_4$ e una singola risonanza, anche se lo spostamento chimico dell'Al ha valori caratteristici per ogni zeolite. In ogni caso la determinazione dello spettro MAS NMR di ^{27}Al è di grande importanza in quanto permette di distinguere tra tre diversi tipi di coordinazione: Al coordinato in modo ottaedrico, $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, è spesso intrappolato come catione nei pori della zeolite ed ha un segnale a circa 0 ppm (rispetto a $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ acquoso preso come riferimento). L'Al coordinato in modo tetraedrico nella struttura da un picco a 50-65 ppm, e unità $[\text{AlCl}_4]^-$ danno un picco a 100 ppm. Questo picco si trova quando una zeolite viene trattata con SiCl_4 per aumentare il rapporto Si/Al nella struttura e dovrebbe scomparire con lavaggi del campione.

Un'importante proprietà degli spettri MAS NMR è che la misura della intensità dei picchi permette di risalire al rapporto Si/Al del materiale. Questo è molto importante nel disegnare nuove zeoliti per uso in catalisi.

3.1.4 Applicazioni delle Zeoliti

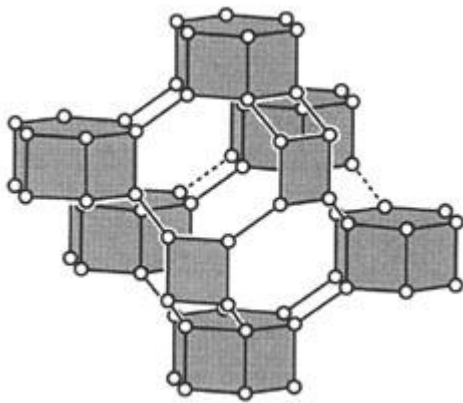
Agenti deidratanti. Le zeoliti contengono sempre molecole di acqua coordinate agli ioni incorporati nella struttura. Le strutture possono essere disidratate per riscaldamento sotto vuoto. Le zeoliti così ottenute sono dei buoni agenti essiccanti.

Zeoliti come scambiatori di ioni. Le zeoliti hanno la capacità di scambiare in parte o tutti i loro cationi (non di reticolo) per trattamento con una soluzione o un sale fuso. Il carattere dell'equilibrio di scambio ionico tra la soluzione e la zeolite dipende da vari fattori tra cui il tipo di catione scambiabile e i possibili siti di coordinazione cationica presenti nella zeolite. La massima capacità di scambio è determinata dal rapporto Si/Al.

La zeolite-A nella forma con Na^+ è usata come additivo per addolcire le acque; gli ioni Na^+ vengono rilasciati e sostituiti dagli ioni Ca^{2+} provenienti dall'acqua dura. L'additivo può essere rigenerato facendovi passare una soluzione salina molto pura di NaCl . Questo processo è familiare a chi usa la lavastoviglie. Attualmente le zeoliti-A sono aggiunte a tutti i detersivi per lavatrice al posto dei polifosfati. Annualmente si producono più di 250000 tonnellate di zeolite-A per uso nei detersivi. E' anche possibile produrre acqua dolce per desalinazione dell'acqua di mare usando zeoliti che contengono una miscela di ioni Ag e Ba . Il processo però è talmente costoso da essere utile solo in caso di emergenza.

Alcune zeoliti hanno una affinità per un catione in particolare. E' il caso della clinoptilolite, una zeolite naturale, che scambia facilmente con il Cs . Può quindi essere usata per separare il ^{137}Cs da rifiuti radioattivi scambiando ioni Na^+ con ioni Cs^+ . In modo simile la zeolite-A è usata per recuperare lo Sr radioattivo.

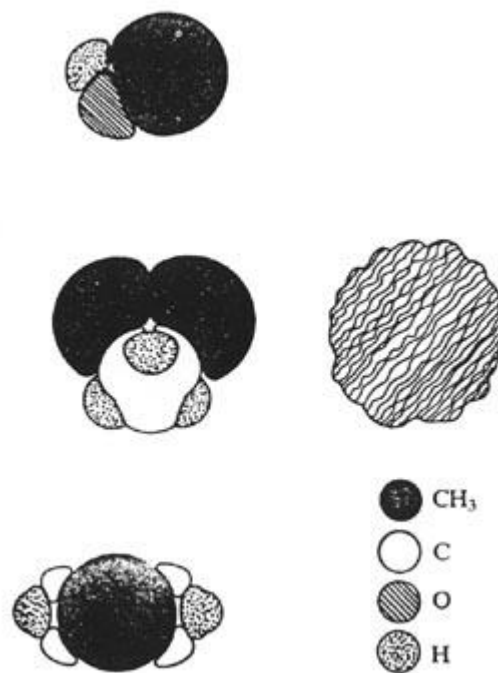
Zeoliti come adsorbenti. Dato che le zeoliti deidratate hanno strutture porose aperte, possiedono alte aree superficiali e sono in grado di adsorbire grandi quantità di sostanze oltre all'acqua. In questo modo le zeoliti possono essere utilizzate come setacci molecolari per purificare o separare sostanze.



Ad esempio la chabazite (Figura a fianco) è nota per la sua capacità di assorbire piccole molecole come acido formico e metanolo ma non benzene e molecole più grandi. La chabazite è stata usata industrialmente per rimuovere la SO_2 dalle emissioni inquinanti di impianti di combustione industriali. Similmente i pori di apertura 410 pm nella zeolite-A,

associati a finestre costituite da anelli a 8 membri (si noti però che la cavità interna ha un diametro molto maggiore, di 1140 pm), lasciano passare molecole di metano ma escludono molecole più grandi come il benzene.

La computer graphic può essere molto utile nell'illustrare se una molecola è in grado o meno di passare attraverso una finestra o un canale. Gli atomi vengono rappresentati coi loro raggi di van der Waals. La selettività di forma della ZSM-5 è illustrata nella Figura a destra (è mostrata la cross-section del canale lineare, a confronto con dimensioni e forma di alcune molecole: metanolo, 2,2-dimetilpentano, p-xilene).



Le zeoliti sono particolarmente utili per questi processi dato che la loro struttura

non cambia durante la deidratazione e che il reticolo non si decompone sino a temperature dell'ordine dei 700 °C. In una zeolite-A dopo deidratazione il volume delle cavità rappresenta circa il 50% del volume totale del materiale. Un elenco di zeoliti e di specie da esse assorbite è riportato in Tabella. Dopo il loro utilizzo come setacci molecolari, le zeoliti possono essere ripristinate mediante riscaldamento o riflusso con gas puri.

3.1.4.1 Applicazioni di setacci molecolari in processi industriali

Campi di applicazione	Usi:		
	Essiccamento	Purificazione	Separazione
Raffinerie e petrolchimico	Paraffine, olefine, acetileni, gas di hydrocracking, solventi	Addolcimento* del 'gas liquido di petrolio' e di aromatici, rimozione di CO ₂ da gas olefinici, purificazione del gas di sintesi.	Alcani normali e a catena ramificata.

Gas industriali	H ₂ , N ₂ , O ₂ , Ar, He, CO ₂ , gas naturale	Rimozione di CO ₂ dal gas naturale, di idrocarburi dall'aria.	Composti aromatici
Fornaci industriali	Exogas, gas di cracking, reformer gas	Rimozione di CO ₂ e NH ₃ dall'exogas e dal gas di fissione dell'ammoniaca	Azoto e ossigeno

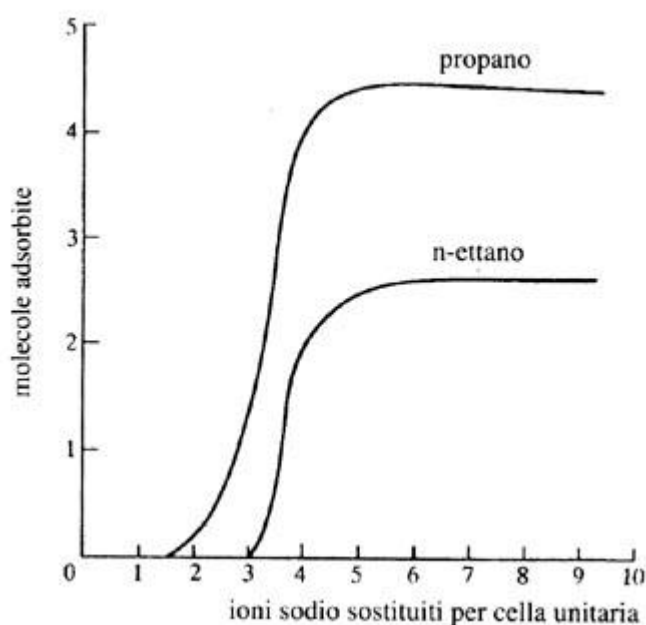
*Rimozione dei composti solforati.

Tabella 3.1.4.1.a Principali applicazioni industriali di zeoliti.

E' possibile un controllo fine sull'apertura dei pori della zeolite per consentire l'adsorbimento di molecole specifiche. Come detto in precedenza si può operare sui cationi presenti. Questo metodo è usato con le zeoliti-A per separare idrocarburi ciclici e ramificati da alcani a catena lineare (paraffine). Quando gli ioni Na⁺ vengono sostituiti da ioni Ca²⁺ l'apertura dell'accesso ai pori aumenta. Quando circa un terzo degli ioni Na⁺ è stato rimpiazzato molti idrocarburi a catena lineare possono essere adsorbiti

mentre quelli ramificati sono troppo grandi per penetrare.

Il processo è utilizzato industrialmente per separare idrocarburi nella produzione di detersivi. Anche il petrolio può essere purificato rimuovendo frazioni a catena lineare e basso numero di ottano (Figura a sinistra).



A -196 °C l'ossigeno viene liberamente adsorbito dalla zeolite-A (nella forma Ca) mentre N₂ non penetra. Le due molecole non sono molto diverse come dimensioni: l' O₂ ha un diametro di 346 pm, mentre N₂ di 364 pm. Quando T aumenta l'adsorbimento di

N_2 aumenta sino a un massimo attorno ai $-100\text{ }^\circ\text{C}$. La ragione principale è ritenuta essere legata alle vibrazioni degli atomi di O della finestra di ingresso. In un intervallo di 80-300 K ci si aspetta una variazione della dimensione dovuta alle vibrazioni di 10-20 pm e una conseguente variazione delle dimensioni delle aperture di 30 pm, sufficiente ad escludere l'ingresso di N_2 a basse temperature.

Un altro metodo usato per controllare in modo selettivo l'apertura dei pori è la variazione del rapporto Si/Al. Un aumento della quantità di Si ha l'effetto di diminuire di poco la dimensione della cella e quindi quella delle cavità, ridurre il numero di cationi liberando quindi i canali, e rendere la zeolite più idrofobica. Le zeoliti idrofobiche possono in linea di principio essere usate per rimuovere molecole organiche da soluzioni acquose con un uso potenziale in vari campi (rimozione di sostanze tossiche dal sangue, rimozione di alcol nella produzione di bevande analcoliche, produzione di caffè decaffeinato, ecc.).

Zeoliti come catalizzatori. La applicazione forse più importante delle zeoliti è in catalisi. E' nota la necessità di ottenere catalizzatori ad elevata area superficiale e le zeoliti da questo punto di vista sono uniche. Permettono infatti di trattare sino a 100 volte la quantità di molecole che si possono assorbire su un catalizzatore amorfo tradizionale. Le zeoliti possono essere ottenute cristalline e la loro sintesi è altamente riproducibile: non mostrano quindi tendenza a variare la attività catalitica in funzione della preparazione del catalizzatore. Infine, la possibilità di agire da setacci molecolari consente una selezione delle molecole che possono accedere ad un sito attivo. Quest'ultima proprietà è particolarmente importante ed è nota come selettività di forma (shape selectivity).

L'attività catalitica di zeoliti prive di cationi è attribuita alla presenza di siti acidi che derivano dalle unità tetraedriche $[AlO_4]$ nella struttura. Queste possono comportarsi da siti acidi di Brönsted o di Lewis. Le zeoliti sono sintetizzate di solito con ioni Na^+ per bilanciare le cariche negative del reticolo; gli ioni Na^+ possono facilmente venire sostituiti da protoni per reazione di scambio diretto con una soluzione acquosa, dando luogo alla formazione di siti acidi di Brönsted.

In alternativa, se la zeolite non è stabile in soluzione acida, si prepara il sale della zeolite con lo ione ammonio, NH_4^+ , e si scalda in modo da rimuovere l'ammoniaca lasciando il protone all'interno. Se si riscalda ulteriormente si rimuove acqua dal sito acido di Brönsted lasciando uno ione Al^{3+} tri-coordinato con tipiche proprietà di

accettore di coppie elettroniche (acido di Lewis). Lo schema di formazione di queste specie è mostrato in Figura.

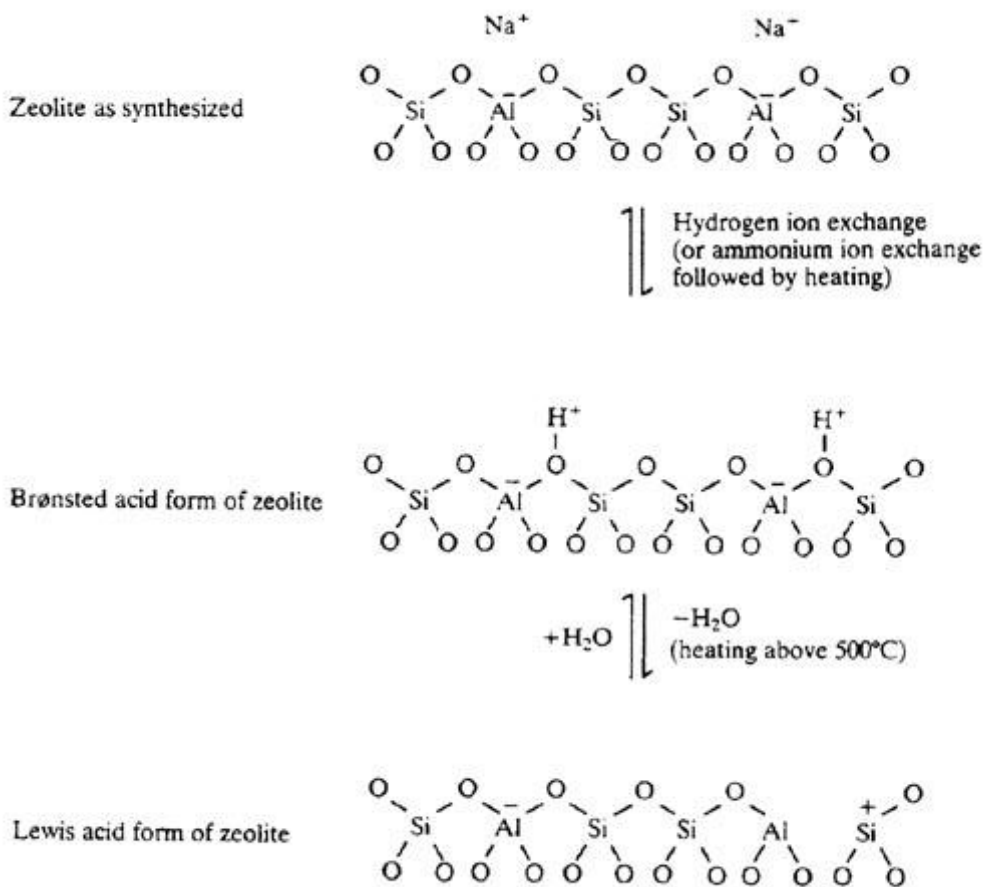


Figura 3.1.4.1a Schema per la generazione di siti acidi di Brønsted e Lewis nelle zeoliti.

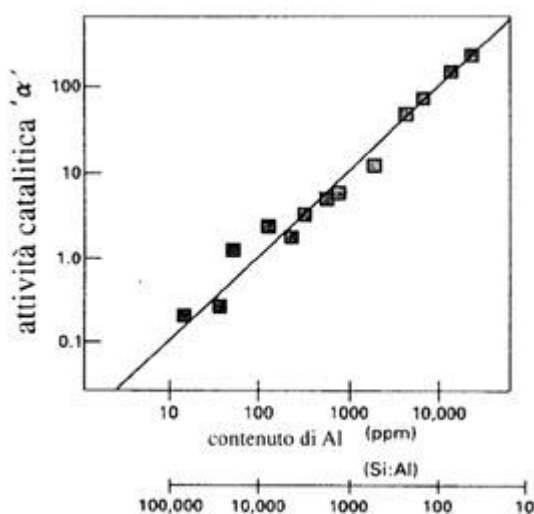
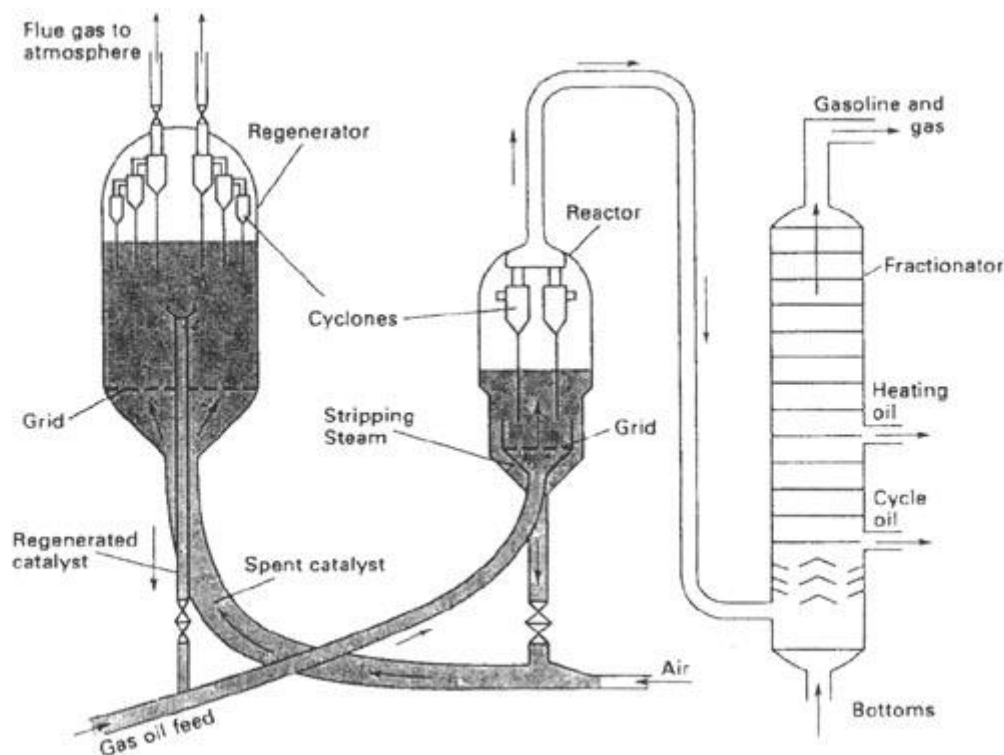
La superficie di una zeolite può quindi presentare siti acidi sia di Brønsted che di Lewis o entrambi a seconda della preparazione. I siti di Brønsted sono convertiti in quelli di Lewis a temperature superiori ai 600 °C.

Non tutte le zeoliti sono usate in forma priva dei cationi o in forma acida. E' comune sostituire gli ioni Na^+ con ioni La^{3+} o Ce^{3+} . Questi ioni si dispongono nella struttura in modo da neutralizzare tre cariche negative di altrettanti tetraedri $[\text{AlO}_4]^-$. La separazione di carica genera un forte campo elettrostatico nella cavità. Questo può risultare abbastanza forte da polarizzare o addirittura ionizzare il legame C-H di una molecola adsorbita.

Una delle primi applicazioni delle zeoliti nel campo della catalisi eterogenea è stata

legata all'uso di zeoliti sostituite da terre rare per processi di *cracking* del petrolio negli anni '60. Il petrolio viene prima separato per distillazione in frazioni leggere e pesanti di idrocarburi e le frazioni pesanti sono ulteriormente trattate in processi di *cracking* su catalizzatori per dare benzine.

Uno schema di processo in un impianto di cracking di idrocarburi a letto catalitico fluido è mostrato nella sottostante Figura.



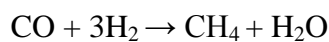
Il meccanismo esatto con cui avviene il processo non è completamente chiaro anche dopo alcuni decenni di intensa ricerca. Si è notato che l'attività catalitica dipende da vari parametri tra cui il contenuto di Al nella zeolite; agendo su questo parametro si possono avere variazioni di tre ordini di grandezza sulla attività (Figura). La Figura mostra l'attività relativa nel

cracking di n-esano di zeoliti ZSM-5 al variare del contenuto di Al nel reticolo.

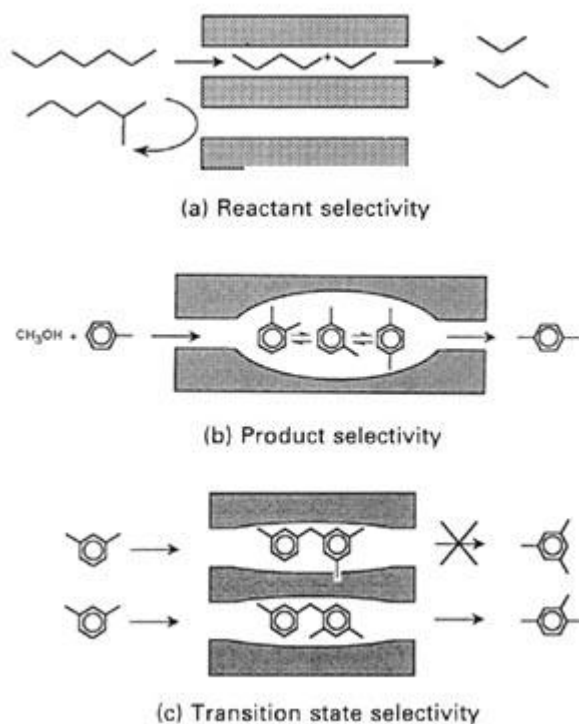
Un terzo uso delle zeoliti in catalisi si basa sulla sostituzione degli ioni Na^+ con ioni di

metalli di transizione come Ni^{2+} , Pd^{2+} o Pt^{2+} . Questi vengono poi ridotti in sito in modo da formare atomi neutri depositati nel reticolo. Il materiale risultante mostra le proprietà di un catalizzatore metallico supportato, ma con una enorme dispersione del metallo.

Una via alternativa per raggiungere lo stesso scopo è quella di adsorbire per via fisica un composto inorganico volatile seguito da decomposizione termica: $\text{Ni}(\text{CO})_4$ può venire adsorbito nella zeolite-X e quindi decomposto per blando trattamento termico a dare una fase finemente dispersa di nichel atomico o quasi atomico nelle cavità. Questo materiale è risultato essere un buon catalizzatore per la conversione di CO in metano:



Ci sono tre tipi di catalisi selettiva per forma (Figura):



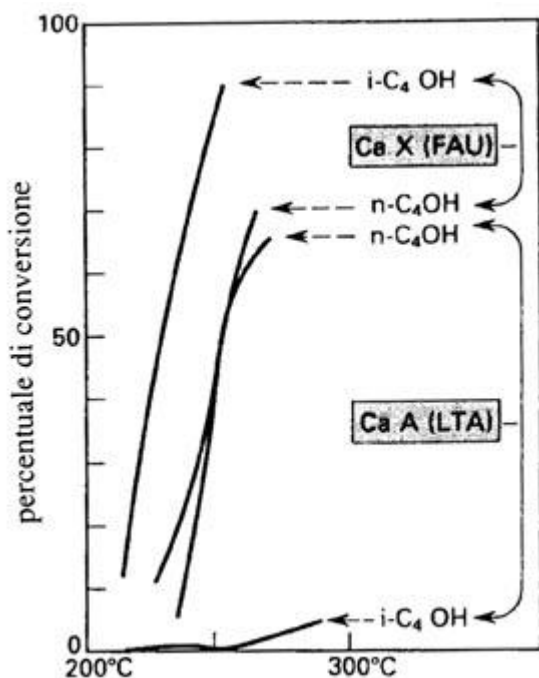
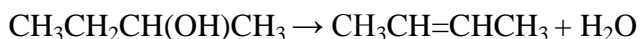
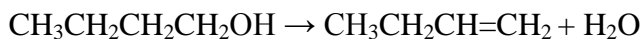
a) selettività sui reagenti: solo le molecole con dimensioni più piccole di un valore critico possono entrare nei pori e raggiungere i siti attivi. Ad esempio, un idrocarburo lineare può venire assorbito e uno ramificato no.

b) selettività sui prodotti: solo i prodotti di una certa dimensione possono lasciare i siti attivi e diffondere attraverso i canali come illustrato nella Figura seguente per il caso dello xilene. Si possono formare tre isomeri nelle cavità zeolitiche, ma solo la forma

para- è in grado di uscire.

c) selettività sullo stato di transizione: alcune reazioni non avvengono in quanto lo stato di transizione (*complesso attivato*) richiede più spazio di quanto non sia disponibile nelle cavità. Un esempio è quello illustrato in Figura della trans-alcilazione dei dialchilbenzeni.

Un esempio di selettività catalitica legata ai reagenti è la reazione di deidratazione del butanolo. Se si disidratano il n-butanolo o l'i-butanolo in una zeolite si possono avere differenze nei prodotti formati:



La zeolite-X ha aperture tali da consentire l'entrata di entrambi i reagenti i quali danno la conversione ad alchene. La zeolite-A, viceversa, ha la caratteristica che mentre la deidratazione dell'alcol lineare avviene con facilità, l'alcol ramificato praticamente non reagisce. I risultati sono mostrati in Figura.

Si noti che alle alte temperature la curva dell'isobutanolo nella zeolite-A comincia a crescere. Ciò è dovuto al fatto che aumentano le vibrazioni reticolari

aumentando un po' le aperture dei pori.

La modesta conversione a basse temperature è dovuta interamente a reazioni che avvengono all'esterno della zeolite.

Nella reazione di catalisi acida della *trans*-alchilazione del dialchilbenzene uno dei gruppi alchilici viene trasferito da una molecola all'altra. Questa reazione bimolecolare comporta uno stato di transizione in cui si forma difenilbenzene. Da questo intermedio si può passare, mediante una dissociazione, all'isomero 1,2,4 o a un isomero 1,2,5 del trialchilbenzene insieme al monoalchilbenzene. Quando il catalizzatore usato è la mordenite lo stato di transizione per la formazione dell'isomero 1,3,5 è troppo grande rispetto alla dimensione della cavità e si ha una resa al 100% dell'isomero 1,2,4 (Figura precedente, caso c).

Uno degli usi industriali della ZSM-5 sta nella produzione di 1,4 (*para*)-xilene. Si tratta di un esempio tipico di selettività sui prodotti. Gli xileni sono ottenuti per alchilazione del toluene con metanolo (Figura 3.4.b).

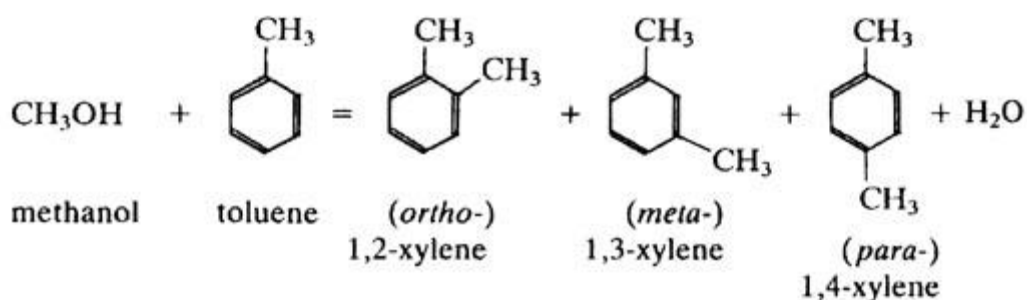


Figura 3.1.4.1.b Preparazione dell'1, 4-paraxilene.

La selettività della ZSM-5 è dovuta alle diverse cinetiche di diffusione degli isomeri attraverso i canali. La diffusione del p-xilene è circa 1000 volte superiore a quella degli altri isomeri. Va ribadito che un ausilio molto importante nella progettazione di nuove zeoliti e nello studio della loro attività catalitica è quello della grafica al computer e dei programmi di dinamica molecolare. Esiste attualmente una intensa attività in questo campo.

3.2 LE MEMBRANE ZEOLITICHE

3.2.1 Definizione di membrana

Una membrana (Koros, 96) è una fase che si frappone tra due fasi ed agisce come barriera attiva o passiva capace di separare specie molecolari differenti in base alle loro proprietà fisiche e chimiche, sotto l'intervento di una forza.

Le fasi possono essere tra loro omogenee o eterogenee. Generalmente le membrane utilizzate sono: solide (non porose, microporose o macroporose), liquide o gassose.

La membrana regola il passaggio delle varie specie da una fase all'altra. Questo farà sì che una fase si impoverisca di una determinata specie mentre l'altra si arricchisca. Il passaggio attraverso la membrana è dovuto ad una o più forze determinate da un gradiente. Il gradiente può essere dovuto ad un potenziale chimico o ad un potenziale elettrico. Un gradiente chimico può essere dovuto ad un gradiente di concentrazione o ad un gradiente di pressione (Winston Ho, 1992). Il gradiente elettrico si ottiene creando un campo elettrico ed inducendo così gli ioni a migrare.

Diverse membrane, ciascuna in grado di lasciar passare solo ioni positivi o solo ioni negativi, creano zone di arricchimento di ioni ed altre di impoverimento.

Questo processo è applicato nell'elettrodialisi utilizzando membrane cariche contenenti quantità apprezzabili di ioni di scambio fissi negativi o positivi come nel caso delle resine a scambio ionico.

Nel caso di gradiente di pressione, si applica una pressione o una depressione su uno dei due lati della membrana, inducendo così un passaggio della fase ed un trattenimento più o meno spinto e più o meno specifico delle sostanze in esso presenti in base al tipo di membrana utilizzata.

Le membrane zeolitiche possono essere utilizzate in condizioni di alta temperatura e di alta pressione.

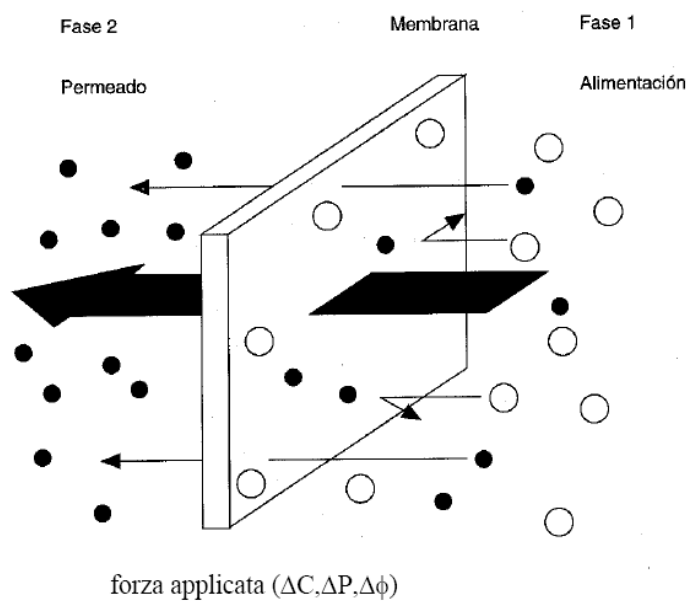


Fig. 3.2.1.a: Membrana semipermeabile (J.Mallevalle, 98).

Le membrane artificiali possono essere ulteriormente suddivise in *biologiche* e *artificiali*.

Le artificiali possono essere ulteriormente suddivise in *organiche* (fatte con polimeri) ed *inorganiche* (fatte con alluminio, metalli, etc.) (Tavolaro, 99).

Le membrane artificiali si possono distinguere in base alla dimensione dei pori in:

- *Macroporose* (più di 50 nm);
- *Mesoporose* (da 2 a 50 nm);
- *Microporose* (meno di 2 nm);

Nella classificazione di questo tipo si può fare riferimento alla *porosità effettiva* (cioè alla capacità di trattenimento caratteristica) delle membrane, determinata attraverso tecniche porometriche; si cerca cioè di determinare in termini statistici una dimensione caratteristica dei pori medi della membrana, per poi risalire alla porosità attraverso la conoscenza della densità dei pori.

3.2.2 Classificazione delle membrane zeolitiche

Generalmente le membrane hanno due dimensioni di gran lunga più grandi rispetto allo spessore.

Le membrane zeolitiche (Tavolaro, 2006) , fanno parte delle membrane microporose. Esse possono essere classificate seguendo vari parametri:

- la composizione;
- la struttura cristallina;
- la configurazione dei contro-cationi esistenti nei canali ^[Tavolaro ,99];
- il tipo di cristallizzazione;
- la presenza di metalli di transizione.

La classificazione in base alla composizione comprende le *membrane inorganiche* e le *membrane ibride*:

- le *membrane inorganiche* comprendono le membrane zeolitiche costituite da cristalli zeolitici e materiali inorganici quali metalli, ossidi, silici amorfe e materiali ceramici. Queste membrane sono stabili e resistenti agli sforzi meccanici alle elevate temperature e a forti gradienti di pressione. Esse vengono sintetizzate con metodologie idrotermali e possono essere zeolitiche pure e composte;
- le *membrane ibride* comprendono le membrane zeolitiche costituite da

strutture zeolitiche e materiali polimerici. Queste membrane sono dotate di una grande resistenza alla trazione e grande elasticità ma di una scarsa resistenza termica e meccanica oltre che di una scarsa stabilità all'invecchiamento. Esse vengono preparate facilmente e rapidamente per mezzo di inclusioni o deposizioni di cristalli.

Una seconda classificazione si basa sulla struttura cristallina della membrana zeolitica. Questa classificazione attribuisce la tipologia della membrana alla struttura dello strato zeolitico (o degli strati) che determina le proprietà della membrana.

Una terza classificazione è fatta in base alla morfologia della membrana e divide le membrane zeolitiche in simmetriche e asimmetriche (fig. 3.2.2):

- le *membrane simmetriche* (auto supportate) sono costituite da una pura fase zeolitica. Sono costituite da un singolo materiale e da una singola composizione chimica che permette di avere un'unica struttura morfologica e i pori hanno essenzialmente la stessa dimensione dalla superficie alla base della membrana. Esse sono infatti chiamate "isotropiche" e sono molto fragili e anche difficili da sintetizzare, ecco perché si preferisce far crescere i cristalli di zeolite su un supporto (di alluminio o acciaio inox) che viene rimosso dopo la preparazione;
- le *membrane asimmetriche* sono costituite da due o più piani strutturali di differente morfologia e le dimensioni dei pori cambiano da una superficie all'altra della membrana, infatti i pori della membrana aumentano di diametro a partire dalla superficie verso la base della stessa. Esse sono chiamate "anisotropiche". Inoltre le membrane asimmetriche sono caratterizzate da un sottile strato superficiale e il supporto, che può essere ceramico o metallico, è permanente, cioè non viene rimosso dopo la preparazione. Il metodo di preparazione della membrana prevede che i cristalli di zeolite crescano su substrati porosi affinché possano formare dei film sottili e continui aventi pori che permettono il passaggio di gas o di molecole reattive. Nella preparazione di queste membrane può verificarsi la formazione di difetti dovuti ad una imperfetta crescita dei cristalli nella sintesi idrotermale, difetti che possono essere eliminati con cristallizzazioni successive.

Una quarta classificazione tiene conto dei contro-cationi mobili esistenti all'interno dei canali che come tali possono essere scambiati, attraverso processi termici di scambio ionico.

Una quinta classificazione è fatta in base al tipo di cristallizzazione: si distinguono tre grandi categorie a seconda della disposizione dei cristalli rispetto ai pori propri del supporto. È importante sottolineare che differenze di cristallizzazione tra le membrane provocano variazioni del comportamento dei gas usati nella permeazione al variare della temperatura (Coronas , 99).

Una sesta classificazione è quella tra:

- membrane che contengono metalli di transizione all'interno dei canali zeolitici (oppure coordinati su difetti strutturali della membrana);
- membrane che presentano sostituzione isomorfa, cioè contenenti atomi metallici nel frame work cristallino, con disposizione regolare ed omogenea degli eteroatomi che, occupando siti cristallini specifici, conferiscono caratteristiche elettroniche ben definite e costanti sull'intera area della membrana.

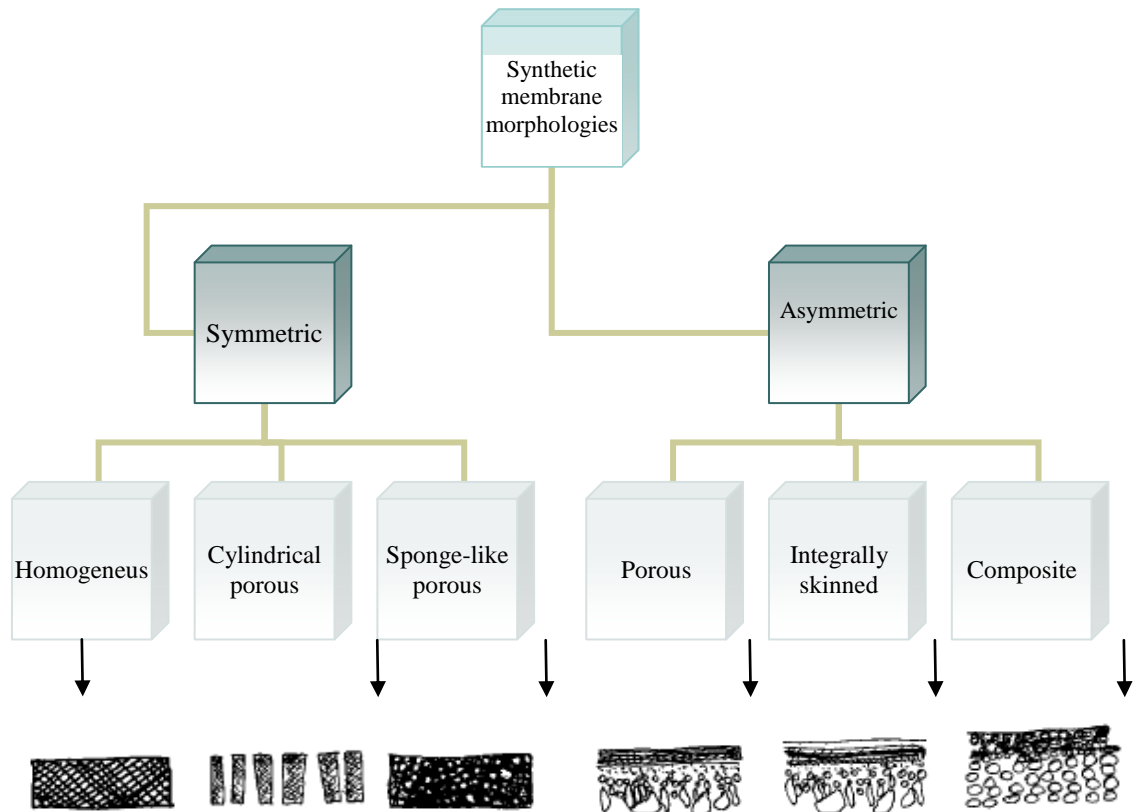


Figura 3.2.2.a Classificazione delle membrane sintetiche

3.2.3 Sintesi delle membrane zeolitiche

La sintesi di membrane zeolitiche è un processo complesso che richiede una serie di stadi:

- pretrattamento del supporto (che può essere trattamento termale, chimico o meccanico);
- sintesi idrotermale;
- impregnazione del supporto (stabile o temporanea), che può essere verticale o orizzontale;
- trattamenti post-sintetici (generalmente termici).

3.2.3.1 Metodi di sintesi

I metodi (Jiang, 04) comunemente usati per sintetizzare le membrane zeolitiche sono numerosi e complessi. Essi includono:

- metodo di incorporazione di cristalli;
- sintesi idrotermale *in situ*;
- cristallizzazione secondaria;
- microonde;
- layer-by-layer;

Metodo di incorporazione di cristalli: il primo tentativo che utilizzò questo metodo prevedeva che cristalli di zeolite venissero inglobati in membrane polimeriche, ma questo non si rivelò un metodo soddisfacente. Tale metodo si basa sull'utilizzo di cristalli zeolitici, uniformi per morfologia e taglia, precedentemente sintetizzati con metodo idrotermale ed usati poi nella miscela polimerica. I parametri che influiscono sulla qualità della membrana sono numerosi quali, ad esempio, le caratteristiche di idrofilicità/idrofilità del polimero e delle zeoliti, la fluidità del polimero, ecc.

Sintesi idrotermale in situ: questo metodo è quello più comunemente usato per la preparazione di membrane composite inorganiche. La procedura di base prevede che la soluzione sintetizzata o il gel vengano messi in contatto con un supporto poroso. Successivamente bisogna lasciar crescere il film di zeolite sul supporto poroso in condizioni idrotermali. Questo metodo prevede sintesi cicliche.

Cristallizzazione secondaria: in questo metodo viene preparata per prima una sospensione di zeolite colloidale (generalmente si usano nanocristalli che viene usata per "inseminare" il supporto). Successivamente, tale supporto è sottoposto a sintesi idrotermale.

Microonde: questo metodo avviene in condizioni simili a quelle del convenzionale metodo idrotermale utilizzando, però una sorgente di microonde per il riscaldamento. La sintesi della soluzione può avvenire a partire da una temperatura ambiente fino a 100°C in un paio di minuti e l'uniformità della grandezza dei cristalli sulla superficie si ha dopo alcuni minuti. Il tempo di sintesi è quindi enormemente ridotto.

Layer-by-layer: differenti tecniche sono state sviluppate per sintetizzare le membrane zeolitiche multi-layer che sono caratterizzate dalla sovrapposizione successiva di film di

diversa composizione e/o struttura. Tali procedure, di recente ottimizzazione, permettono di ottenere:

- maggiori selettività di separazione (attraverso ripetute cristallizzazioni di uno più lo stesso tipo di zeolite);
- proprietà peculiari (dovute alla presenza di film tra loro differenti);
- nuove applicazioni^[Caro ,08] .

3.2.3.2 Fattori che influenzano la sintesi

Numerosi fattori possono influenzare la sintesi di membrane zeolitiche^[Tavolaro ,99] e i principali possono essere riassunti in due grandi gruppi:

- fattori correlati alla reazione;
- fattori correlati alla metodologia di sintesi.

Tra i fattori correlati alla reazione sono degni di nota invece:

- natura dei reagenti;
- natura dei supporti;
- alcalinità ($[\text{OH}^+]/[\text{H}_2\text{O}]$);
- diluizione;
- SAR ($[\text{SiO}_2]/[\text{Al}_2\text{O}_3]$);
- ($[\text{R}_2\text{O}]/[\text{Al}_2\text{O}_3]$), R_2O è il templante organico;
- ($[\text{OH}^-]/[\text{Al}_2\text{O}_3]$);
- ($[\text{M}^{++}\text{R}^+]/[\text{M}^+]$) dove R^+ = catione organico e M^+ = catione inorganico.

Tra i fattori correlati alla sintesi ricordiamo invece:

- temperatura di reazione;
- tempo di cristallizzazione;
- sol-gel, trasporto in fase vapore, ecc.;
- invecchiamento;
- agitazione;
- miscela di reagenti;
- insemminazione;
- pressione;
- natura dell'autoclave.

3.2.4 Sostituzione isomorfa nel reticolo cristallino

Barrer (1983-'84) definì quattro tipi di sostituzione isomorfa nelle zeoliti:

- la sostituzione di un elemento con uno dei suoi isotopi;

- la sostituzione di un catione con un altro (scambio ionico);
- la sostituzione di un elemento del reticolo cristallino con un altro (introduzione di un eteroatomo nelle cellule unitarie);
- la sostituzione di una molecola ospite con un'altra.

Il primo tipo di sostituzione è utilizzato nello studio della sintesi e della caratterizzazione delle zeoliti (Tavolaro, 2002).

Il secondo tipo di sostituzione è utilizzato per l'ottenimento di materiali adatti ad eliminare alcuni cationi dall'acqua e dalle soluzioni.

Possiamo prendere come esempio la silicalite-1: essa può essere considerata come una struttura regolare dove gli atomi di metallo (differenti da Si e Al) sopra una certa concentrazione possono essere introdotti in ordine per modificare le proprietà catalitiche. Il metallo introdotto può essere fortemente o debolmente legato alla struttura, può rimanere stabile (sostituzione isomorfa) o può dare un aumento delle particelle di ossidi metallici intrappolate nelle cavità.

Differenti tipi di sostituzione sono state fatte con metalli di transizione simili a titanio, gallio e germanio

3.2.5 Applicazioni delle membrane zeolitiche

Le membrane zeolitiche sono impiegate in numerosi campi (Tosheva ,05) come:

- catalisi;
- scambio ionico;
- sensori;
- trasformazioni chimiche nei reattori;
- processi di separazione (per vaporazione, separazione di gas);
- applicazioni mediche.

L'uso di membrane zeolitiche, in alcune applicazioni, è risultato più vantaggioso rispetto all'uso di membrane polimeriche. Questo è dovuto ad importanti proprietà delle membrane zeolitiche come: una vasta area superficiale, la resistenza meccanica, la resistenza termica (770 K), la stabilità in ambienti chimici e fisici aggressivi (ambienti a

pH acido).

La struttura chimica delle zeoliti può essere modificata per migliorarne le proprietà catalitiche, per variare la dimensione dei pori, per cambiare le caratteristiche di idrofilicità/idrofobicità.

3.2.5.1 Trasformazioni chimiche nei reattori

Nelle trasformazioni chimiche che si realizzano nei reattori le membrane zeolitiche possono agire da membrana attiva o passiva, sfruttando la capacità di rimuovere uno dei prodotti della reazione aumentando così la resa della reazione (Casanave, 1997).

Le membrane zeolitiche rendono anche possibile la coesistenza di due reazioni nello stesso reattore in quanto, separando le due reazioni, solo un componente può passare attraverso la membrana e fungere da reagente per la seconda reazione.

3.2.5.2 Processi di separazione

3.2.5.2.1 Separazione di gas

Determinare la permeabilità ai gas da parte delle membrane è un processo importante perché questa analisi permette di verificare la compattezza e la selettività delle membrane (Tavolaro, 99).

In generale, le membrane zeolitiche sintetizzate in presenza di un agente templante sono impermeabili ai gas poiché i canali sono completamente ostruiti.

Questa analisi permette di determinare la formazione di films discontinui o la presenza di cracks (pori tra i cristalli dell'ordine dei 5-100 nm) e crack pori (che hanno un'apertura dell'ordine dei 300-500 nm) (Geus 1989 e 1995).

Le membrane zeolitiche calcinate sono in genere caratterizzate attraverso la permeazione di gas inerti puri come N₂ o di piccoli idrocarburi come n-butano o isobutano.

Il flusso dei gas nelle membrane è proporzionale alla concentrazione di molecole assorbite nei pori delle zeoliti e alla loro costante di diffusione.

A basse temperature ed ad alte pressioni, in presenza di molecole adsorbite, i pori delle zeoliti sono interamente riempiti da specie fluide.

Aumentando la temperatura, la costante di diffusione aumenta ma la concentrazione di molecole adsorbite diminuisce, questo provoca un aumento del flusso attraverso la membrana.

La temperatura, alla quale si può avere il massimo flusso attraverso la membrana, dipende dalla pressione parziale e dalle proprietà di diffusione e di assorbimento della molecola di gas.

L'assorbimento di n-idrocarburi aumenta con l'aumentare del numero di atomi di carbonio, e il flusso massimo si ottiene a temperature più elevate per molecole più pesanti (Tavolaro,1999).

Le membrane zeolitiche risultano migliori per la separazione di gas rispetto alle membrane polimeriche, essendo queste ultime inadeguate per solventi organici e per gli idrocarburi (Koresh ,1983)].

3.2.5.2.2 Pervaporazione

La pervaporazione è un processo a membrana a bassa pressione e temperatura che permette la separazione di miscele liquide tramite una parziale vaporizzazione attraverso una membrana non porosa e selettivamente permeabile.

Nei processi di pervaporazione, l'alimentazione (fase I), in fase liquida, viene portata a contatto con un lato della membrana ed il permeato (fase II), in fase vapore, viene rimosso dall'altro lato della membrana mediante una pompa da vuoto, una corrente di gas inerte o una corrente di liquido inerte che può assorbire il permeato.

Nella pervaporazione con membrane polimeriche, il trasferimento di massa dei permeati si realizza in tre fasi successive secondo il modello soluzione-diffusione:

- adsorbimento delle molecole sulla superficie della membrana dal lato dell'alimentazione;
- diffusione dei permeati attraverso la membrana;
- desorbimento dei permeati in fase vapore dal lato di permeazione della membrana.

La pervaporazione è un processo chiave per ridurre drasticamente i costi per la separazione di miscele azeotropiche, di isomeri strutturali, di composti organici (benzene/etanolo).

I vantaggi del processo di pervaporazione sono:

- il solvente può essere disidratato fino ad un contenuto di acqua inferiore allo 0,1%;
- superamento dei limiti fissati dalla presenza di azeotropi;
- le membrane sono altamente selettive ed offrono un elevato flusso anche ad elevate temperature e a temperatura ambiente;
- l'acqua prodotta è caratterizzata da un elevato grado di purezza;
- è un processo a bassa energia.

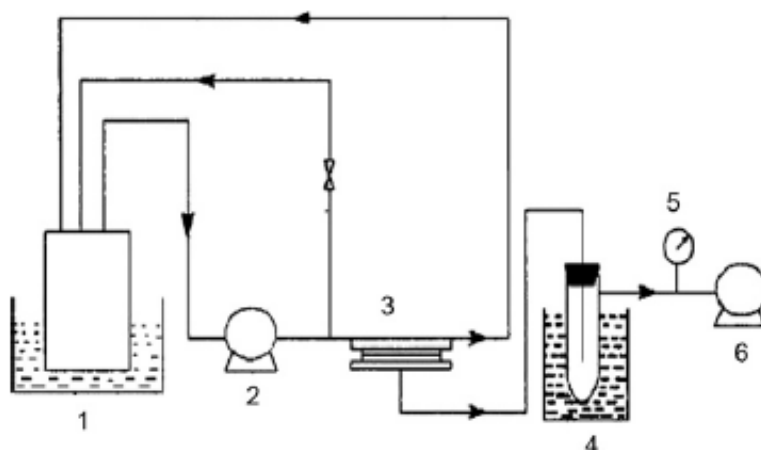


Fig. 3.2.5.2.2 Schema pervaporazione [Liu ,08]: (1) Feed flask, (2) transporting pump, (3) pervaporation pool, (4) cold trap, (5) vacuum meter, (6) vacuum pump

Membrane zeolitiche di NaY sono state utilizzate per rimuovere liquidi organici dall'acqua in particolare nella separazione di acqua/metanolo (metanolo-t-butil-etero) o di acqua/etanolo (Kita ,1996).

Membrane zeolitiche ZSM-5 sono state utilizzate nella separazione di acqua/isopropil alcol (IPA) (Kittur, 2004).

3.2.5.3 Applicazioni biomediche

Le membrane zeolitiche negli ultimi anni sono state oggetto di studio come nuovi biomateriali utilizzati per applicazioni mediche.

Queste membrane, infatti, sono considerate come un supporto ideale per l'immobilizzazione di molecole biologiche e non hanno le limitazioni associate alle tradizionali membrane polimeriche (Tavolaro, 2006).

Un'importante caratteristica delle membrane zeolitiche è che la natura basica/acida del

materiale può essere modificata variando il rapporto Si/Al o introducendo metalli differenti (Me) nella struttura cristallina e cambiando il rapporto Si/Me (Tavolaro, 2007).

Numerose molecole biologiche vengono adsorbite e immobilizzate dalle membrane zeolitiche. Tra queste ricordiamo: citocromo c, BSA (bovine serum albumin), glucosio, tossine uremiche, nitrosammine e altri numerosi enzimi e proteine.

Il *citocromo c* è un carrier di elettroni solubile in acqua. Esso è immobilizzato in modo efficiente dalle membrane zeolitiche. Questa efficienza, però, dipende dalle caratteristiche proprie della membrana.

Sebbene l'interazioni del citocromo c con il supporto, probabilmente, avvenga solo sulla superficie esterna, la composizione della membrana è un importante fattore che influenza la performance di immobilizzazione. Considerando quindi che il citocromo c mostra una buona stabilità con il supporto, l'applicazione di membrane zeolitiche come supporti in applicazioni biotecnologiche sembra un'ipotesi promettente.

La BSA viene adsorbita in cristalli di zeolite sintetizzati in condizioni idrotermali. Alcuni esempi di strutture zeolitiche utilizzate per l'adsorbimento sono FAU, BEA e MFI. Inoltre, è stata modulata l'acidità di superficie della struttura MFI, dove gli atomi di alluminio e vanadio sono stati incorporati nella struttura cristallina e i rapporti Si/Al, Si/V e Al/V sono stati variati per cambiare la composizione chimica dei gel precursori della reazione.

Questi studi hanno rivelato che la composizione chimica e la struttura delle membrane zeolitiche influenza la cinetica di adsorbimento delle proteine.

La superficie della zeolite Y assorbe grandi quantità di BSA. Questa percentuale di adsorbimento aumenta con la temperatura e dipende dal pH della soluzione, essendo massimo al pI della proteina.

La differenza di adsorbimento tra i vari tipi di zeolite dipende anche dal tipo di cristallizzazione idrotermale all'interno del supporto inorganico (Tavolaro, 2007).

Per quanto riguarda il *glucosio* è stato osservato che una nuova zeolite, detta Fz, particolarmente attiva nell'adsorbimento di glucosio in vitro.

FZ è stata ottenuta in seguito a trasformazioni idrotermali usando soluzioni di USP XIII Solfato di Ferro (FeSO_4) con controlli di T, concentrazione e pH.

Questa forma di zeolite è caratterizzata dalla presenza del ferro con n° di ossidazione +2 e questo è molto importante per l'adsorbimento del Glucosio.

Infatti il Fe^{3+} che si forma in seguito a lavaggi con acidi o basi forti (NaOH, HCl e OPAZ), porta ad una diminuzione dell'adsorbimento di glucosio

Questa scoperta è molto importante per ulteriori studi rivolti alla cura del diabete mellito, cioè al controllo dei livelli di glucosio nel sangue (Rosabal,1997).

Vi sono poi alcuni studi rivolti a rimuovere il p-cresolo dalle soluzioni acquose a 37° C con l'obiettivo di trovare un metodo alternativo di dialisi per rimuovere le tossine uremiche dal sangue nei casi di uremia. Questa è una sindrome in cui il rene umano non riesce più a purificare il sangue dai prodotti del metabolismo.

Tra i differenti tipi di membrane zeolitiche la MFI è quella che ha una maggiore affinità con il p-cresolo (Bergè-Lefranc,2008).

3.2.6 Metodi di caratterizzazione delle membrane

Numerose tecniche sono utilizzate per la caratterizzazione di membrane zeolitiche. Tra le più comunemente usate la diffrazione ai raggi X (XRD) è indispensabile per identificare il tipo di zeolite formata nella sintesi, la cristallinità percentuale e per l'eventuale formazione di miscele cristalline; l'analisi XRD pole-figure permette di determinare l'orientamento dei cristalli di zeolite nella membrana.

Un'altra tecnica è la microscopia elettronica a scansione (SEM). Essa può essere usata per analizzare la forma, la dimensione dei cristalli e la loro distribuzione sul supporto. Essa può anche permettere di misurare lo spessore della membrana e di evidenziare le eventuali fessurazioni presenti tra i cristalli.

Tecniche di analisi di superficie come la microanalisi sonda-elettrone (EDX) o spettroscopia fotoelettronica a raggi-X (XPS) possono essere usate per misurare la concentrazione di Si e di Al all'interno della membrana.

Specifiche misurazioni di permeazioni, o di singoli gas o di miscele multicomponenti, danno utili informazioni sull'effettiva struttura dei pori della membrana e sull'esistenza di difetti tra i cristalli. Una serie di esperimenti di permeazione con singoli gas, usando molecole con differenti cinetiche, possono essere usati per determinare l'effettiva dimensione dei pori nelle membrane prive di difetti. In alternativa, la selettività dei pori, combinata alle misurazioni di permeazione, può essere usata per valutare i difetti.

Vi sono poi altre tecniche come ICP, microscopia elettronica a trasmissione (TEM),

spettroscopia infrarossa (IR):

- ICP è una tecnica di analisi ad alta risoluzione che serve ad identificare la composizione chimica dei materiali;
- Microscopio elettronico a trasmissione (TEM) è una tecnica che serve per evidenziare la presenza di nanocristalli;
- Spettroscopia Infrarossi (IR) è una tecnica spettroscopica che utilizza raggi infrarossi e serve per evidenziare i gruppi funzionali delle molecole di cui è composta la membrana per determinare così la composizione chimica. Ogni gruppo funzionale può essere evidenziato ad una precisa lunghezza d'onda.

3.3 LE MEMBRANE POLIMERICHE

3.3.1 Generalità

Le membrane organiche possono essere classificate secondo diversi criteri, come la natura del materiale polimerico (naturale o sintetico), la struttura (simmetrica, asimmetrica, porosa, densa, ecc.), la configurazione (piana o tubolare), il meccanismo attraverso il quale avviene la separazione (carica, dimensione e forma delle specie permeanti) o le loro proprietà chimico-fisiche. In particolare, le proprietà di una membrana sono legate alla natura chimica del polimero costituente ed alla sua struttura. In generale, per le membrane porose ha meno importanza la scelta del materiale polimerico riveste una minore importanza poiché le caratteristiche di separazione dipendono dalla dimensione e dalla distribuzione dei pori. Al contrario, per le membrane dense la scelta del polimero è determinante per l'ottenimento di specifiche proprietà termiche e chimiche che ne influenzano performance e selettività del flusso.

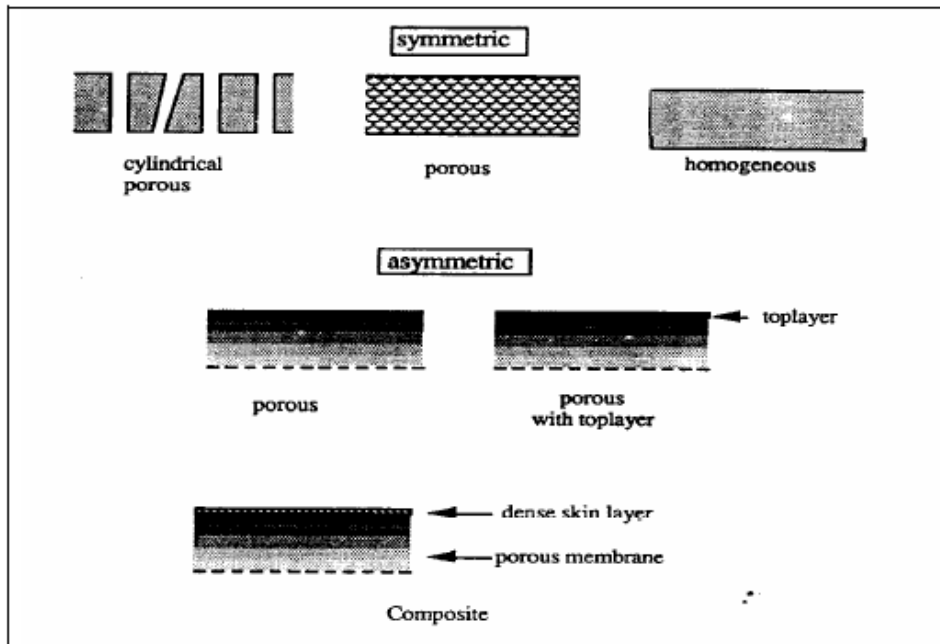


Figura 3.3.1.a Membrane polimeriche

Tra le membrane è possibile distinguere quelle simmetriche o isotropiche da quelle asimmetriche o anisotropiche. Sono usualmente definite simmetriche le membrane che presentano una struttura interna omogenea in tutte le sue parti che si ripete lungo lo spessore della membrana stessa. Un esempio di questa struttura è dato dalle membrane utilizzate per la dialisi o per la microfiltrazione. In questo caso la loro selettività dipende dal diametro medio dei pori.

Le membrane asimmetriche sono, invece, formate da uno strato più denso e più sottile (0,1-2,0 μm) supportato da una parte, porosa che può essere spessa anche 200 μm . Lo strato sottile rappresenta la vera membrana le cui proprietà sono determinate dalla natura del polimero e dalle condizioni di preparazione della membrana. Il trasporto di materia è inversamente proporzionale allo spessore di tale strato. Il sottostrato poroso ha soprattutto una funzione di sostegno meccanico per la sottile barriera polimerica ed influenza poco o per nulla la selettività della membrana ed il trasporto di materia.

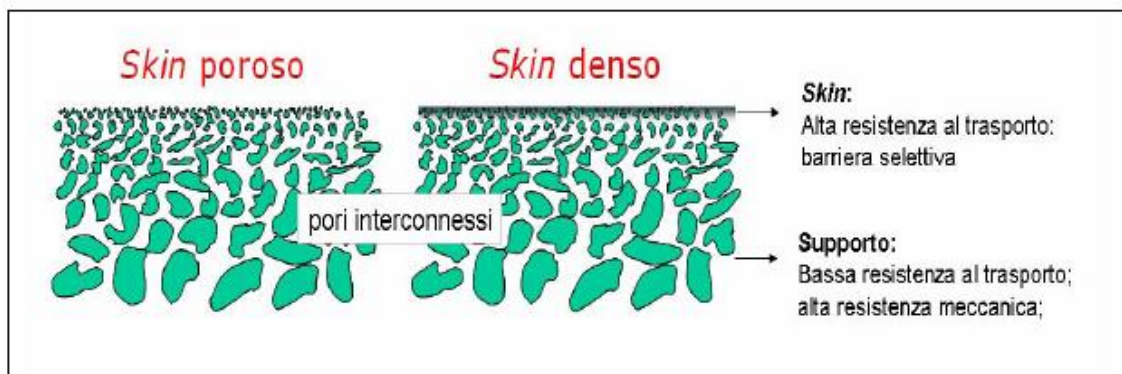


Figura 3.3.1.b

3.3.2 Principali tecniche di preparazione delle membrane polimeriche

La struttura di una membrana polimerica è fortemente legata alle sue modalità di preparazione. Sono, infatti, numerose le tecniche utilizzate per la preparazione di membrane sintetiche che vengono qui di seguito descritte.

Estrusione

L'estrusione è la tecnica più semplice e veloce per preparare membrane polimeriche dense. Il polimero viene riscaldato in un estrusore e poi ad alta pressione estruso in forma di un film piano (attraverso una scanalatura sottile) o di una fibra cava (attraverso un'apertura anulare).

Lo spessore dello strato polimerico dipende dalla configurazione della testa di estrusione.

Nel caso delle fibre cave l'immissione di aria impedisce il collasso o aumenta il diametro delle fibre.

Non è facile ottenere film con uno spessore inferiore a qualche decina di micron.

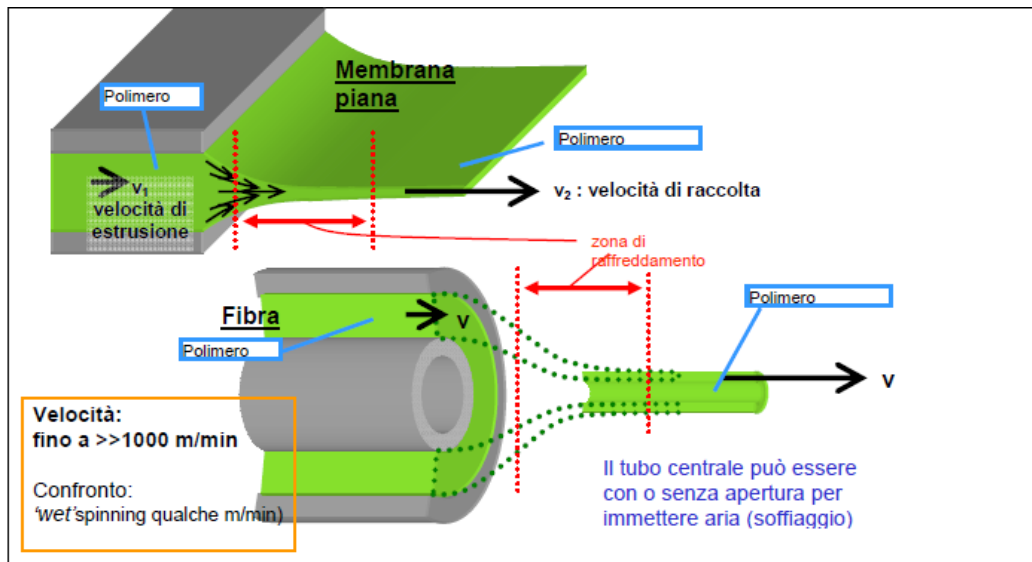


Figura 3.3.2.a Processo di estrusione.

Durante l'estrusione si può verificare una notevole orientazione delle catene polimeriche a causa della forte *elongational shear* (Figura 3.2.3.b). In membrane amorphe questa orientazione generalmente aumenta la selettività delle membrane. In membrane semicristalline l'effetto viene offuscato dalla cristallizzazione.

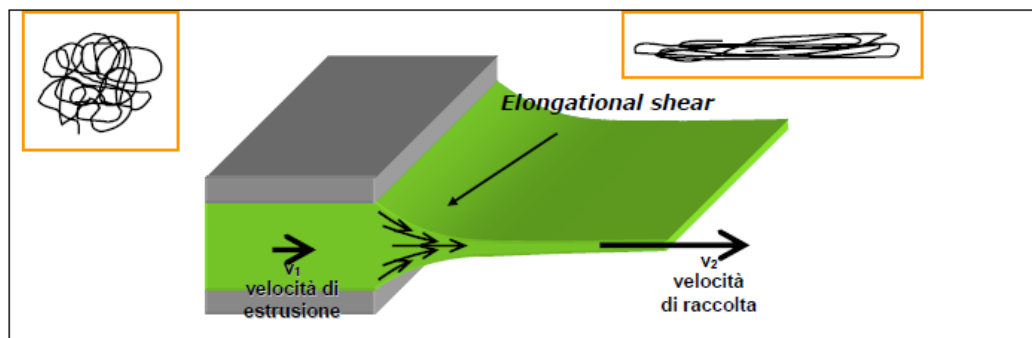


Figura 3.3.2.b

Polimerizzazione interfacciale

Questo metodo permette di creare uno strato sottile su un supporto poroso. Con questa tecnica si ottiene di solito una reazione di polimerizzazione tra due monomeri, particolarmente reattivi, all'interfaccia di due solventi immiscibili. Il supporto poroso

viene prima immerso in una soluzione acquosa, contenente di solito un'ammina, per poi essere successivamente immerso in un bagno di un solvente immiscibile con l'acqua, contenente spesso un cloruro acido. I due monomeri reagendo tra di loro formano lo strato superficiale denso. Si arriva così alla formazione di una membrana composita, formata dallo strato denso e dal supporto poroso. Il meccanismo di formazione è schematizzato nella Figura 3.3.2.c.

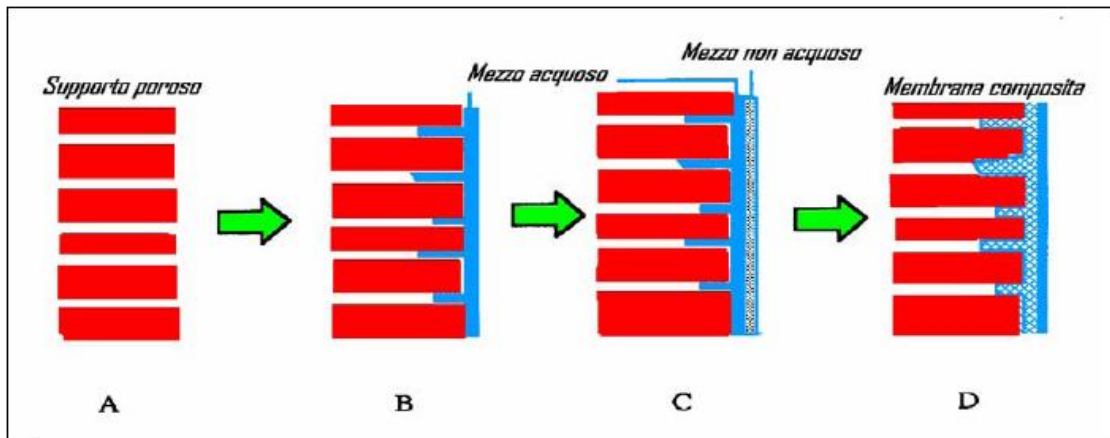


Figura 3.3.2.c

Sinterizzazione

La tecnica di sinterizzazione permette di ottenere membrane porose sia da polveri organiche che inorganiche. Per quanto concerne la preparazione delle matrici polimeriche, una polvere del materiale scelto (polietilene, polipropilene, teflon – PTFE – ecc.) con particelle di adatte dimensioni, viene pressata e sinterizzata ad alta temperatura. Questa tecnica consiste, pertanto, nel compattare ad elevate temperature i granuli costituenti il materiale in modo da saldarli gli uni agli altri formando così la membrana. Il valore della temperatura varia a secondo del materiale utilizzato. La porosità è determinata dal diametro delle particelle e dalla distribuzione delle loro dimensioni. Con questo metodo si ottengono generalmente dei pori delle dimensioni comprese tra 0,01 e 10 μm .

Stiramento

Un metodo semplice per la preparazione di membrane microporose è quello per stiramento di un film polimerico. Il materiale polimerico viene stirato

perpendicolarmente alla direzione di estrusione, in modo da orientare le regioni cristalline parallelamente alla direzione di estrusione. In seguito all'applicazione di una forza meccanica si ha la formazione di microcavità, caratterizzate da un diametro di 0,1-0,5 μm a seconda del materiale utilizzato. Questa tecnica permette il raggiungimento di elevati gradi di porosità (addirittura del 90%).

Track-etching

Il track-etching permette di ottenere membrane con una distribuzione di pori molto regolare, paralleli tra di loro e aventi una forma cilindrica.. I pori sono uniformi ed attraversano da un lato all'altro l'intero spessore della membrana. Il metodo di preparazione consiste nell'irraggiamento di un film polimerico con radiazioni corpuscolari ad alta energia (ad esempio particelle α). Le particelle danneggiano la matrice polimerica in seguito alla rottura di legami chimici creando delle incisioni. Il film viene successivamente immerso in un bagno acido o alcalino. Si rimuove così il materiale polimerico danneggiato e si ha la formazione dei pori cilindrici uniformi con un diametro compreso tra 0,02-10 μm . Il grado di porosità con questa procedura è estremamente basso (non superiore al 10%) e viene influenzata principalmente dal tempo di irraggiamento.

Coating

Il coating è il principale metodo utilizzato per la preparazione di membrane composite. Attraverso le membrane dense il trasporto avviene con un flusso molto lento. Per alcune è necessario ridurre il più possibile il passaggio di sostanze attraverso il loro spessore. Questo scopo può essere conseguito con la preparazione di matrici composite. Tali membrane sono formate da due differenti materiali, di cui uno molto selettivo depositato sulla superficie esterna, mentre l'altro non selettivo viene generalmente impiegato come supporto poroso. *Le membrane preparate con questa tecnica* vengono utilizzate, ad esempio, nell'osmosi inversa, per la separazione dei gas, nella pervaporazione e per il rilascio controllato.

Nella Figura 3.1.1.6 è riportato il procedimento del *dip-coating*. La membrana viene prima immersa nella soluzione di coating contenente il polimero, a bassa concentrazione, di solito intorno all'1-2%. Successivamente viene tenuta nel bagno polimerico per alcuni secondi per poi essere allontanata. Durante il suo allontanamento

si ha il drenaggio della soluzione di coating e, in seguito, la successiva evaporazione del solvente.

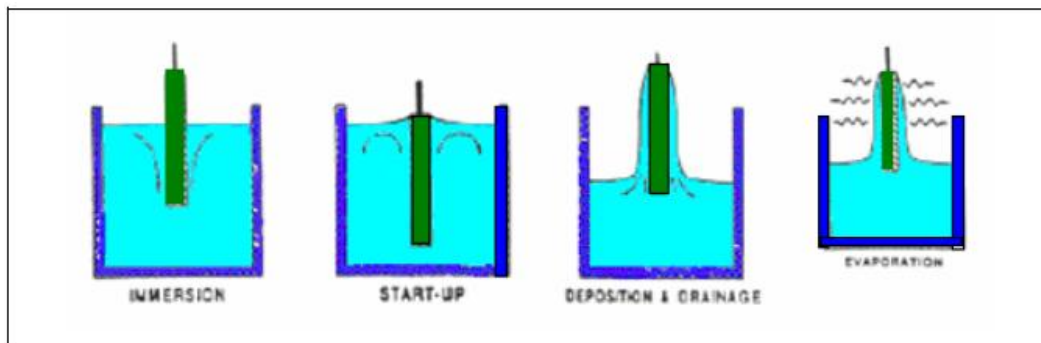


Figura 3.3.2.d

Lo spessore della membrana formatasi dipende da diversi fattori, tra cui:

- 1) viscosità e concentrazione della soluzione di coating;
- 2) velocità di prelievo del supporto (che a sua volta determina il tempo a disposizione del sol di fluire);
- 3) velocità di evaporazione del solvente.

Fin qui sono state esaminate le tecniche di preparazione che portano alla formazione di un solo tipo di membrane porose con la sinterizzazione, lo stiramento ed il track-etching e dense in superficie con il dip-coated. Saranno ora osservati i procedimenti utilizzati nell'inversione di fase, metodologia che permette di ottenere sia membrane porose che dense.

Evaporazione del solvente

Questa è la tecnica più semplice per la preparazione di membrane tramite l'inversione di fase. Con questo metodo il polimero viene dissolto in un opportuno solvente e, dopo l'ottenimento di una soluzione omogenea, la miscela viene spalmata su un apposito supporto, come per esempio una lastra di vetro. Il solvente viene poi lasciato evaporare in un'atmosfera inerte, tenendo lontana la soluzione spalmata da vapori che potrebbero indurre la precipitazione del polimero, e si ottiene così una membrana densa ed omogenea (Figura 3.1.1.7).

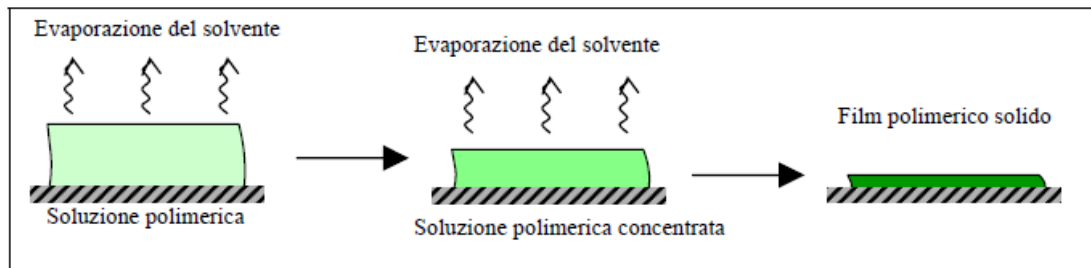


Figura 3.3.2.e

Precipitazione indotta da vapore

La soluzione di casting, dopo essere spalmata su un opportuno supporto, viene messa in un'atmosfera di vapore di un opportuno nonsolvente per il polimero, spesso l'acqua, e miscibile con il solvente usato.

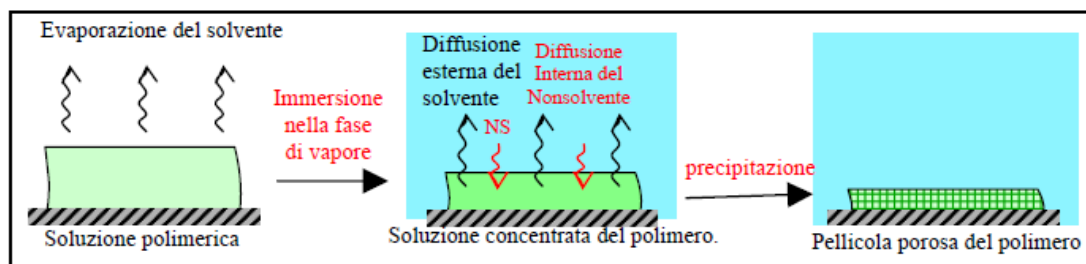


Figura 3.3.2.f

Un'elevata concentrazione di solvente nella fase di vapore potrebbe prevenire l'evaporazione del solvente stesso dalla soluzione spalmata. La membrana si forma grazie alla penetrazione del nonsolvente nel film polimerico (Figura 1.8). Lo scambio tra solvente e nonsolvente determina la precipitazione del polimero e la formazione della membrana. Si ottengono così membrane porose simmetriche (Figura 3.1.1.8).

Inversione di fase

L'inversione di fase è un processo attraverso il quale il polimero viene trasformato da una forma liquida ad una forma solida. Il processo di transizione inizia da uno stato liquido e procede con un equilibrio, tra la precedente fase liquida ed il liquido detto di smiscelamento, per concludersi con una fase solida: la membrana.

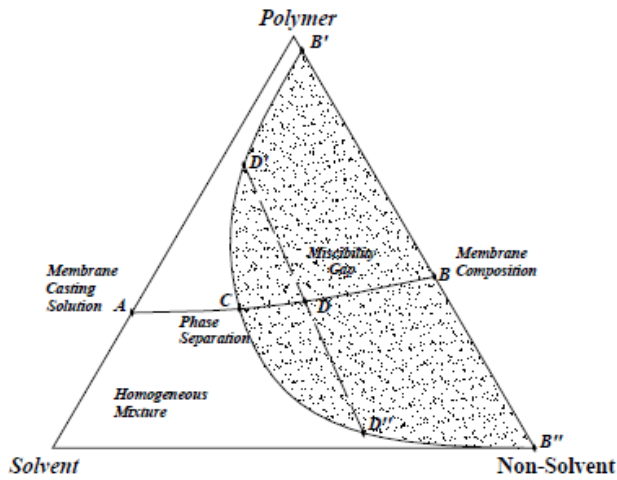


Figura 3.3.2.g Schema rappresentativo dell'inversione di fase

3.4 L'Acido polilattico (PLA)

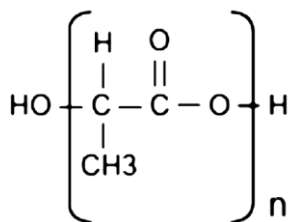


Figura 3.4.a Struttura del PLA

Il PLA è oggi considerato il biomateriale polimerico per eccellenza oltre ad essere il miglior candidato per la sostituzione di polimeri termoplastici da fonte petrolchimica (per alcune applicazioni).

Per anni l'elevato prezzo di produzione ha lungamente limitato l'uso di questo materiale ad applicazioni di nicchia o medicali, ma le recenti innovazioni nella tecnologia di fermentazione dell'acido lattico permettono di ottenere grandi quantità di PLA a minore costo.

Importante notare che questo materiale non è biodegradabile come gli altri biopolimeri, ma è necessario che la biodegradazione venga innescata attraverso il fenomeno dell'idrolisi.

Il peso molecolare, la struttura macromolecolare ed il grado di cristallizzazione del PLA variano sostanzialmente a seconda della reazione insita nel metodo di polimerizzazione. Delle tre forme isomeriche possibili, il poli(acido L-lattico) e poli (acido D-lattico) sono entrambe semi-cristalline in natura, mentre il poli (acido D,L- lattico) è amorfo.

Con l'aumento del peso molecolare del PLA (come in generale per i polimeri), si ha una diminuzione dell'elasticità dovuta alla diminuzione del movimento relativo delle catene che diventano più lunghe. In più, aumenta la resistenza ai solventi, il punto di fusione (T_m) e la temperatura di transizione vetrosa (T_g).

La viscosità del fuso aumenta, di conseguenza diminuisce la facilità di lavorazione (stampaggio, estrusione, ecc...).

La densità del PLA (1.25 g/cm^3) è più bassa di quella del PET (1.34 g/cm^3), ma superiore a quella dell'HIPS (1.05 g/cm^3) e ad altri polimeri convenzionali che hanno densità compresa tra 0.8 - 1.1 (es. PP $0,9 \text{ g/cm}^3$ o PE $0,93 \text{ g/cm}^3$). Il PLA è trasparente ed ha elevata lucentezza e bassa opacità. Le proprietà ottiche del PLA sono sensibili agli additivi aggiunti ed agli effetti della lavorazione.

Il PLA può essere facilmente trasformato in prodotti utili per mediante termoformatura, stampaggio ad iniezione, soffiaggio, estrusione film. Film o contenitori rigidi termoformati sono le applicazioni di grosso volume più promettenti. Una parte viene anche utilizzata nel settore del tessile.

3.4.1 Preparazione del PLA

Il primo stadio nel processo di preparazione consiste nell'estrazione dell'amido dalla biomassa. Esso inizia tipicamente dalla macinazione del mais. L'amido viene quindi convertito in zucchero tramite idrolisi enzimatica o acida. Dopo aver ottenuto lo zucchero, questo viene fatto fermentare per mezzo di batteri. Attraverso un processo continuo o discontinuo. L'acido lattico deve essere separato dalla miscela che si è formata durante la fermentazione e nella maggior parte dei casi deve essere purificato prima di essere polimerizzato.

3.4.2 Proprietà meccaniche

Il PLA ha buone proprietà meccaniche, rispetto a quelle dei materiali che sono termoplastici standard. Esso ha bassa resistenza all'urto, paragonabile al PVC non-plasticato, mentre durezza, rigidità, resistenza all'urto ed elasticità del PLA, che sono riportate nella tabella 3.2.2, sono importanti per le applicazioni quali i contenitori per bevande, sono simili a quelli del PET. Il film orientato di PLA (piegato o ripiegato), ha buona resistenza alla torsione, proprietà appartenente, generalmente, alla carta e alla stagnola e che solitamente nei film in materiale plastico. Queste proprietà, l'alto modulo a flessione e l'elevata trasparenza, fanno del film di PLA un materiale paragonabile al film di cellofane.

	Materiale da estrusione	Materiale da iniezione
Proprietà Meccaniche		
Resistenza a trazione, snervamento (MPa)	53 - 54	48 - 50
Allungamento a trazione, snervamento (%)	6	2 - 3
Modulo E (MPa)	3400 - 3500	3800
Proprietà Termiche		
Punto di fusione (°C)	160 - 170	160 - 170
Temperatura di rammollimento Vicat (°C)		55
Proprietà fisico - chimiche		
Densità	1,2 - 1,3	1,2 - 1,3

Tabella 3.4.2.a Proprietà meccaniche PLA

3.4.3 Proprietà termiche

Il PLA ha una temperatura di transizione vetrosa relativamente bassa (~ 60 °C) e degrada rapidamente al di sopra questa temperatura in condizioni di umidità elevata. A causa della bassa temperatura di rammollimento Vicat, il PLA, a differenza del PET, non è adatto a contenere liquidi (o altro) caldi. D'altra parte, la bassa temperatura di inflessione sotto carico (HDT) del PLA e la buona resistenza alla saldatura a caldo forniscono buone prestazioni per la giunzione tra pellicola e vaschetta.

CAPITOLO 4

LE METALLOPROTEASI (MMP)

4.1 Classificazione delle MMP

Le metalloproteasi (MMP) sono proteine enzimatiche zinco-dipendenti coinvolte nel processo di degradazione della matrice extracellulare (Catania *et al.*, 2007). Sono state identificate 24 diverse metalloproteasi, classificate in 6 gruppi sulla base della loro sequenza amminoacidica e dei substrati con i quali interagiscono (classificazione riportata in Tabella 4.1.a). Le MMP vengono prodotte dalla cellula come precursori (proMMP) e, dopo esocitosi, sono attivate nel comparto extracellulare, solo alcune di esse sono attivate a livello intracellulare (Visse *et al.*, 2003). La loro espressione è regolata da diversi mediatori infiammatori: citochine (IL 5), fattori di crescita (TGF β 1) e dall'azione degli inibitori tissutali della metalloproteasi (TIMP 1, 2, 3) (Inkinen *et al.*, 2005).

COLLAGENASI (MMP 1, 8, 13, 18)	Attività collagenolitica su collagene tipo I, II e III
GELATINASI (MMP 2, 9)	Attività collagenolitica, degradazione di laminina, gelatina e fibronectina. Responsabili dell'attivazione di molte citochine e di altre MMP
STROMALISINE (MMP 3, 10)	Degradazione di collagene, fibronectina, laminina, gelatina, caseina e altre MMP
MATRILISINE (MMP 7, 26)	Responsabili della degradazione di diversi componenti della matrice ma anche di molecole di superficie come l'E-caderina
MEMBRANE-TYPE METALLOPROTEASI (MMP 14, 15, 16, 17, 24, 25 anche	Proteine transmembranarie coinvolte nel meccanismo di attivazione di altre MMP

chiamate MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6MMP)	
ALTRE MMP (MMP 11, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 28)	Difficile classificazione, tipicamente espresse in un singolo tessuto oppure in particolari condizioni

Tabella 4.1.a Classificazione delle metalloproteasi

Le MMP-9, facenti parte della classe delle gelatinasi, hanno come funzione primaria quella di degradare le proteine della matrice extracellulare per permetterne il rinnovo (turn-over), necessario a seguito dell'invecchiamento dei vari componenti, svolgendo così un fondamentale ruolo strutturale. Normalmente questi enzimi (così come tutte le metalloproteasi) sono già presenti nella matrice ma in forma inattiva in quanto legate ad una sostanza: l'inibitore delle metalloproteasi (TIMP). Quando questo fattore si stacca le MMP entrano in azione passando dallo stato inattivo a quello attivo. Questo meccanismo è di un'importanza cruciale, dal momento che permette di avere un pool di enzimi già pronti all'uso che devono solo essere attivati e che non devono quindi essere sintetizzati ex-novo ogni volta che sono necessari. Ogni alterazione di questo equilibrio può avere conseguenze a livello tissutale e sistemico. Le MMP attivate possono digerire proteoliticamente elastina, fibrillina, laminina, la gelatina (collagene denaturato) e collagene di tipo IV, V, XI e XVI e, infine, attivare specifici fattori di crescita. Dopo la lisi le MMP tornano a legarsi ai TIMP e stazionano nuovamente in uno stato di inattività, processo che non avviene nelle cellule tumorali. Purtroppo, non sono ancora disponibili i dati cristallografici della MMP-9; tuttavia, utilizzando opportuni programmi di calcolo, è stato possibile ottenere una loro plausibile struttura, sfruttando l'omologia con altre proteine note, come ad esempio le MMP-2.

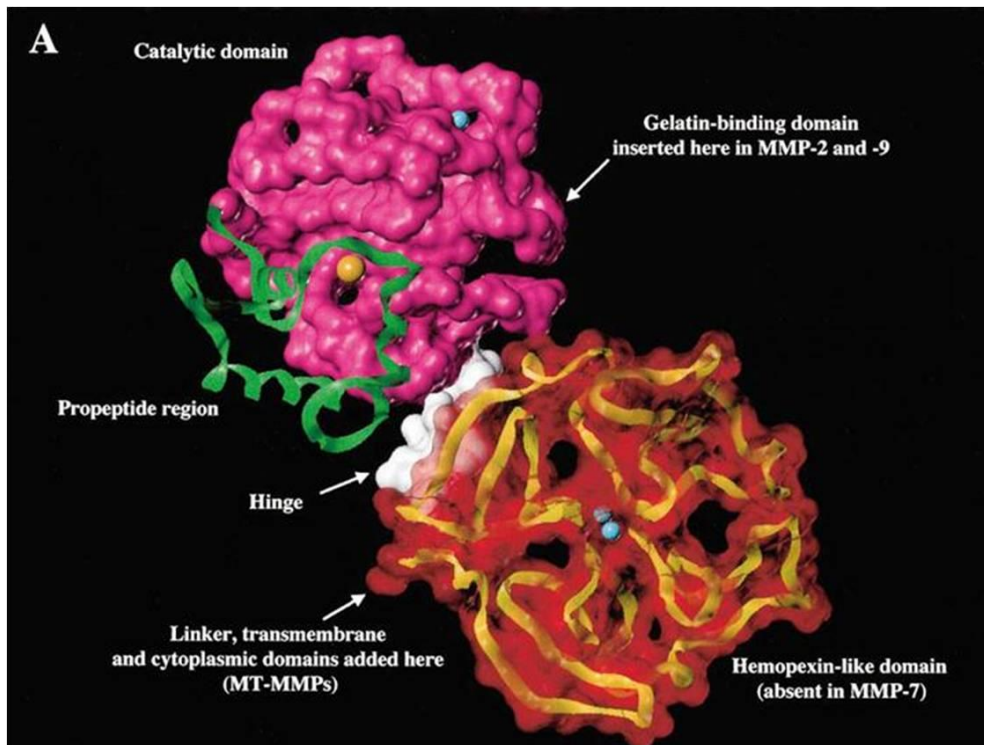


Figura 4.1.a Struttura delle metalloproteasi. Forma inattiva.

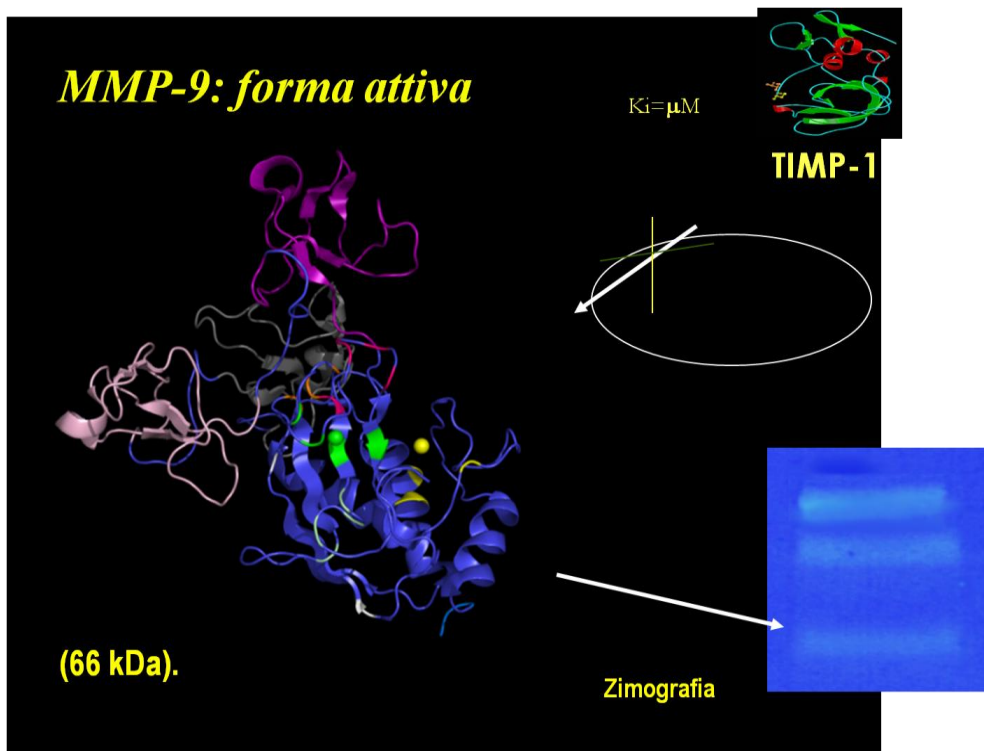


Figura 4.1.b Struttura delle metalloproteasi. Forma attiva.

Le MMP entrano in gioco anche nella **migrazione cellulare**. La migrazione è un meccanismo sofisticato che richiede la regolazione simultanea sia delle interazioni cellula-cellula che di quelle cellula-matrice. L'attività proteolitica delle MMP favorisce la rimozione dei siti di adesione delle cellule alla matrice e alla membrana basale, oppure altera i dispositivi giunzionali, portando alla migrazione cellulare.

Come nella proliferazione, anche in questo caso l'azione delle MMPs è duplice. Esse, infatti, possono agire anche in maniera diretta: MMP-7 è in grado di scindere la β -integrina e MMP-3 e 7 scindono invece l'E-caderina (McCawley *et al.*, 2001). La migrazione ha spesso inizio come risposta ad uno stimolo chemotattico. Anche in questo senso, le MMP assumono un'importanza chiave, essendo capaci di generare stimoli chemotattici, come nel caso del rilascio MMP-9 dipendente di *vascular endothelial growth factor* (VEGF), coinvolto nello sviluppo delle ossa lunghe, o al contrario di sopprimerli, ad esempio MMP-2 scinde e inattiva *monocyte chemoattractant protein* (MCP-3), diminuendo la chemiotassi e la risposta infiammatoria (McCawley *et al.*, 2001).

Un ulteriore ruolo attribuito alle MMPs è la **comunicazione intercellulare**: esse consentono il rilascio di fattori che agiscono per via paracrina, influenzando il comportamento delle diverse tipologie cellulari. La mediazione delle MMPs nella comunicazione intercellulare è stata dimostrata sia durante la risposta infiammatoria sia nell'interazione con cellule procariote. Per citare un esempio di quest'ultimo caso, l'espressione di MMP-7 a livello delle cellule di Paneth nell'intestino tenue innesca l'attivazione di pro- α -difensine, coinvolte nella risposta immunitaria innata che porta alla distruzione dei batteri.

Le MMPs svolgono un'azione modulante anche sulle **patologie tumorali**, tramite il controllo della sopravvivenza e proliferazione cellulare. In numerosi studi su modelli murini, l'eliminazione di una singola MMP attenua la progressione tumorale negli stadi precoci e comunque prima dello sviluppo delle metastasi. Ad oggi non ci sono dati sufficienti per dimostrare che l'eliminazione di una singola MMP riduca l'invasione tumorale e le metastasi. Un'eccezione a ciò è stata individuata nella MMP-2: la sua completa eliminazione, infatti, riduce la colonizzazione delle cellule carcinomatose polmonari di Lewis dopo iniezione intravenosa. Probabilmente è l'inibizione di più classi di proteasi a incidere sulla progressione di tumori in stadi avanzati: così infatti

avviene nel processo di guarigione delle ferite, completamente impedito dall'inibizione combinata di MMP e plasmina.

4.2 Struttura e attivazione

Una tipica metalloproteasi è costituita da un prodominio di circa 80 aminoacidi, un sito catalitico di circa 170 residui aminoacidici, un peptide linker di lunghezza variabile (detto *hinge region*) ed un dominio *hemopexin-like* di circa 200 aminoacidi. La proteina una volta sintetizzata viene secreta nella sua forma inattiva (pro-MMP), nella quale l'atomo di zinco, presente nel sito catalitico, non è disponibile alla formazione di legami a causa della presenza di una cisteina. L'attivazione avviene in un secondo tempo e deriva dall'esposizione del sito catalitico, che può interagire con i substrati. L'attivazione può essere di due tipi: enzimatica o non enzimatica. In particolare, quella enzimatica avviene per azione di enzimi proteolitici e spesso di altre MMPs.

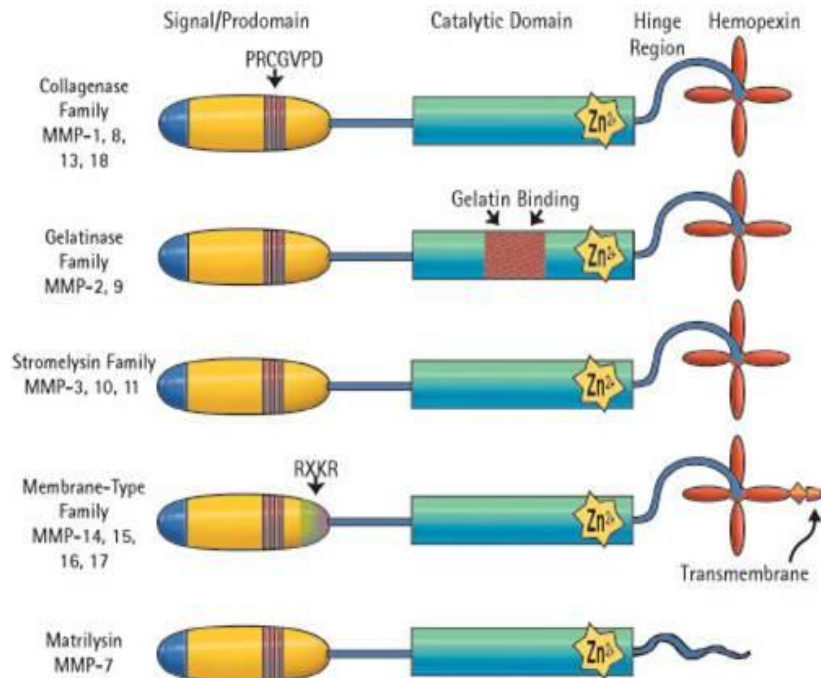


Figura 4.2.a Struttura delle metalloproteasi.

4.3 Attivazione di MMP-2 e MMP-9

4.3.1 MMP-2

Per MMP-2 è stata osservata una particolare via di attivazione. L'attivazione avviene nello spazio extracellulare a livello della superficie cellulare e richiede l'assistenza di una molecola di TIMP-2 e due molecole di MMP-14 (o MT1 MMP). Come si è detto, MMP-14 è una molecola transmembranaria, attivata dall'interazione con la membrana cellulare e capace di formare dimeri o polimeri sulla superficie cellulare attraverso l'interazione dei domini *hemopexin-like*. Nel processo di attivazione di MMP-2, una molecola di MMP-14 attivata si lega ad una molecola di TIMP-2 che la inibisce. La pro-MMP-2 si lega quindi al neformato complesso MMP-14/ TIMP-2 e, tramite l'azione di una seconda MMP-14 (libera dal legame con il TIMP-2), la cisteina viene scissa e l'enzima attivato (Figura 4.3.1.a).

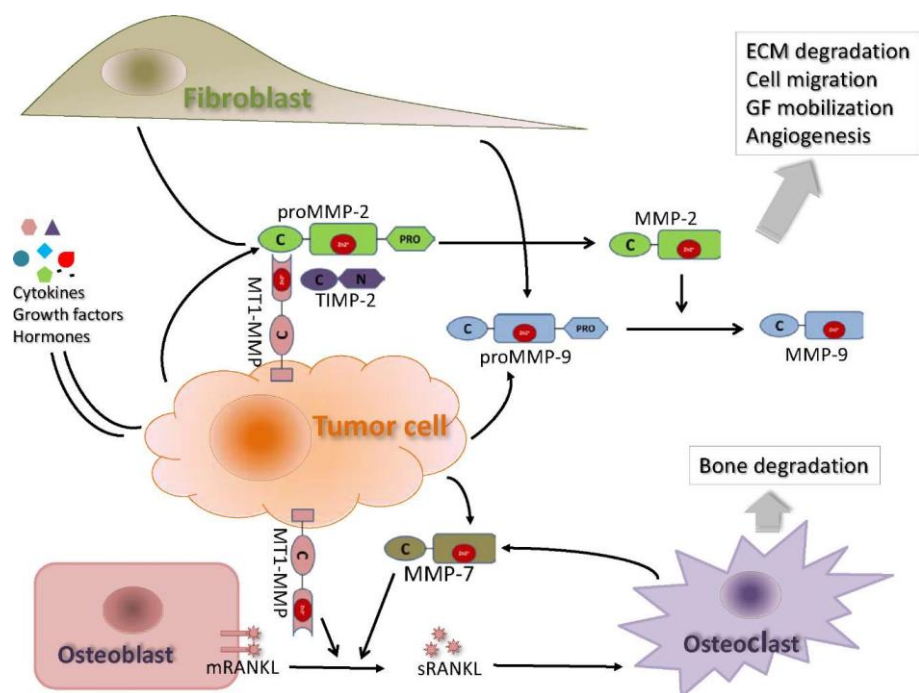


Figura 4.3.1.a Meccanismo di sintesi, attivazione e inibizione delle MMPs.

Per favorire il processo di attivazione è necessario, da una parte un notevole numero di MMP-14 libere dal legame con TIMP-2 attorno al complesso ternario MMP-14/ TIMP-2/ pro-MMP-2, dall'altra una bassa concentrazione di TIMP-2, che, se in eccesso, inibisce l'azione della seconda MMP-14 (Visse *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2006).

4.3.2 MMP-9

MMP-9 viene attivata *in vitro* da svariati enzimi proteolitici. *In vivo* l'attivazione è correlata a una cascata di eventi che coinvolgono altre MMP, tra cui la MMP-14, MMP-2, MMP-3 e il sistema della plasmina (Roth *et al.*, 2003).

La plasmina è rilasciata sotto forma di plasminogeno; quest'ultimo è attivato dall'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) fibrino-associato e dall'attivatore del plasminogeno tipo urochinasico (uPA) legato al suo specifico recettore di membrana (uPA receptor). Sia tPA sia uPA sono associati alla membrana e creano così un'attivazione localizzata della pro-MMP e il conseguente *turnover* della ECM. Una volta attivata, MMP-9 viene rapidamente inattivata dal suo inibitore tissutale, TIMP-1 (Figura 4.3.2.a).

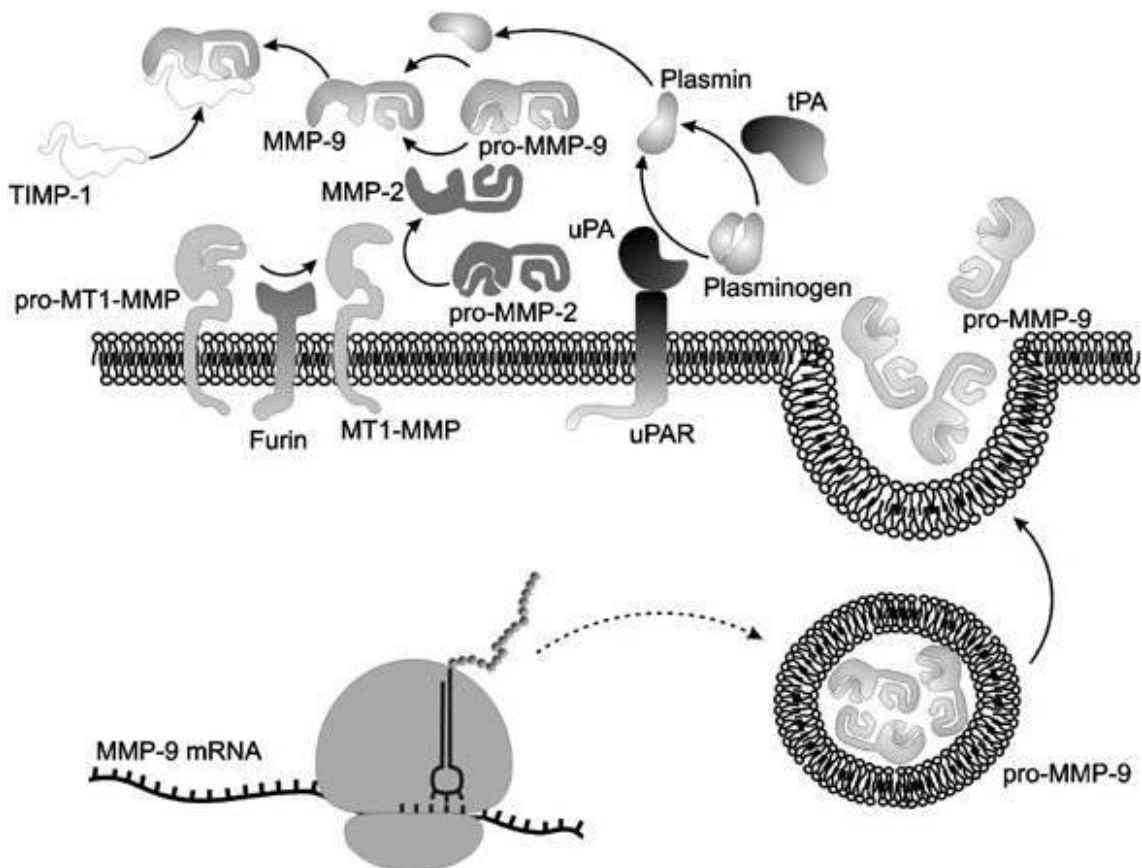


Figura 4.3.2.a Meccanismo di sintesi, attivazione e inibizione della pro-MMP-9. TIMP-1, inibitore tissutale delle metalloproteasi di matrice-1; MMP, metalloproteasi di matrice; MT, membrane-type; tPA, attivatore tissutale del plasminogeno; uPA,

attivatore del plasminogeno tipo urochinasico ; uPAR, recettore dell'uPA (da Michaluk *et al.*, 2007).

CAPITOLO 5

RISULTATI

SINTESI IDROTERMALE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI CRISTALLI ZEOLITICI

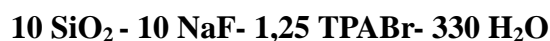
5.1 Sintesi di cristalli di Silicalite 1 (Sil-1)

I cristalli Sil-1 sono stati sintetizzati in autoclave di tipo Morey-modificata in presenza di pressione autogena da gel acquoso fluorurico alla temperatura di 170 °C, per un tempo di reazioni pari a 7 giorni. Tutti i campioni sintetizzati sono stati ottenuti con un'alta percentuale di cristallinità. L'osservazione morfologica ha evidenziato una distribuzione omogenea della taglia dei cristalli zeolitici preparati e del loro *habitus* in tutti i campioni sintetizzati.

SiO ₂ fumed	SIGMA- ALDRICH, 99.8%,solido, FW:60.9
NaF	CARLO ERBA, solido, FW:41,988
TPABr	ALDRICH, 98%, solido,FW:266.27

Tabella 5.1.a Reattivi usati nella sintesi.

Il gel precursore è stato preparato in base alla seguente composizione molare:



In tabella 5.1.b sono riportate le caratteristiche morfologiche dei cristalli sintetizzati.

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONE (µm)	
		a	b
Sil-1	Prismatica	47,5	9,0

Tabella 5.1.b Morfologia e dimensione dei cristalli sintetizzati.

5.1.1 Caratterizzazione dei cristalli Sil-1

L'analisi morfologica, effettuata per mezzo della microscopia elettronica a scansione (SEM), evidenzia che i prodotti della sintesi sono altamente cristallini, di morfologia prismatica e grandezza omogenea.

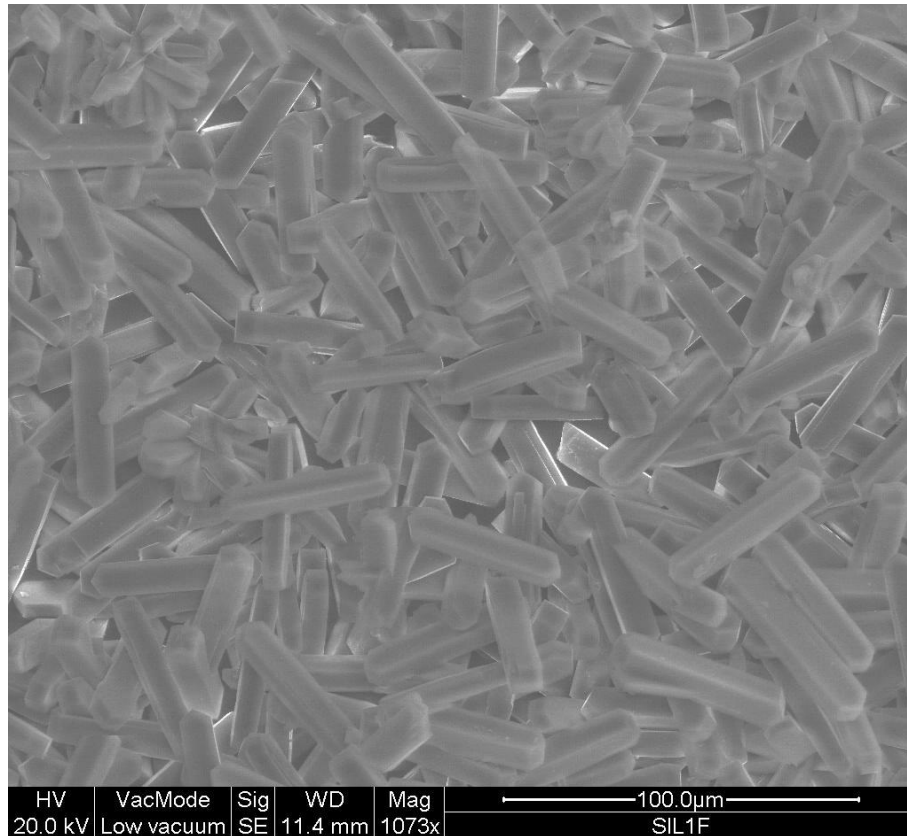


Figura 5.1.1.a Cristalli di Sil-1

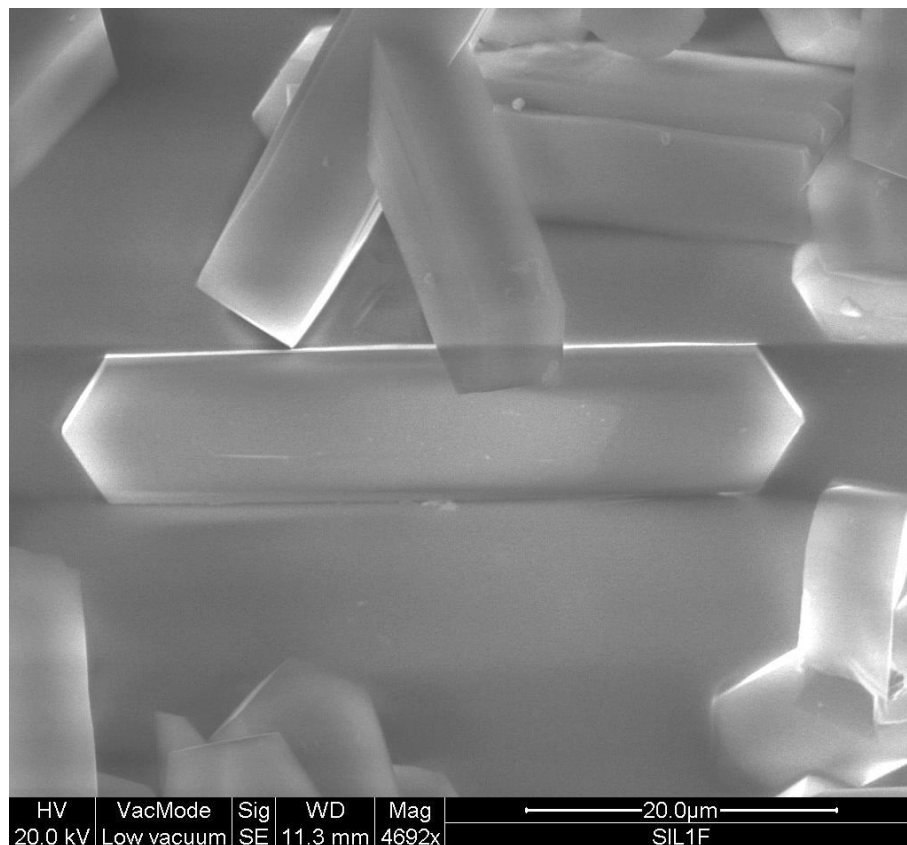


Figura 5.1.1.b Cristalli di Sil-1

La tabella 5.1.1.a, mostra le variazioni del PZC del campione Sil-1 al variare del tempo e della concentrazione.

Reazione	pH		
	Conc %	pH iniziale	pH finale
Sil-1	1	5,19	5,51
	5	5,63	5,73
	10	5,97	6,18
	20	6,20	6,50
	50	6,53	7,03

Tabella 5.1.1.a Determinazione del Point of Zero Charge (PZC) del campione Sil-1.

La figura 5.1.1.c indica le variazioni del PZC.

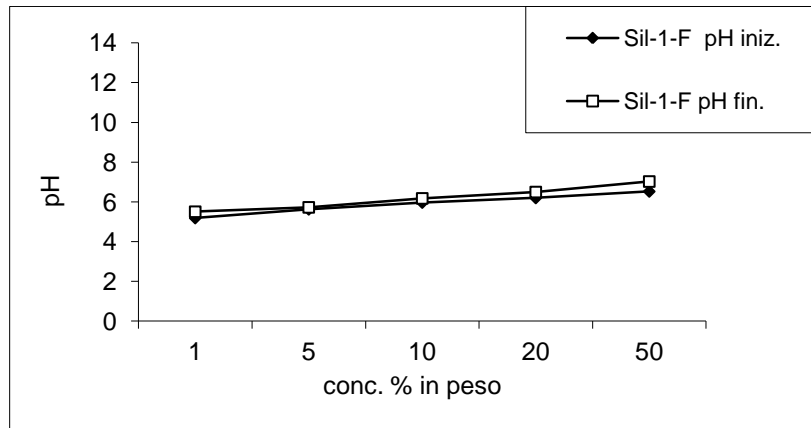


Figure 5.1.1.c Variazione del PZC dei cristalli Sil-1.

La figura 5.1.1.d mostra l'analisi EDX ed evidenzia i rapporti ponderali tra gli atomi presenti nei cristalli sintetizzati.

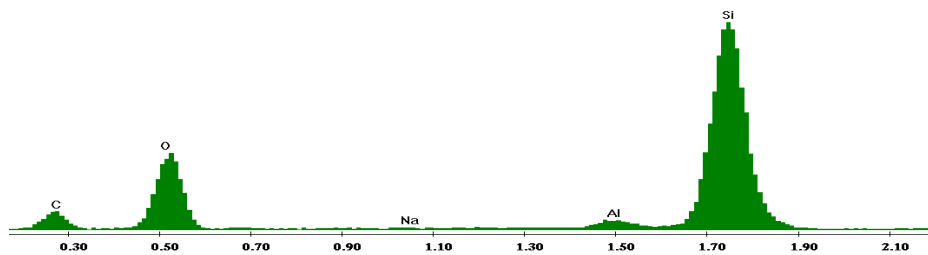


Figura 5.1.1.d EDX dei cristalli Sil-1.

I rapporti atomici ponderali sono riportati nella sottostante tabella:

<i>Elementi</i>	<i>Wt %</i>	<i>Rapporto ponderale</i>	
<i>Si</i>	<i>52,52</i>	<i>Si/Al</i>	<i>23,76</i>
<i>Al</i>	<i>2,21</i>	<i>Al/Na</i>	<i>3,45</i>
<i>Na</i>	<i>0,64</i>	<i>Si/Na</i>	<i>82,06</i>

Tabella 5.1.1.b Rapporti ponderali atomici di Sil-1.

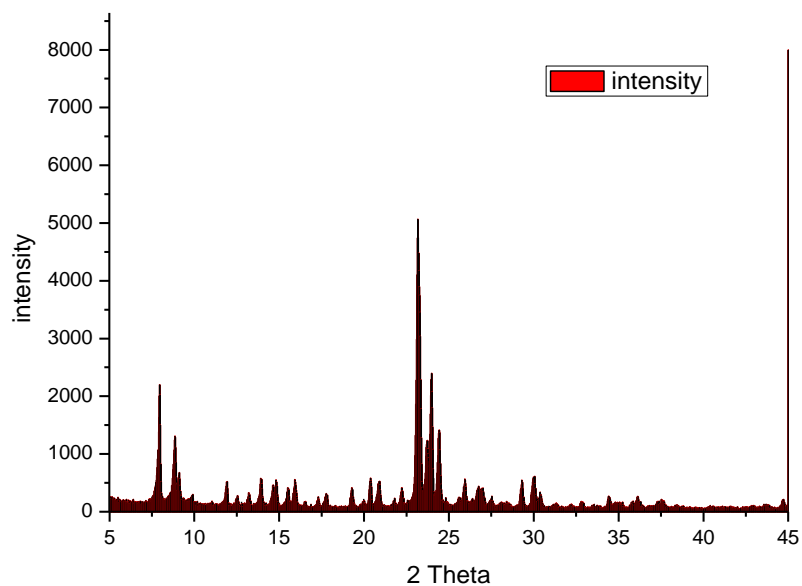


Figura 5.1.1.e Pattern di diffrazione a raggi X del campione Sil-1.

Nella Figura 5.1.1.f è evidenziato lo spettro FT-IR per il campione Sil-1 ottenuto in soluzione solida con KBr.

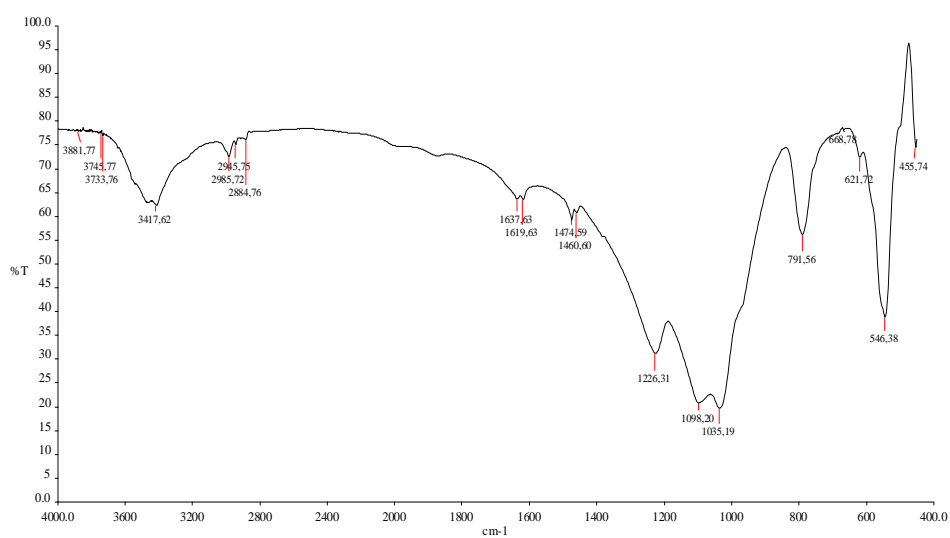


Figura 5.1.1.f Spettro FT-IR del campione Sil-1.

5.2 Sintesi dei nanocristalli di Silicalite-1 (N-Sil-1)

I cristalli di N-Sil-1 sono stati sintetizzati secondo il protocollo di Naik (2003). In particolare, è stata preparata una soluzione contenente TPAOH, TEOS e H₂O distillata che viene invecchiata a 80 °C per 19 ore, dopo esser stata sottoposta ad agitazione magnetica per 45 minuti a T ambiente. Successivamente, alla soluzione lasciata sotto agitazione magnetica per 3 ore, si aggiungono il CTAMeBr e l'EtOH. La sospensione formatasi viene filtrata ed il solido viene lavato con etanolo.

I cristalli, dopo esser stati asciugati a 70 °C, sono stati sottoposti a cristallizzazione per trasferimento in fase vapore (VPT).

TEOS	JANSEN, 98%, liquido, FW:208,33
TPAOH	ALDRICH, soluzione, FW:203,37
CTAMeBr	ALDRICH, solido, FW:364,46
EtOH	CARLO ERBA, liquido, FW:46,07

Tabella 5.2.a Reattivi usati nella sintesi.

La miscela di reazione è stata preparata in base alla seguente composizione molare:

0,06 TEOS- 0,07 TPAOH- 4 H₂O-0,003 CTAMeBr-2,4 EtOH

I cristalli sintetizzati e le loro caratteristiche morfologiche sono evidenziate in tabella 5.2.b.

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONI
N-Sil-1	Sfere	725 nm
N-Sil-1	Nano	7 nm

Tabella 5.2.b Morfologia dei cristalli sintetizzati.

5.2.1 Caratterizzazione dei cristalli di N-Sil-1

L'immagini SEM del campione analizzato è mostrata nella figura 5.2.1a ed evidenzia la presenza di nanocristalli intercresciuti a formare agglomerati cristallini sferici.

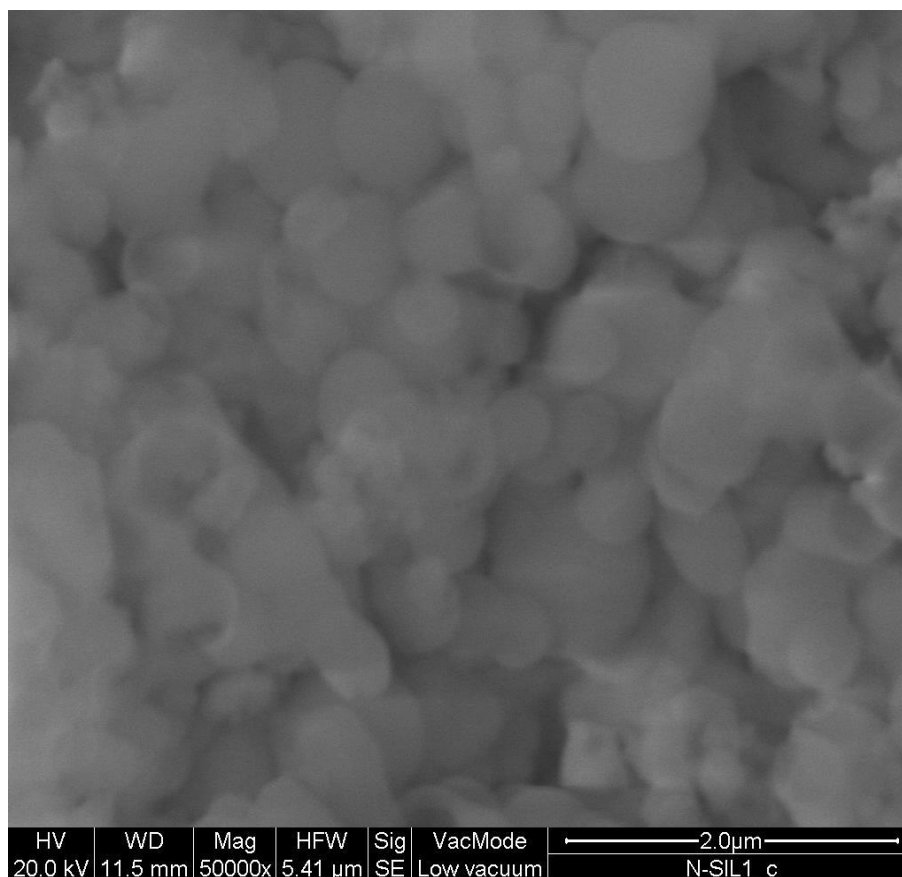


Figura 5.2.1.a Cristalli N-Sil-1

La tabella 5.2.1.a, mostra le variazioni di PZC del campione N-Sil-1 al variare del tempo e della concentrazione.

Reazione	<i>pH calcinato</i>		
	Conc %	pH iniziale	pH finale
N-Sil-1	1	9.86	9.13
	3	10.20	9.73
	5	10.23	9.82
	10	10.28	10.07
	50	10.32	10.15

Tabella 5.2.1.d: PZC del campione N-Sil-1 calcinato

La figura 5.2.1.e indica le variazioni del PZC.

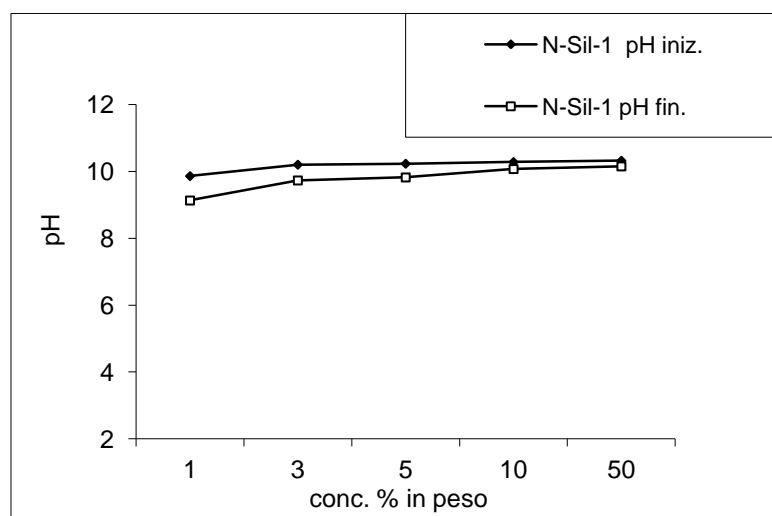


Figura 5.2.1.e PZC dei cristalli di N-Sil-1 calcinati.

5.3 Sintesi dei cristalli di Boro-Silicalite (B-Sil-1)

I cristalli di B-Sil-1 sono stati sintetizzati da gel acquoso leggermente basico (pH=8), posto sotto agitazione magnetica sino ad ottenere una miscela omogenea, che è stata, poi, sottoposta a sintesi idrotermale alla temperatura di 170 °C per un tempo di reazione pari a 7 giorni. Il gel di reazione è stato preparato in base alla seguente composizione molare:



I reattivi usati nella sintesi sono schematizzati nella Tabella 5.3.a

Silice fumed (SiO ₂)	ALDRICH, 98%, solido, FW:60,09
Potassio fluoruro (KF)	CARLO ERBA, solido, FW: 41,988
Tetrapropilammonio bromuro (TPABr)	ALDRICH, solido, FW:266,27
Acido borico (H ₃ BO ₃)	CARLO ERBA, solido, FW:61,8431

Tabella 5.3.a Reattivi utilizzati nella sintesi.

I cristalli ottenuti e le loro caratteristiche morfologiche sono evidenziate in Tabella 5.3.b.

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONE (μm)	
B-Sil	Sferica	d_{max} 6,82	d_{min} 4,27

Tabella 5.3.b Morfologia e dimensione dei cristalli di B-Sil sintetizzati.

5.3.1 Caratterizzazione dei cristalli B-Sil-1

Le immagini SEM del campione analizzato sono mostrate nelle figure 5.3.1a e 5.3.1b e rivelano la formazione di sfere cristalline costituite da cristalli più piccoli ed intercresciuti.

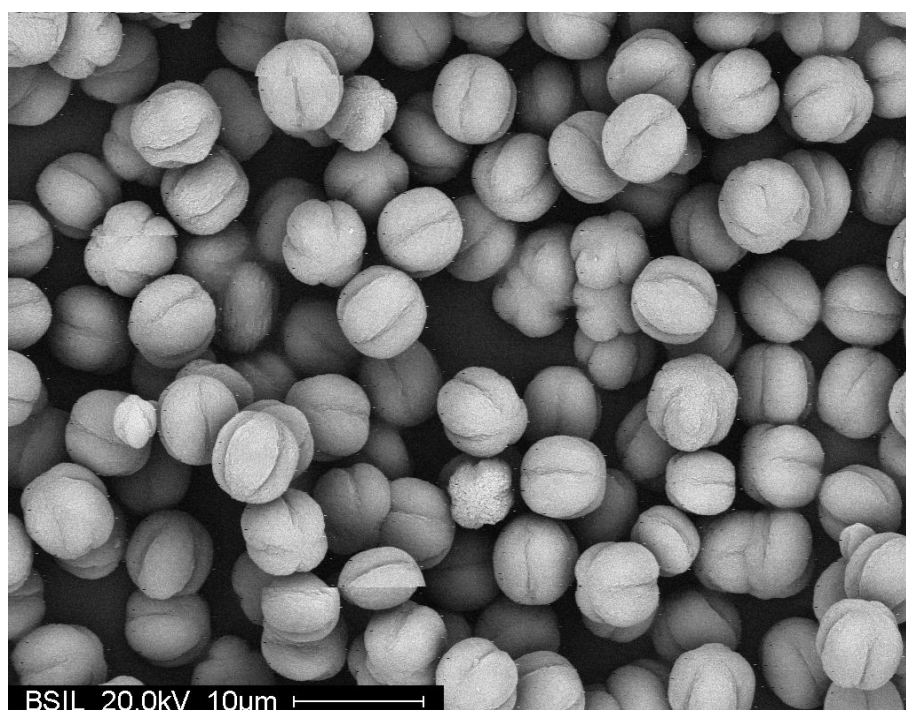


Figura 5.3.1a Cristalli B-Sil, sonicati, calcinati.

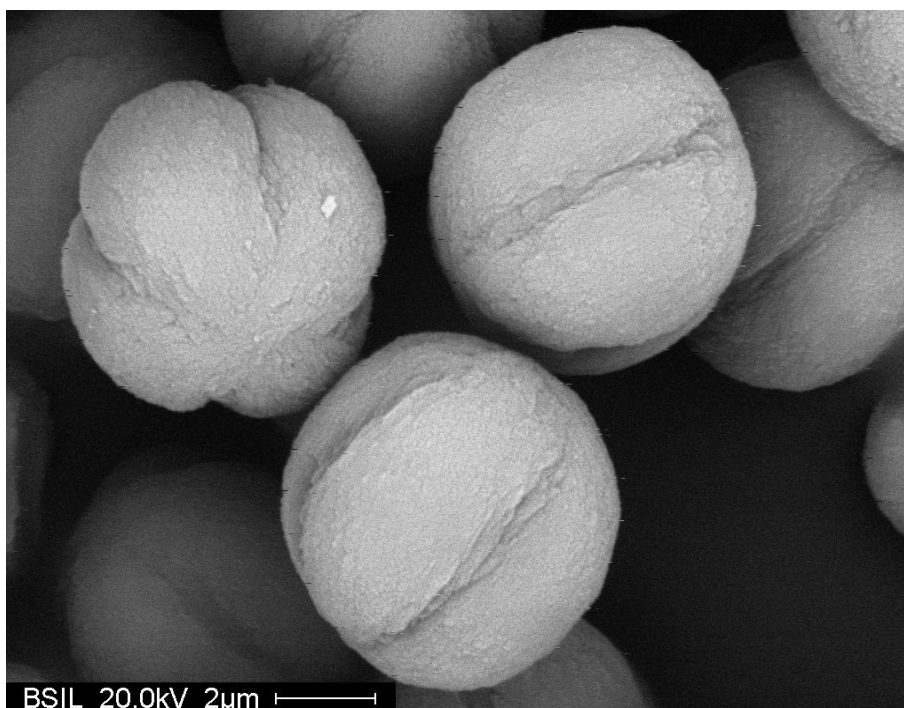


Figura 5.3.1b Cristalli B-Sil, sonicati, calcinati.

La Tabella 5.3.1.a mostra le variazioni del Point of Zero Charge (PZC) del campione B-Sil al tempo 0 e dopo 24 ore, al variare della concentrazione espressa come percentuale in peso.

Reazione	pH calcinato		
	Conc. %	pH iniziale	pH finale
B-Sil	1	6,33	7,40
	5	6,20	6,69
	10	6,03	6,55
	20	6,20	6,39
	50	6,51	6,63

Tabella 5.3.1a PZC del campione B-Sil calcinato.

Nella Figura 5.3.1.c è mostrato il grafico della variazione del PZC.

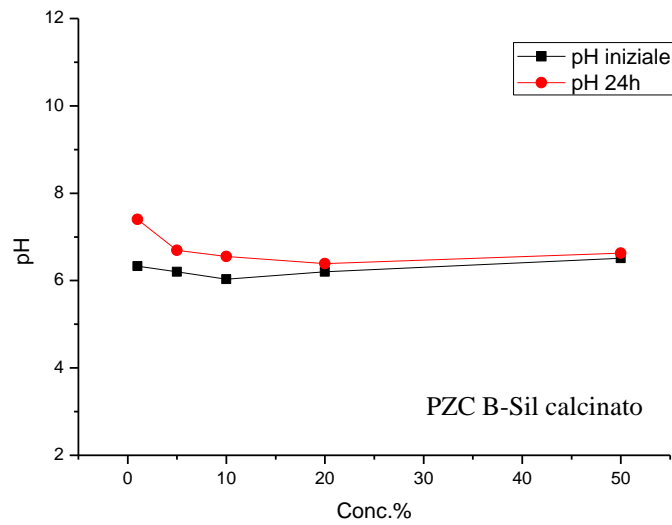


Figura 5.3.1c Variazione del PZC del campione B-Sil in funzione della percentuale in peso al tempo 0 (in nero) e alle 24 ore (in rosso).

Nella Figura 5.3.1.d è mostrato invece il grafico dell'analisi diffrattometrica cui sono stati sottoposti i cristalli di B-Sil sintetizzati ed evidenzia l'avvenuta formazione di una struttura zeolitica di tipo MFI, pura.

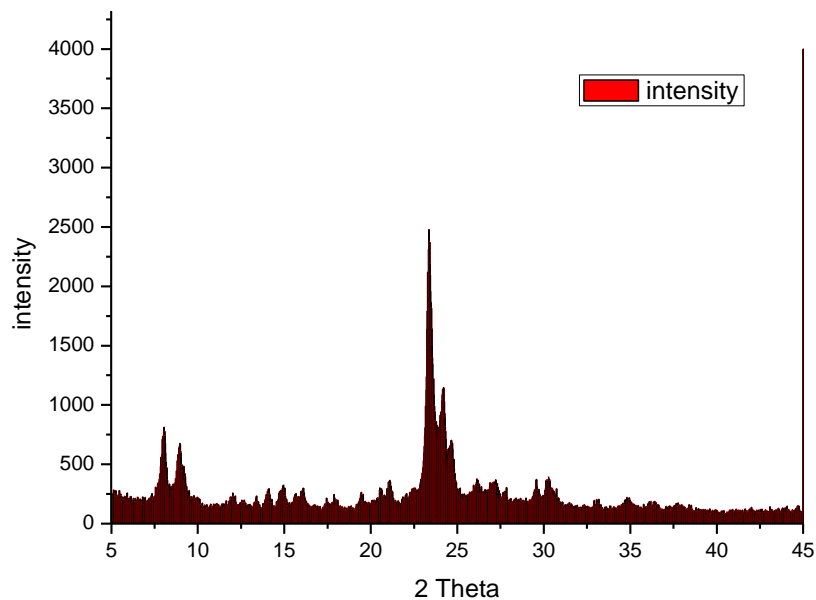


Figura 5.3.1d Analisi diffrattometrica ai raggi X del campione B-Sil.

Nella Figura 5.3.1.e è evidenziato lo spettro FT-IR del campione B-Sil, ottenuto in

soluzione solida di KBr, che evidenzia le bande strutturali zeolitiche tipiche della struttura MFI.

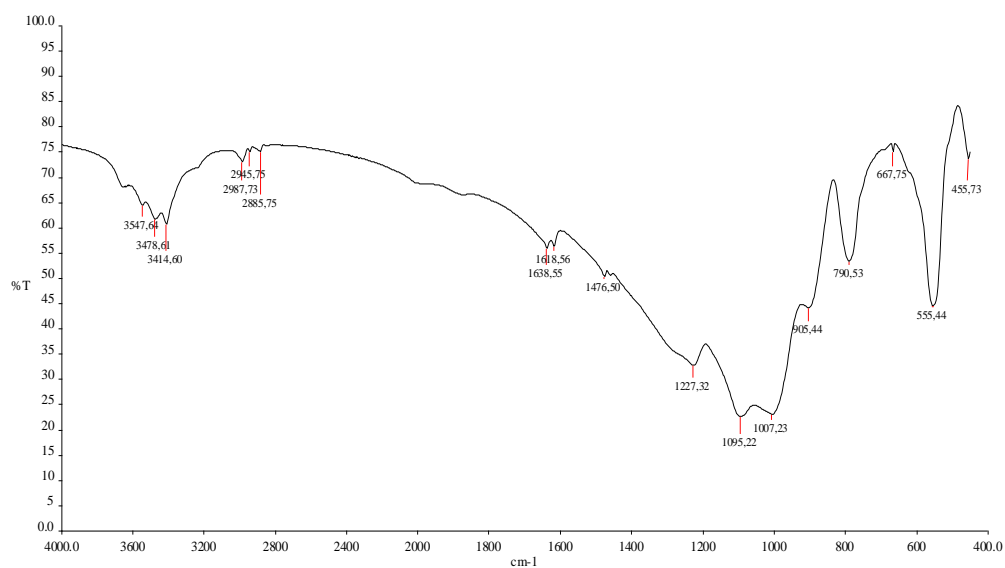


Figura 5.3.1.e Spettro FT-IR del campione B-Sil.

5.4 Sintesi dei cristalli di Silicalite-2 (G-Sil-2)

I cristalli di G-Sil-2 sono stati sintetizzati in gel acquoso alcalino. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 24 ore quindi è stata utilizzata per la sintesi idrotermale a 120 °C per un tempo di reazione pari a 7 giorni.

TEOS	JANSEN, 98%, liquido, FW:208,33
TBAOH	ALDRICH, 40%, soluzione, FW: 259,47

Tabella 5.4.a Reattivi usati nella sintesi.

Il gel di reazione è stato preparato in base alla seguente composizione molare:



I cristalli ottenuti e le loro caratteristiche morfologiche sono evidenziate in tabella 5.4.b.

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONE (nm)
G-Sil-2	Sferica	220 nm

Tabella 5.4.b: Morfologia e dimensione dei cristalli sintetizzati

5.4.1 Caratterizzazione dei cristalli di G-Sil-2

Le immagini SEM del campione analizzato sono mostrate nelle figure 5.4.1.a, 5.4.1.b

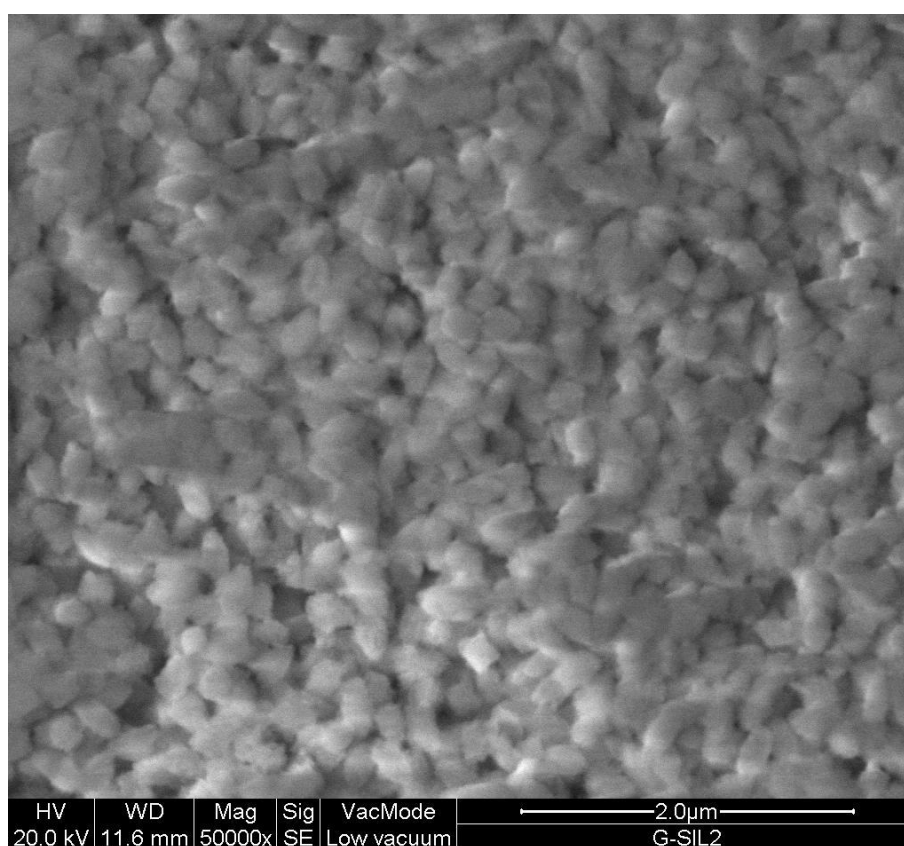


Figura 5.4.1.a Cristalli di G-Sil-2.

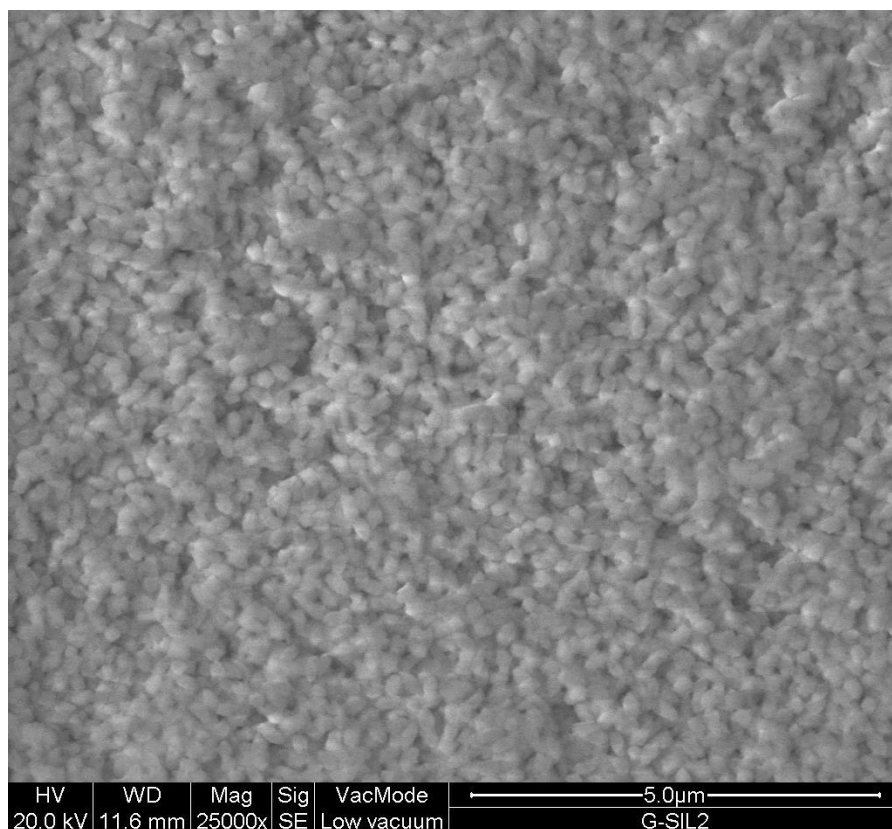


Figura 5.4.1.b Cristalli di G-Sil-2.

La tabella 5.4.1.c, mostra le variazioni di PZC del campione G-Sil-2 al variare del tempo e della concentrazione.

Reazione	<i>pH calcinato</i>		
	Conc %	pH iniziale	pH finale
G-Sil-2	1	3,95	3,87
	3	3,59	3,48
	5	3,43	3,39
	10	3,31	3,24
	50	3,24	3,15

Tabella 5.4.1.c PZC del campione G-Sil-2 calcinato.

La figura 5.4.1.e indica le variazioni del PZC:

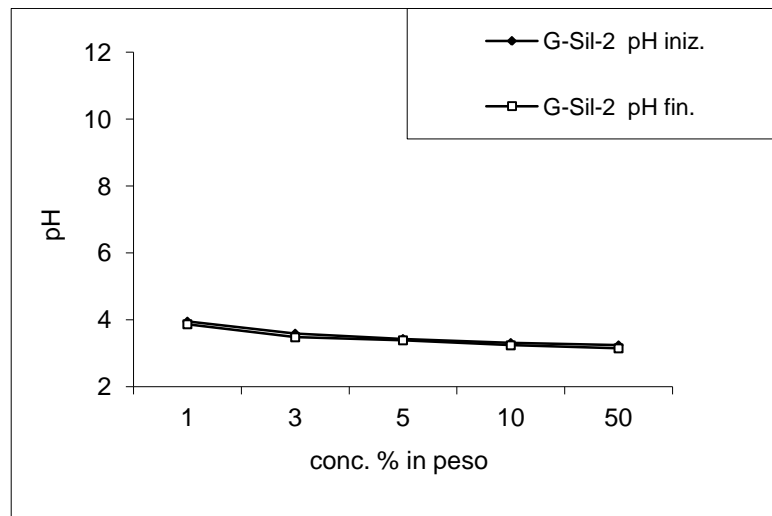


Figura 5.4.1.e PZC dei cristalli di G-Sil-2 calcinati.

Nella figura 5.4.1.f è mostrato il diffrattogramma a raggi X dei cristalli di G-Sil-2 sintetizzati.

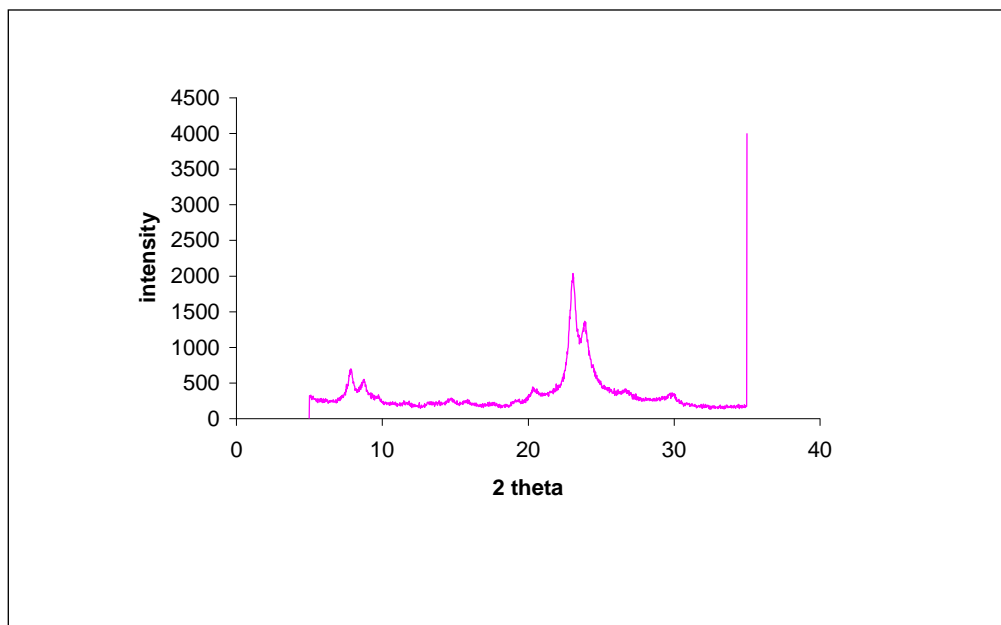


Figura 5.4.1.f Diffrattogramma a raggi X dei cristalli di G-Sil-2 sintetizzati.

Nella figura 5.4.1.g è mostrato l'analisi EDX effettuata sul campione di G-Sil-2.

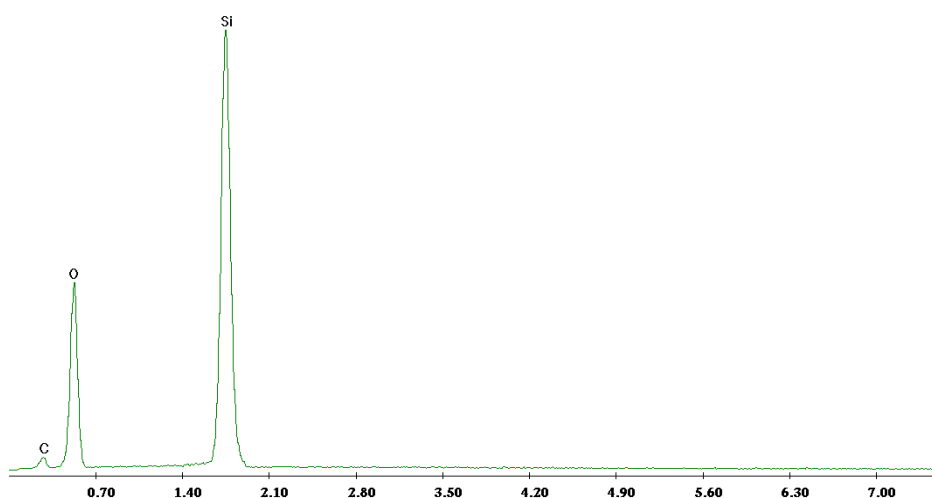


Figura 5.4.1.g EDX sul campione di G-Sil-2.

5.5 Sintesi dei cristalli di Sil-2-C

I cristalli Sil-2-C sono stati sintetizzati da gel acquoso alcalino, sottoposto ad agitazione magnetica per un'ora quindi in stufa a 110 °C per 5 giorni.

SiO ₂ AS40	ALDRICH, liquido, FW:60,09
NaOH	CARLO ERBA, 97%, pellets, FW: 39,997
TEAOH	ALDRICH, liquido, FW: 147,26
NaAlO ₂	CARLO ERBA, SOLIDO,FW: 81,97

Tabella 5.5.a Reattivi usati nella sintesi.

Il gel di reazione è stato preparato in base alla seguente composizione molare:



I cristalli ottenuti e le loro caratteristiche morfologiche sono evidenziate in tabella 5.5.b

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONE (nm)
Sil-2-C	Sferica	108,45 nm

Tabella 5.5.b Morfologia e dimensione dei cristalli sintetizzati.

5.5.1 Caratterizzazione dei cristalli di Sil-2-C

Le immagini SEM del campione analizzato sono mostrate nelle figure 5.5.1.a e 5.5.1.b.

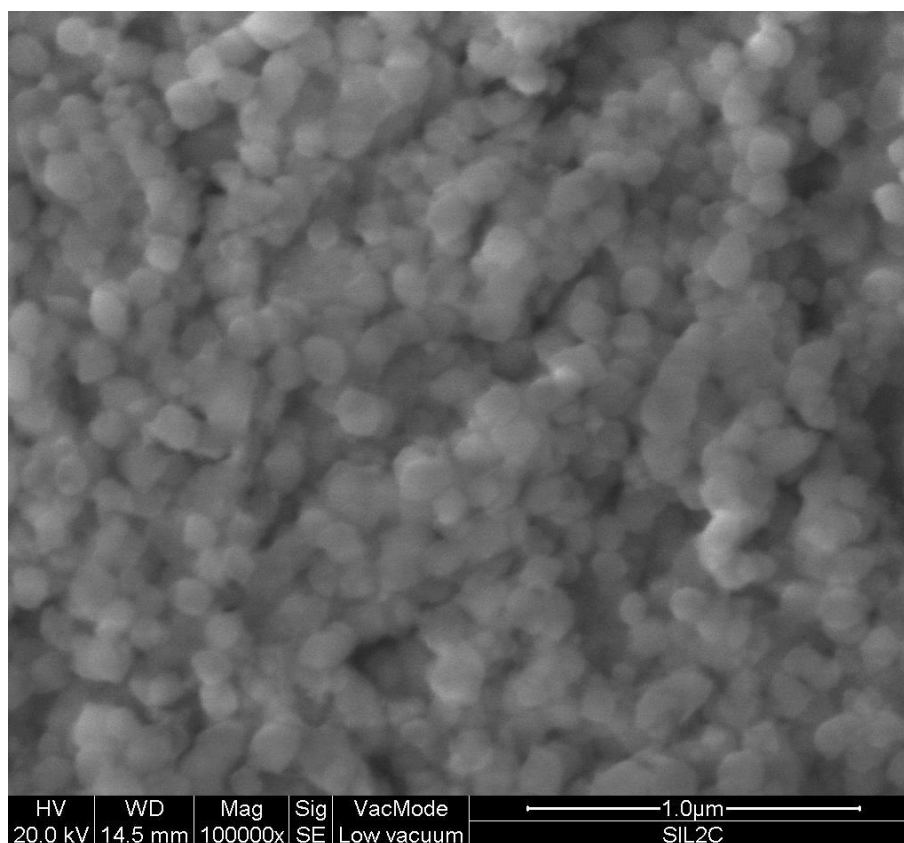


Figura 5.5.1.a Cristalli Sil-2-C.

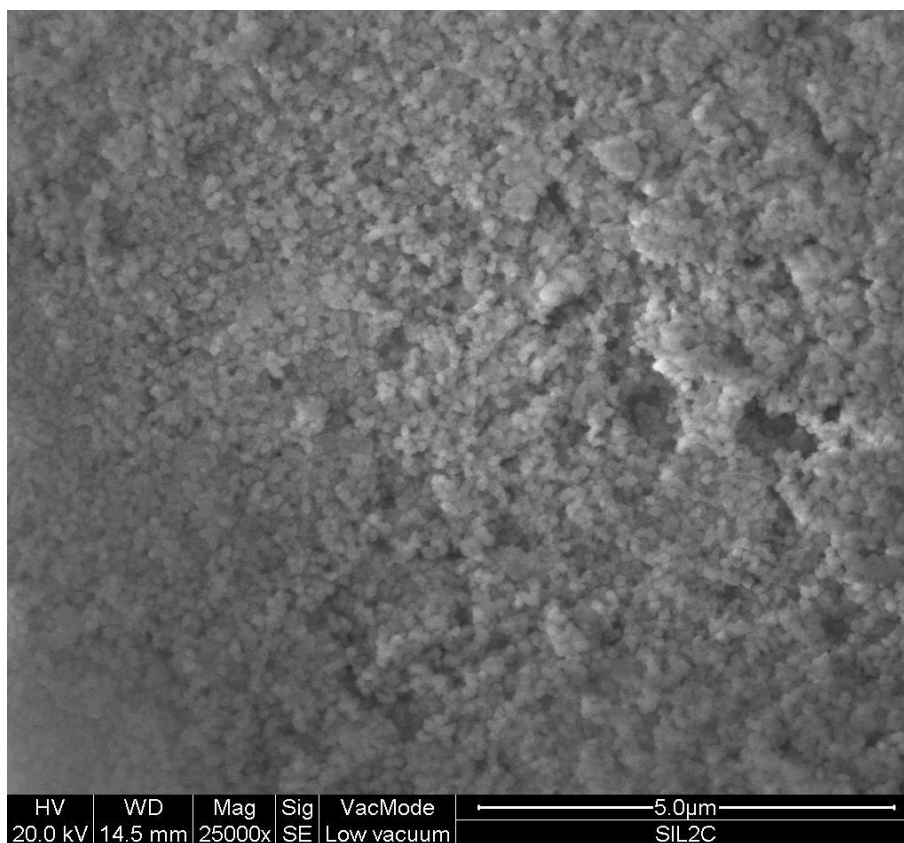


Figura 5.5.1.b Cristalli Sil-2-C.

La tabella 5.5.1.c mostra le variazioni di PZC del campione Sil-2-C al variare del tempo e della concentrazione.

Reazione	<i>pH calcinato</i>		
	Conc %	pH iniziale	pH finale
Sil-2-C	1	5,26	4,82
	3	4,30	4,28
	5	4,23	4,24
	10	4,48	4,35
	50	4,07	3,99

Tabella 5.5.1.c PZC del campione Sil-2-C calcinato.

La figura 5.5.1.c indica le variazioni del PZC:

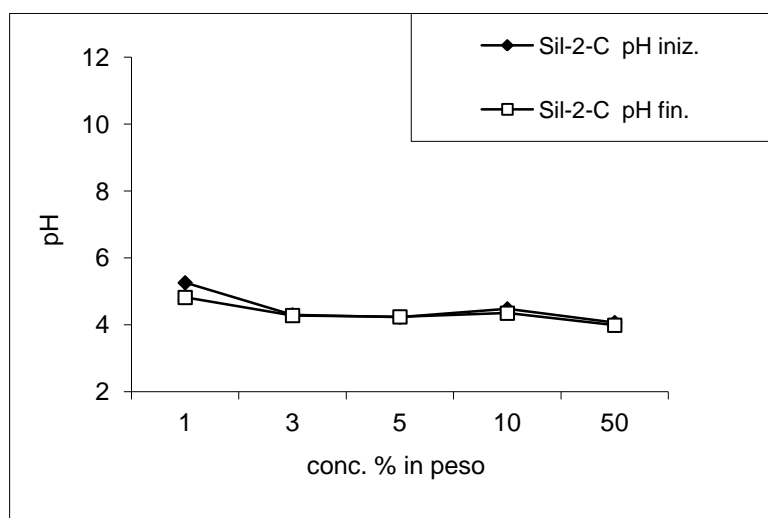


Figure 5.5.1.c PZC dei cristalli di Sil-2-C calcinati.

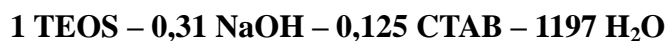
5.6 Sintesi dei cristalli mesoporosi di Silicalite 2 (Sil2C6)

La sintesi dei cristalli mesoporosi Sil2C6 sarà oggetto di brevettazione e pertanto non viene qui riportata.

5.7 Sintesi dei cristalli mesoporosi di MCM-41

I cristalli di MCM-41 sono stati sintetizzati in gel acquoso basico sotto agitazione magnetica su piastra riscaldante alla temperatura di 80 °C per 2 ore, che è stato, poi, lasciato invecchiare a temperatura ambiente. I cristalli separati sono stati calcinati fino alla temperatura di 650 °C.

Il gel di reazione è stato preparato in base alla seguente composizione molare:



I reattivi usati nella sintesi sono schematizzati nella Tabella 5.7.a.

Tetraetilortosilicato (TEOS)	ALDRICH, 98%, liquido, FW:208,33
Idrossido di sodio (NaOH)	CARLO ERBA 97%; pellets, FW 39,997
Esadeciltrimetilammonibromuro (CTAB)	ALDRICH; solido, FW:364,46

Tabella 5.7.a Reattivi utilizzati nella sintesi.

I cristalli ottenuti e le loro caratteristiche morfologiche sono evidenziate in Tabella 5.7.b.

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONE (μm)	
		A	b
MCM-41	Nanocristallina	0,553	0,158

Tabella 5.7.b Morfologia e dimensione dei cristalli di MCM-41 sintetizzati.

5.7.1 Caratterizzazione dei cristalli di MCM-41

Le immagini SEM del campione analizzato sono mostrate nelle figure 5.7.1.a e 5.7.1.b.

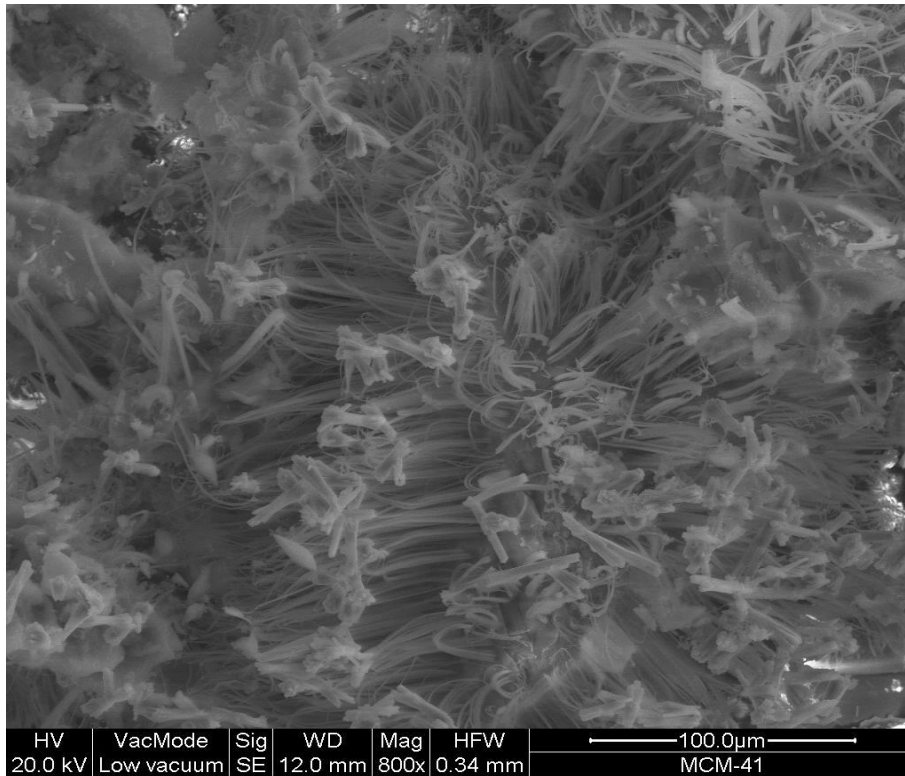


Figura 5.7.1.a Cristalli MCM-41 tal quali.

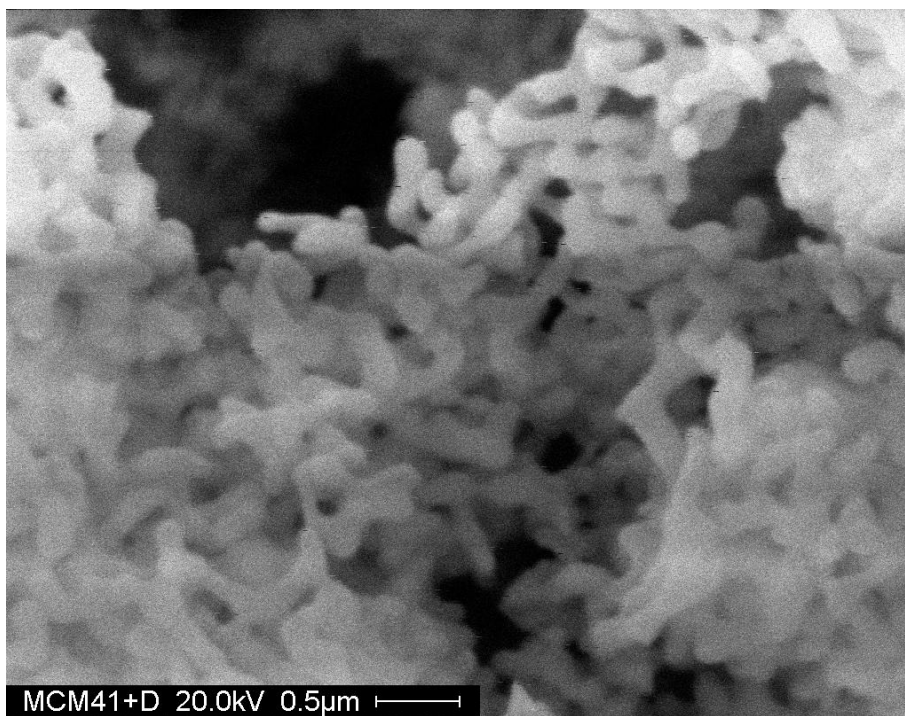


Figura 5.7.1.b Cristalli MCM-41 calcinati.

La Tabella 5.7.1.a mostra le variazioni del Point of Zero Charge (PZC) del campione MCM-41 al tempo 0 e dopo 24 ore, al variare della concentrazione espressa come percentuale in peso.

Reazione	pH calcinato		
	Conc. %	pH iniziale	pH finale
MCM-41	1	3,56	3,61
	5	4,10	4,26
	10	4,49	4,72
	20	4,57	4,75
	50	4,83	5,10

Tabella 5.7.1.a PZC del campione MCM-41 calcinato.

Nella Figura 5.7.1.c è mostrato il grafico della variazione del PZC

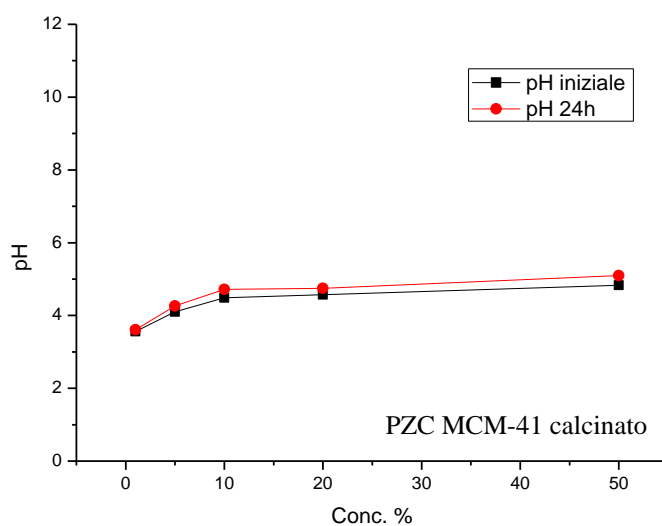


Figura 5.7.1.c Variazione del PZC del campione Sil-2 in funzione della percentuale in peso al tempo 0 (in nero) e alle 24 ore (in rosso).

Nella Figura 5.7.1.d è invece mostrato il grafico dell'analisi EDX effettuata sul campione MCM-41.

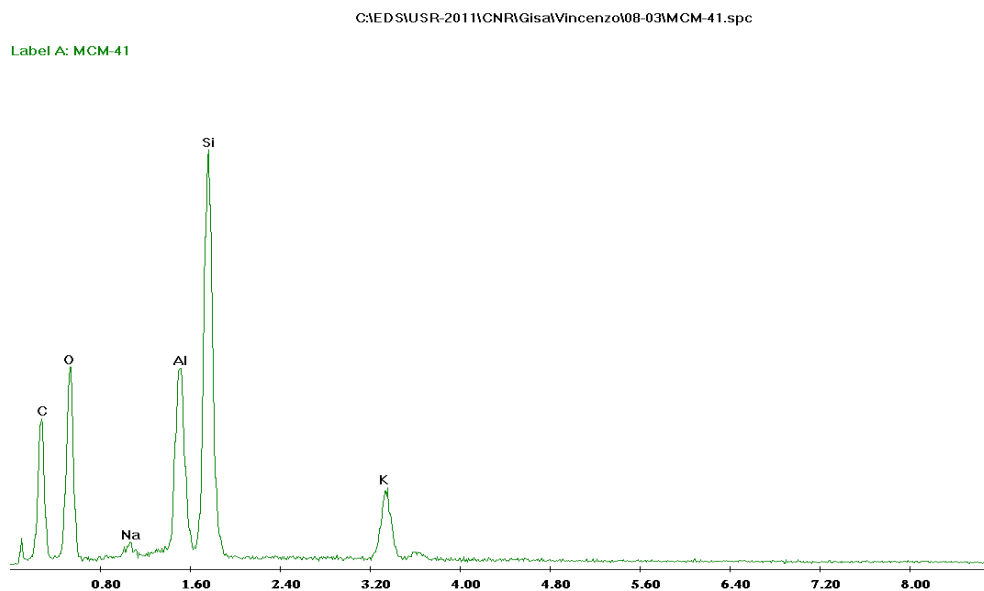


Figura 5.7.1.d Grafico delle analisi EDX sul campione MCM-41.

Nella Figura 5.7.1.e si evidenzia lo spettro FT-IR per il campione MCM-41 ottenuto in soluzione solida di KBr.

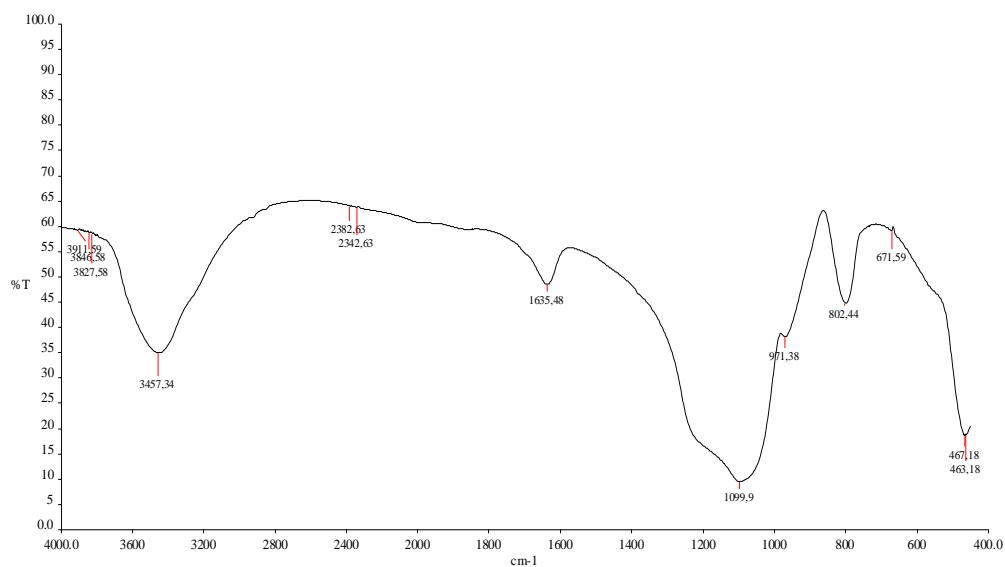


Figura 5.7.1.e Spettro FT-IR del campione MCM-41.

5.8 Sintesi dei cristalli di Zeolite L (LTL)

I cristalli LTL sono stati sintetizzati in gel acquoso basico alla temperatura di 170 °C con un tempo di reazione di 2 giorni. I cristalli sono di forma cubica e hanno una distribuzione omogenea della taglia cristallina. In tutti i campioni sintetizzati, durante la cristallizzazione essi tendono a stabilizzarsi formando agglomerati sferici di maggiori dimensioni.

SiO ₂ colloidale	SIGMA-ALDRICH, 40%, liquido, FW:60.9
NaAlO ₂	CARLO ERBA, FW:81,97
KOH	CARLO ERBA FW:56,109

Tabella 5.8.a Reattivi usati nella sintesi.

5.8.1 Caratterizzazione dei cristalli di LTL

Le immagini SEM del campione analizzato sono mostrate nelle figure 5.8.1.a e 5.8.1.b.

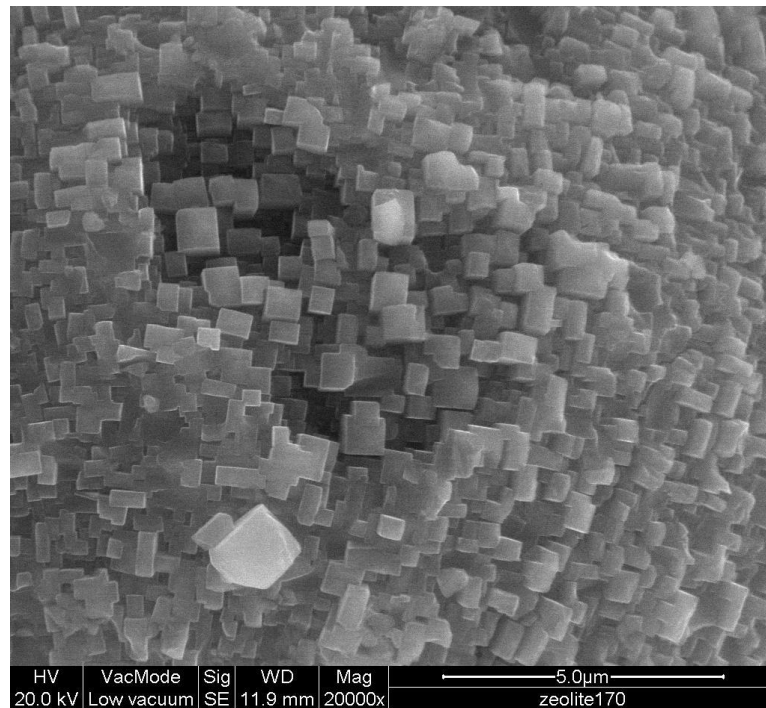


Figura 5.8.1.a Cristalli LTL.

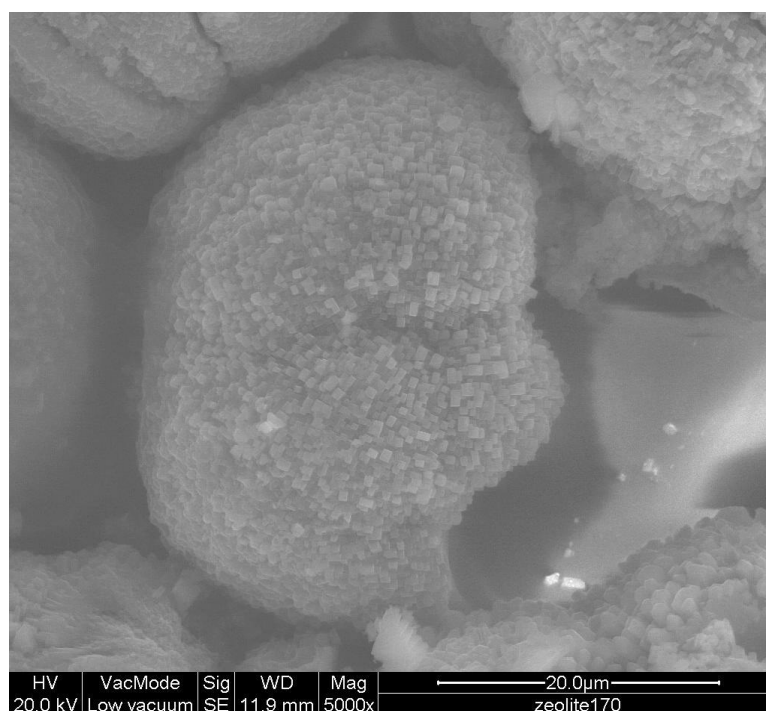


Figura 5.8.1.b Cristalli LTL.

La tabella 5.8.1.a mostra le variazioni di PZC del campione Zeolite LTL al variare del tempo e della concentrazione.

Reazione	pH		
	Conc %	pH iniziale	pH finale
Zeolite LTL	1	10,60	10,31
	5	10,73	10,45
	10	10,81	10,65
	20	10,87	10,69
	50	11,20	11,90

Tabella 5.8.1.a PZC dei cristalli LTL.

La figura 5.8.1.c indica le variazioni del PZC.

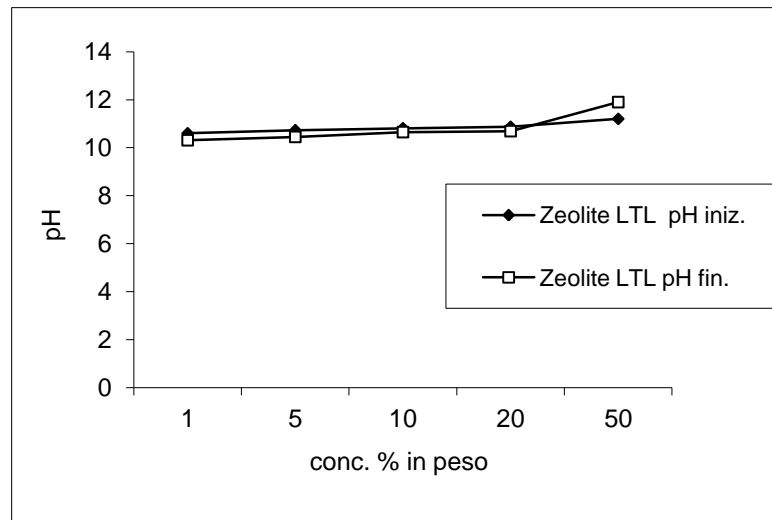


Figure 5.8.1.c Variazione del PZC dei cristalli LTL sintetizzati.

La figura 5.8.1.d mostra i rapporti ponderali tra gli atomi presenti nei cristalli sintetizzati.

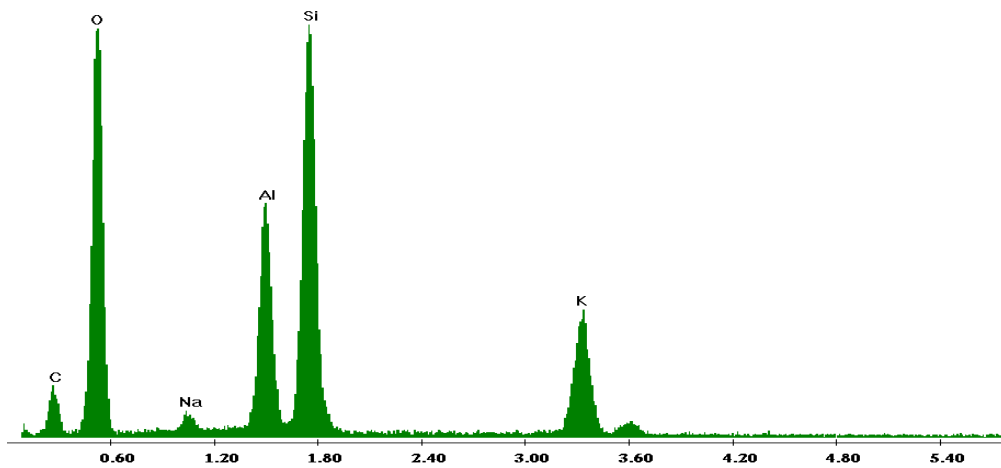


Figura 5.8.1.d EDX dei cristalli LTL.

I rapporti atomici ponderali sono riportati nella sottostante tabella:

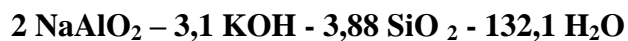
Elementi	Wt %	Rapporto ponderale	
		Si	24,23
Al	11,67	Al/Na	6,95
Na	1,68	Si/Na	14,42
K	10,39	Si/K	2,33

Tabella 5.8.1.b Rapporti atomici ponderali nei cristalli LTL.

5.9 Sintesi dei cristalli di Zeolite LA (ZEOA)

I cristalli di ZEOA sono stati sintetizzati utilizzando gel acquoso basico alla temperatura di 170 °C con un tempo di reazione pari a 2 giorni.

Il gel è stato preparato con la seguente composizione molare:



Silice Colloidale (SiO ₂)	LUDOX, 40%, FW:60,09
Alluminato di sodio (NaAlO ₂)	CARLO ERBA, solido, FW: 81,97
Idrossido di Potassio (KOH)	CARLO ERBA, FW:56,109

Tabella 5.9.a Reattivi utilizzati nella sintesi dei cristalli ZEOA.

5.9.1 Caratterizzazione dei cristalli di ZEOA

L'immagine SEM del campione analizzato è mostrata nella figura 5.9.1.a

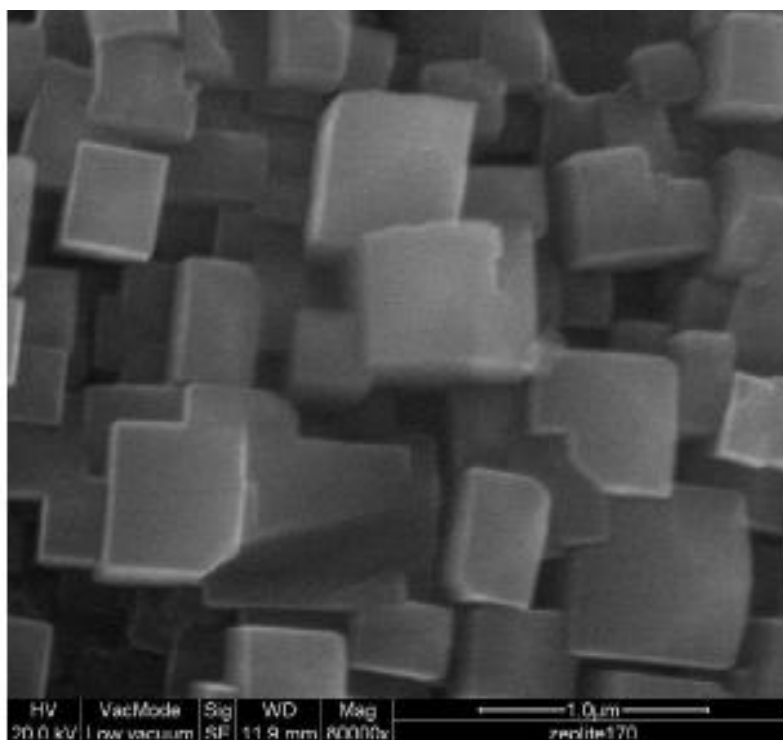


Figura 5.9.1.a Microfotografia SEM dei cristalli ZEOA non calcinati.

Le caratteristiche morfologiche dei cristalli interessati sono riportate nella tabella sottostante

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONE (μm)		
		a	b	c
ZEOA	Cubica	0,6	0,6	0,6

Tabella 5.9.1.b Caratteristiche morfologiche dei cristalli di Zeolite LA.

La figura 5.9.1.b indica le variazioni del Point of Zero Charge (PZC) dei cristalli di ZEOA calcinati al tempo iniziale ($t=0$) e finale ($t=96$ h)

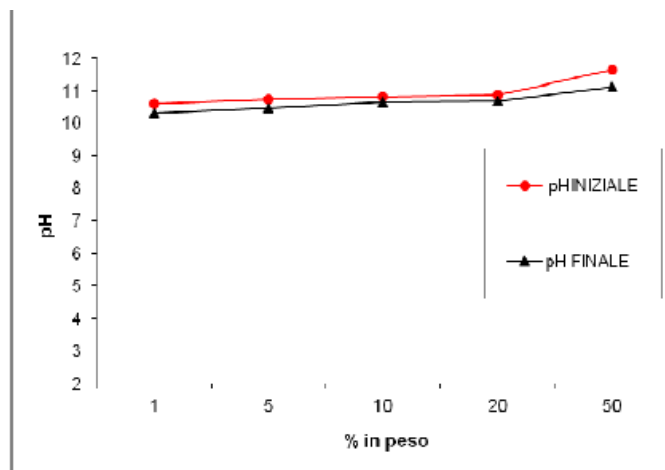


Figura 5.9.1.b Analisi del PZC dei cristalli ZEOA.

La figura 5.9.1.c mostra i rapporti ponderali tra gli atomi presenti nei cristalli sintetizzati.

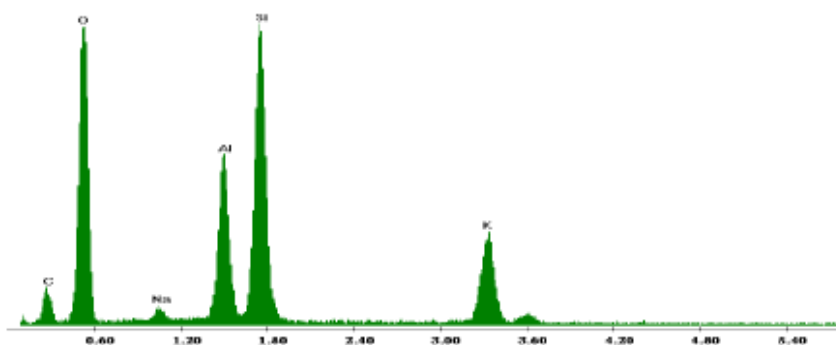


Figura 5.9.1.c EDX dei cristalli di ZEOA.

I rapporti atomici ponderali sono riportati nella tabella sottostante:

<i>Elementi</i>	<i>Wt %</i>	<i>Rapporto ponderale</i>	
<i>Si</i>	<i>40,635</i>	<i>Si/Al</i>	<i>22,95</i>
<i>Al</i>	<i>1,77</i>	<i>Al/Na</i>	<i>0,50</i>
<i>Na</i>	<i>3,515</i>	<i>Si/Na</i>	<i>11,56</i>
<i>K</i>	<i>1,68</i>	<i>Si/K</i>	<i>2,33</i>

Tabella 5.9.1.c Rapporti atomici ponderali dei cristalli di ZEOA.

La figura 5.9.1.d evidenzia il diffrattogramma dei cristalli di ZEOA.

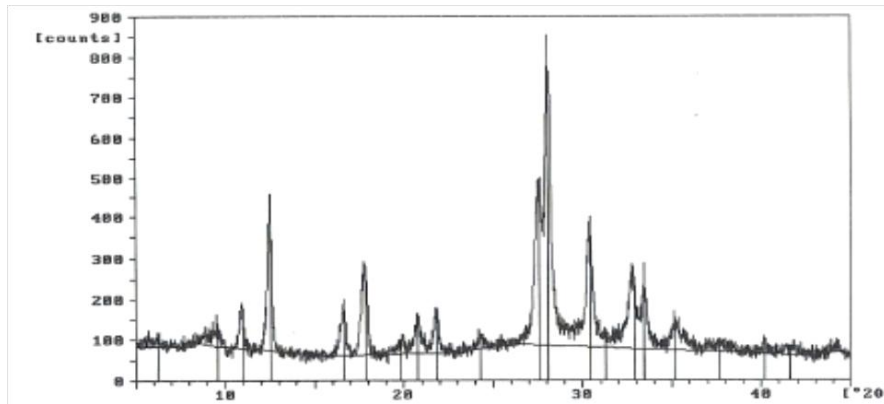


Figura 5.9.1.d Diffrattogramma a raggi X dei cristalli di ZEOA.

La figura 5.9.1.e mostra il diffrattogramma dei cristalli di ZEOA riportato in letteratura (Flanigen, 1971)

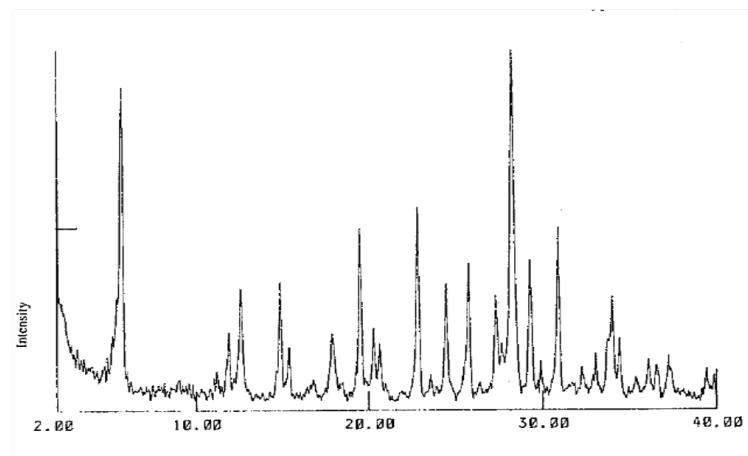


Figura 5.9.1.e Diffrattogramma a raggi X dei cristalli di ZEOA (Flanigen, 1971).

Le seguenti figure mostrano gli spettri FT-IR dei cristalli di ZEOA riportati in letteratura (Flanigen, 1971) e di quelli sintetizzati ed analizzati in questo lavoro di tesi.

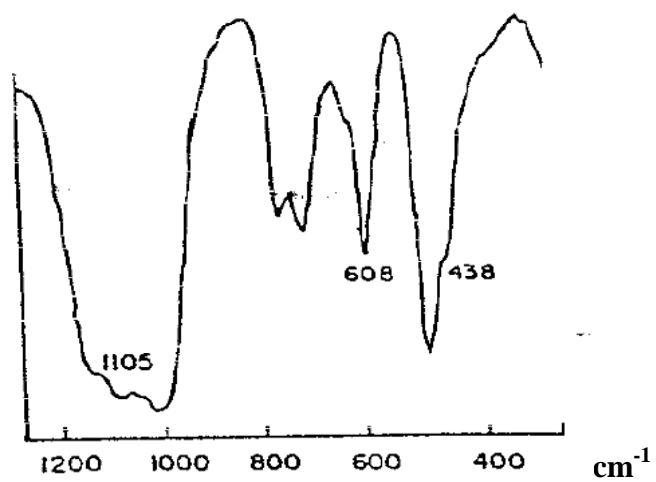


Figura 5.9.1.f Spettro FT-IR dei cristalli di ZEOA non calcinati (Flanigen, 1971).

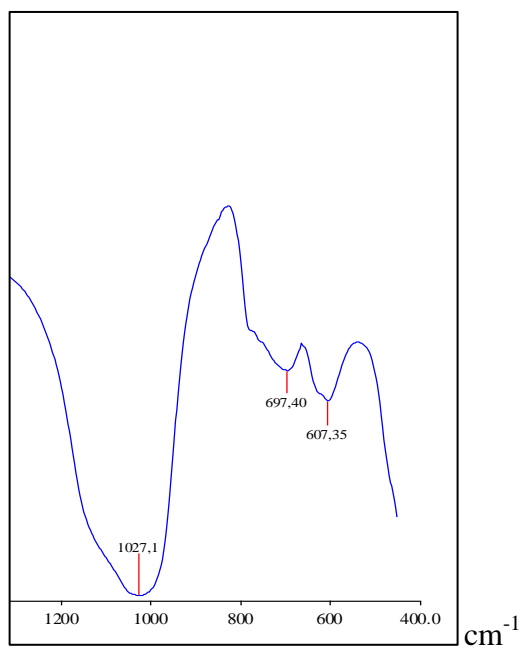


Figura 5.9.1.g Spettro FT-IR dei cristalli di ZEOA non calcinati.

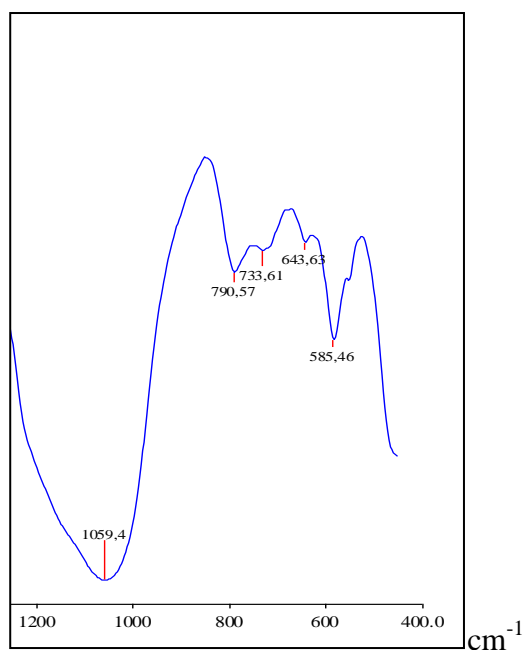


Figura 5.9.1.h: Spettro FT-IR dei cristalli di ZEOA calcinati.

5.10 Sintesi dei cristalli di ZeoL

I cristalli ZEOL sono stati sintetizzati in gel acquoso basico alla temperatura di 120 °C per 7 giorni. I cristalli ottenuti sono sferici e omogenei.

TEOS	SIGMA-ALDRICH, 98%, liquido, FW:208,33
NaOH	CARLO ERBA, 97%, solido, FW:39,997
NaAlO ₂	CARLO ERBA, 99%, solido, FW:81,97
TEAOH	SIGMA-ALDRICH, 20%, liquido, FW:147,26

Tabella 5.10.a Reattivi usati nella sintesi.

Il gel di reazione è stato preparato in base alla seguente composizione molare:

9,9 TEOS- 9,9 TEAOH- 0,304 NaAlO₂- 1,22NaOH- 119,8 H₂O

I cristalli ottenuti e le loro caratteristiche morfologiche sono evidenziate in tabella 5.10.b

ZEOLITE	MORFOLOGIA	DIMENSIONE (μm)	
		a	b
ZEOL	Sferica	0,7	0,6

Tabella 5.10.b morfologia dei cristalli sintetizzati.

5.10.1 Caratterizzazione dei cristalli ZEOL

Le immagini SEM del campione analizzato sono mostrate nelle figure 5.10.1.a e 5.10.1.b.

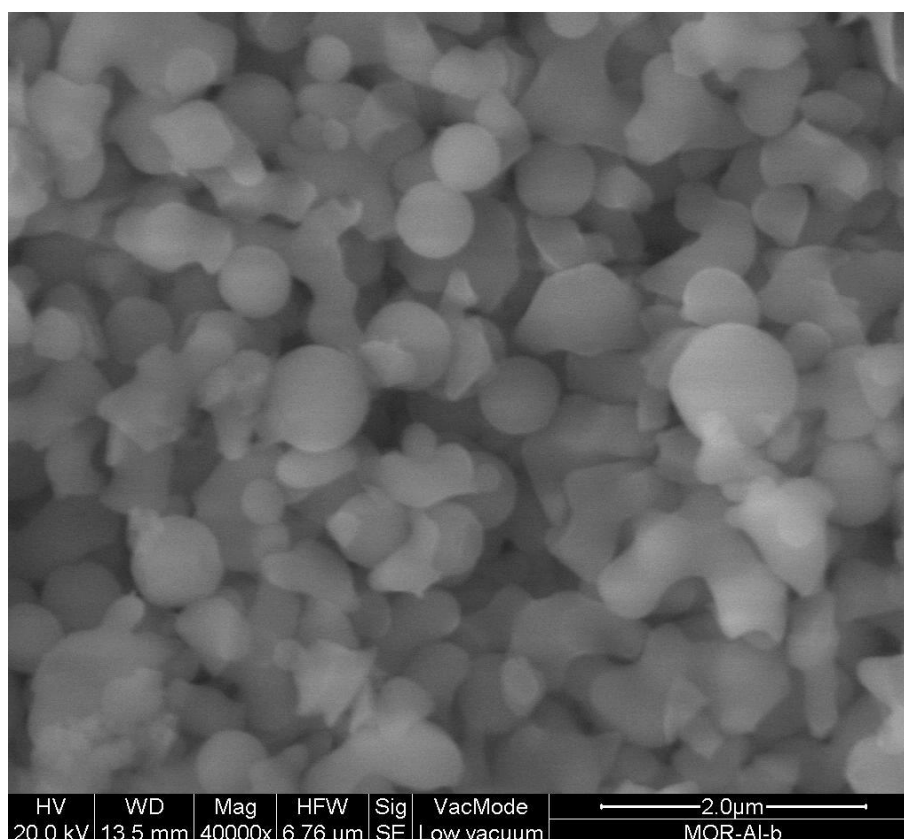


Figura 5.10.1.a Cristalli ZEOL.

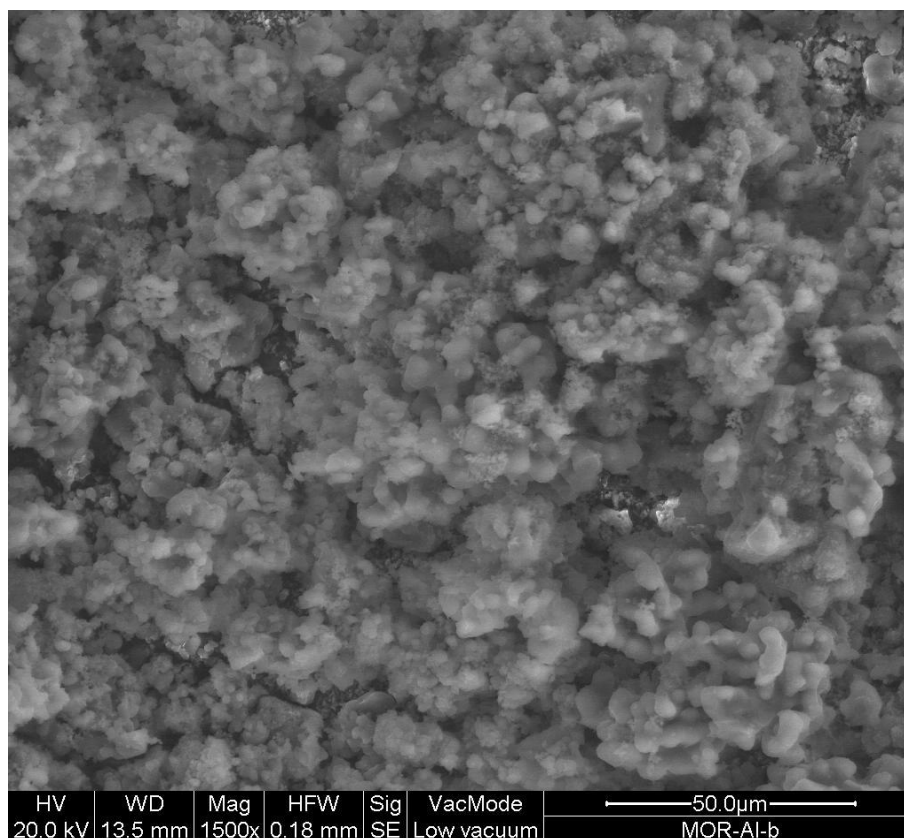


Figura 5.10.1.b Cristalli ZEOL.

La tabella 5.10.1.a mostra le variazioni di PZC del campione ZEOL al variare del tempo e della concentrazione.

Reazione	pH		
	Conc %	pH iniziale	pH finale
ZEOL	1	8,99	10,05
	5	9,42	10,55
	10	9,53	11,25
	20	9,76	11,50
	50	10,11	11,78

Tabella 5.10.1.a PZC del campione ZEOL.

La figura 5.10.1.c indica le variazioni del PZC.

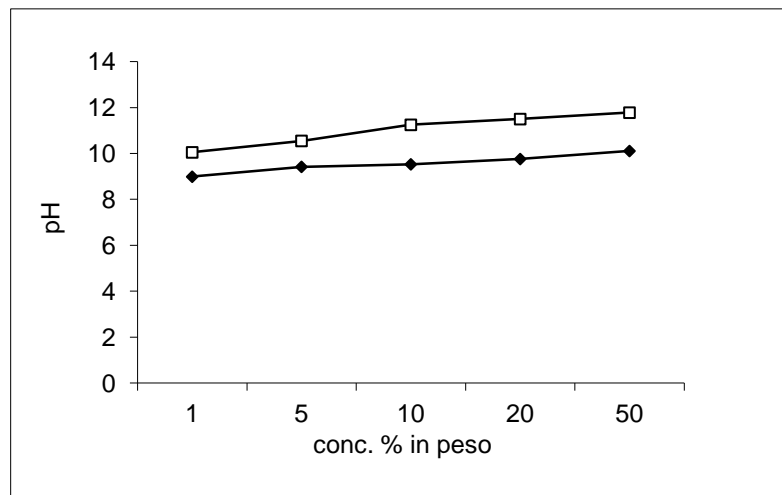


Figura 5.10.1.c Variazione del PZC della ZEOL.

La figura 5.10.1.d mostra i rapporti ponderali tra gli atomi presenti nei cristalli sintetizzati

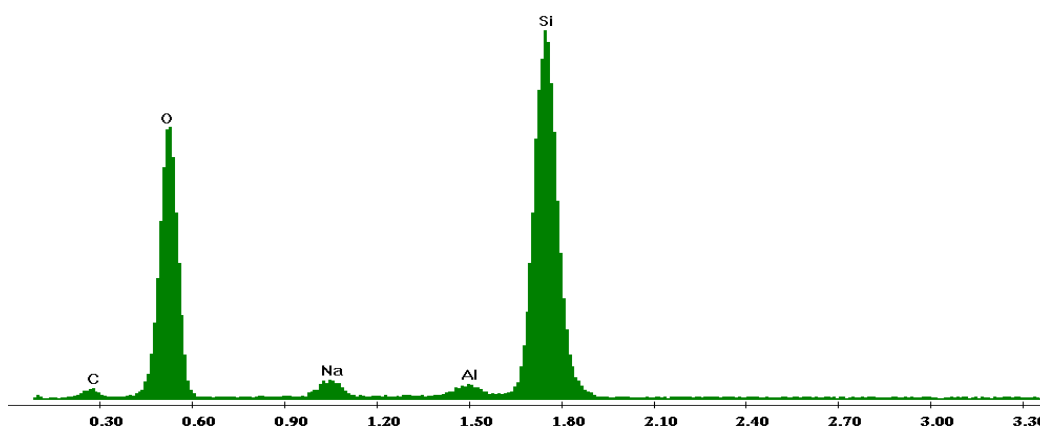


Figura 5.10.1.d EDX dei cristalli ZEOL.

I rapporti atomici ponderali sono riportati nella sottostante tabella:

<i>Elementi</i>	<i>Wt %</i>	<i>Rapporto ponderale</i>	
<i>Si</i>	<i>40,635</i>	<i>Si/Al</i>	<i>22,95</i>
<i>Al</i>	<i>1,77</i>	<i>Al/Na</i>	<i>0,50</i>
<i>Na</i>	<i>3,515</i>	<i>Si/Na</i>	<i>11,56</i>

Tabella 5.10.1.b Rapporti atomici ponderali dei cristalli ZEOL.

CAPITOLO 6

PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI SCAFFOLDS ZEOLITICI

6.1 Preparazione di Membrane Zeolitiche Pure

Le membrane pure, usate in questo lavoro come scaffolds, sono state preparate secondo il procedimento brevettato (P. Tavolaro, G. Martino, A. Tavolaro, PCT Patent 1095553, 2011; IT Patent CS 2010 A000003).

6.2 Preparazione di Membrane Zeolitiche Ibride

In questo lavoro di ricerca sono state preparate numerose membrane zeolitiche ibride a differente percentuale in peso di zeolite. Il polimero utilizzato è stato l'acido polilattico (PLA).

La metodologia utilizzata per la preparazione delle membrane ibride di zeolite e PLA è stata la seguente:

- Una quantità ben definita di cristalli è stata sospesa, sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente, nel cloroformio per impedire la formazione di aggregati cristallini zeolitici nella membrana.
- Una quantità ben definita di PLA è stata aggiunta alla sospensione in agitazione.
- La miscela è lasciata per 2 ore sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente allo scopo di meglio solubilizzare il PLA.
- La miscela è stata utilizzata per formare una membrana.
- La membrana è stata immersa in un bagno di coagulo etanologico.

Le membrane sono state realizzate per mezzo di stesura su supporti di vetro e il loro

spessore è stato calibrato attraverso un apposito coltello, chiamato Doctor Blade. Lo spessore delle membrane è stato fissato a 220 nm (membrane sottili).

Dopo la stesura del film polimerico, unito alla zeolite, sul supporto di vetro le membrane hanno subito due possibili trattamenti: alcune state immerse subito dopo la stesura in un bagno di coagulo a base di etanolo, mentre altre state immerse nel bagno di coagulo quando la membrana si è completamente asciugata in seguito all'evaporazione del solvente.

Nella figura 6.2.a vengono riportate, in modo schematico, gli stadi successivi che hanno portato alla formazione delle membrane zeolitiche ibride.

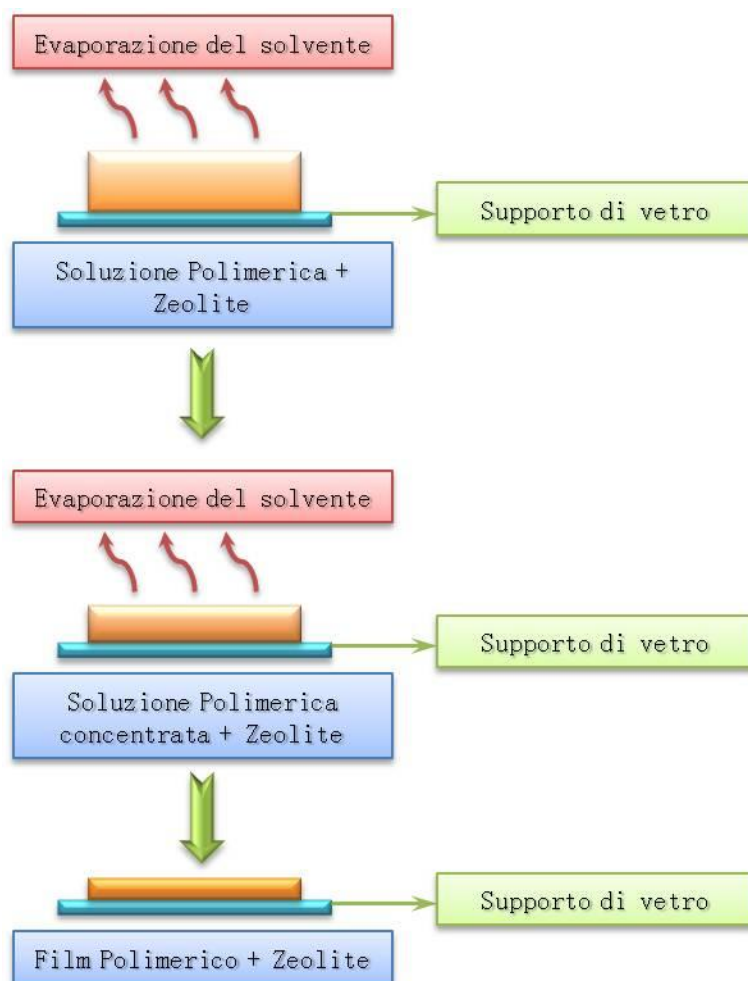


Figura 6.2.a Fasi di formazione delle membrane zeolitiche ibride

Sono state sintetizzate membrane ibride di:

- Sil-1 (MFI)
- N-Sil-1 (MFI)
- B-Sil-1 (MFI)
- Sil-2 (MEL)
- G-Sil-2 (MEL)
- ZeoL (LTL)
- LTL (LTL)
- MCM-41

6.2.1 Membrana G-Sil-2

Sono state preparate membrane di G-Silicalite-2 a tre diverse percentuali di concentrazione di cristalli zeolitici:

- G-Sil-2- 35% g/g
- G-Sil-2- 70% g/g
- G-Sil-2- 80% g/g

6.2.1.1 Caratterizzazione delle membrane G-Silicalite-2

Di seguito vengono descritte le caratterizzazioni chimico-fisiche effettuate in questo lavoro.

Analisi morfologica (SEM)

L'analisi ha permesso di avere informazioni sulla disposizione dei cristalli nel film della membrana polimerica.

Le figure 6.2.1.1 a e b mostrano le immagini ottenute al microscopio elettronico a scansione (SEM) relative alla sezione ed alla superficie della membrana G-Sil-2- 5% g/g.

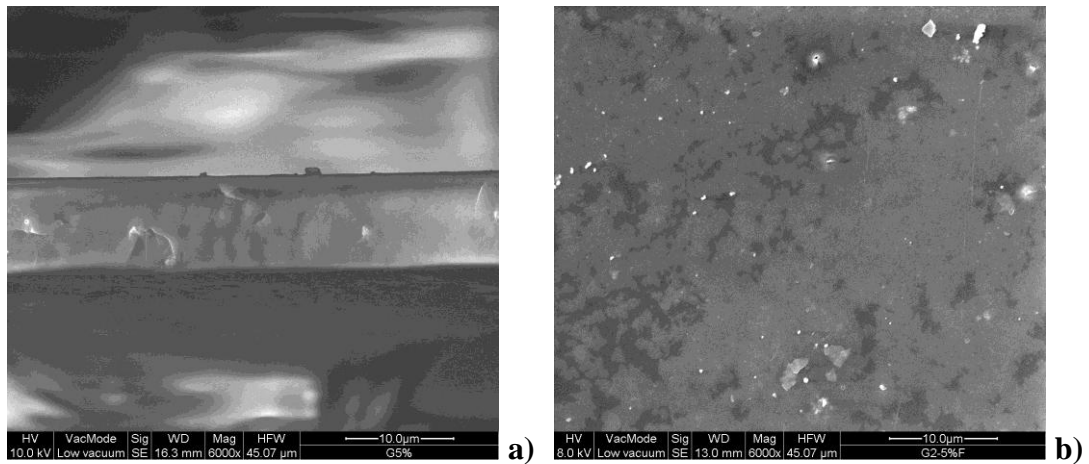


Figura 6.2.1.1 a) Sezione della G-Sil-2- 5% g/g (6000X), **b)** Superficie della G-Sil-2- 5% g/g (6000X)

Le figure 6.2.1.1 c e d mostrano le immagini ottenute al microscopio elettronico a scansione (SEM) relative alla sezione ed alla superficie della membrana G-Sil-2- 35% g/g.

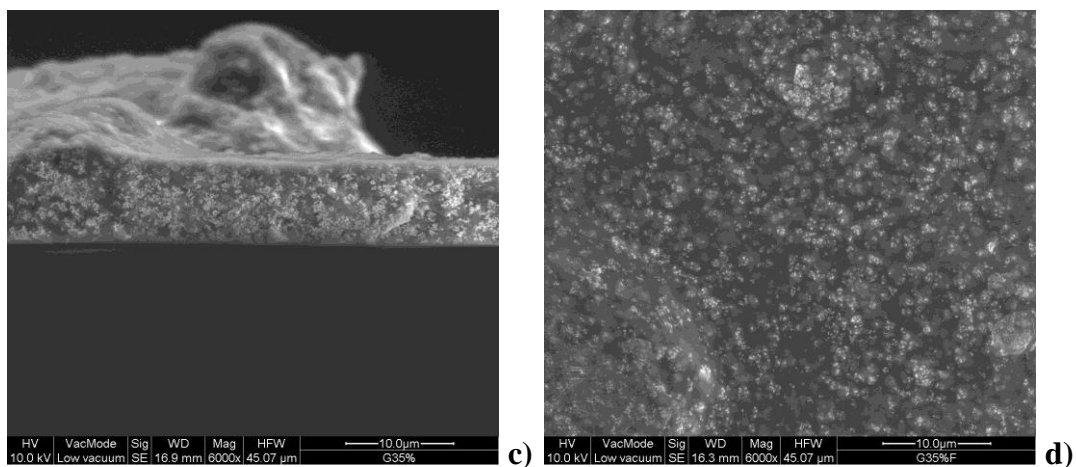


Figura 6.2.1.1 c) Sezione della G-Sil-2- 35% g/g (6000X), **d)** Superficie della G-Sil-2- 35% g/g (6000X)

Le figure 6.2.1.1 e ed f mostrano le immagini ottenute al microscopio elettronico a scansione (SEM) relative alla sezione ed alla superficie della membrana G-Sil-2- 60% g/g.

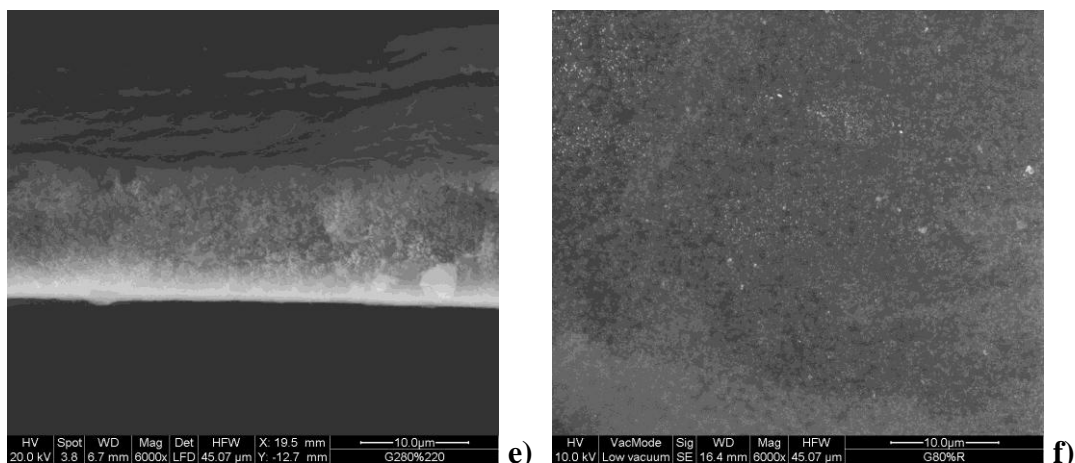


Figura 6.2.1.1 e) Sezione della G-Sil-2- 80% g/g (6000X), **f)** Superficie della G-Sil-2- 80% g/g (6000X)

Spessore delle Membrane

Lo spessore delle membrane aumenta all'aumentare della concentrazione di cristalli nel film polimerico.

MEMBRANA	SPESSORE
G-Sil-2- 5% g/g	0,020 mm
G-Sil-2- 35% g/g	0,025 mm
G-Sil-2- 80% g/g	0,056 mm

Tabella 6.2.1.1.a Spessori membrane

Angolo di Contatto

L'angolo di contatto permette di misurare l'idrofobicità o l'idrofilicità di una membrana. Valori $\geq 90^\circ$ indicano che la membrana è idrofilia, mentre valori $< 90^\circ$ indicano che la membrana è idrofobica.

MEMBRANA	ANGOLO DI CONTATTO
G-Sil-2- 5% g/g	73° (lato area) 71° (lato vetro)
G-Sil-2- 35% g/g	75° (lato area) 72° (lato vetro)
G-Sil- 2- 80% g/g	83° (lato area) 75° (lato vetro)

Tabella 6.2.1.1.b Angolo di Contatto delle membrane sintetizzate.

Prove Meccaniche

Le prove meccaniche di resistenza alla trazione rappresentano una caratteristica importante per valutare l'applicabilità delle membrane preparate. Un importante parametro è rappresentato dal *modulo di Young*:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

dove σ = forza applicata / area di applicazione (misurata in [Pascal](#))
e ϵ = allungamento relativo (adimensionale)

G-Sil-2- 35% g/g		S0	EMod	Rm	Rm 2	{epsilon} Break	
Legends	Nr	mm ²	N/mm ²	N/mm ²	N	%	
	1	0,25	801,26	5,86	1,46	0,66	
	2	0,52	463,02	7,3	3,79	1,69	
	3	0,25	835,78	11,95	2,99	1,37	
			700,020	8,370	2,747	1,240	Media
			168,176	2,599	0,967	0,430	Std. Dev

Tabella 6.2.1.1.c Prove meccaniche G-Sil-2- 35% g/g.

G-Sil-2- 80% g/g		S0	EMod	Rm	Rm 2	{epsilon} Break	
Legends	Nr	mm ²	N/mm ²	N/mm ²	N	%	
	1	0,56	772,19	9,76	5,47	1,43	
	2	0,56	754,48	7,75	4,34	1,06	
	3	0,56	877	8,65	4,84	0,98	
			801,223	8,720	4,883	1,157	Media
			54,068	0,822	0,462	0,196	Std. Dev

Tabella 6.2.1.1.d Prove meccaniche G-Sil-2- 80% g/g.

Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia FT-IR permette di ottenere informazioni sull'interazione tra la fase polimerica e quella zeolitica.

Poiché lo spettro IR di una determinata molecola è essenzialmente dato dalla sovrapposizione di bande di assorbimento di specifici gruppi funzionali della molecola stessa, è possibile riconoscere i vari frammenti molecolari, che una volta assemblati, permettono di conoscere la struttura totale. La figura 6.3.1.5a mostra l'immagine relativa allo spettro FT-IR della membrana G-Sil-2- 80% g/g.

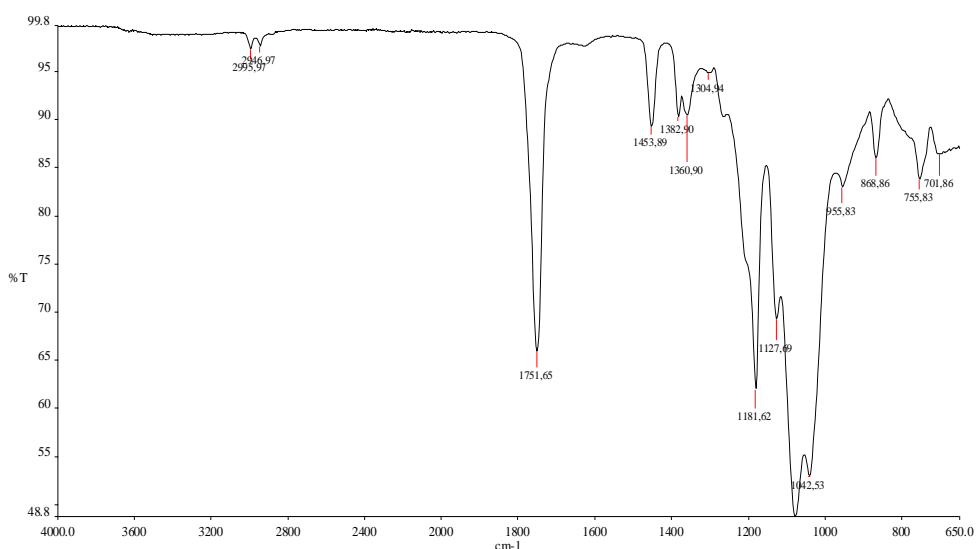


Figura 6.2.1.1.g Spettro FT-IR della membrana G-Sil-2- 80% g/g.

ATR-FTIR

La figura 6.2.1.1.h mostra l'immagine relativa all'analisi ATR della membrana di G-Sil-2- 80% g/g.

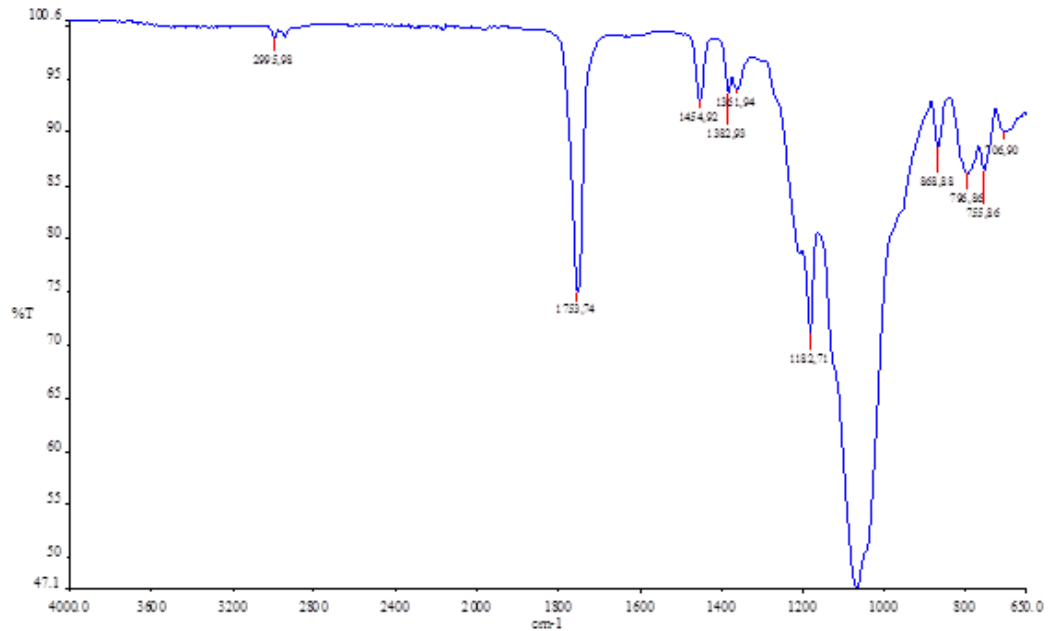


Figura 6.2.1.1.h Immagine ATR della G-Sil-2- 80% g/g.

Microscopia a forza atomica (AFM)

Le figure 6.2.1.1.i (a e b) mostrano le immagini relative all'analisi AFM delle membrane G-Sil-2- 5% g/g e 80% g/g.

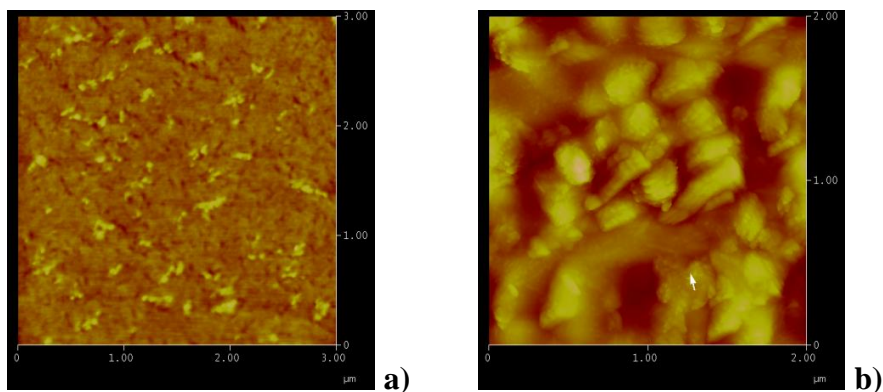


Figura 6.2.1.1.i Immagini AFM **a)** Membrana di G-Sil-2- 5% g/g, **b)** Membrana di G-Sil-2- 80% g/g

Nella tabella 6.2.1.1.e sono riportati i valori di rugosità delle membrane G-Sil-2- 5% g/g e G-Sil-2- 80% g/g ottenuti attraverso l'analisi di microscopia a forza atomica (AFM).

Rugosità superficie membrana al 5% g/g	Rugosità superficie membrana al 80% g/g
- 4,215	- 36,852
- 6,246	- 40,211
- 5,108	- 55,592
- 3,214	- 52,400

Tabella 6.2.1.1.e Valori di rugosità ottenuti mediante AFM.

6.2.2 Membrane MCM-41

Sono state preparate membrane di MCM-41 a tre differenti percentuali in peso di cristalli zeolitici:

- MCM-41- 5% g/g
- MCM-41- 35% g/g
- MCM-41- 80% g/g

6.2.2.1 Caratterizzazione delle membrane MCM-41

Analisi morfologica (SEM)

Le figure 6.2.2.1 a e b mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana MCM-41- 5% g/g.

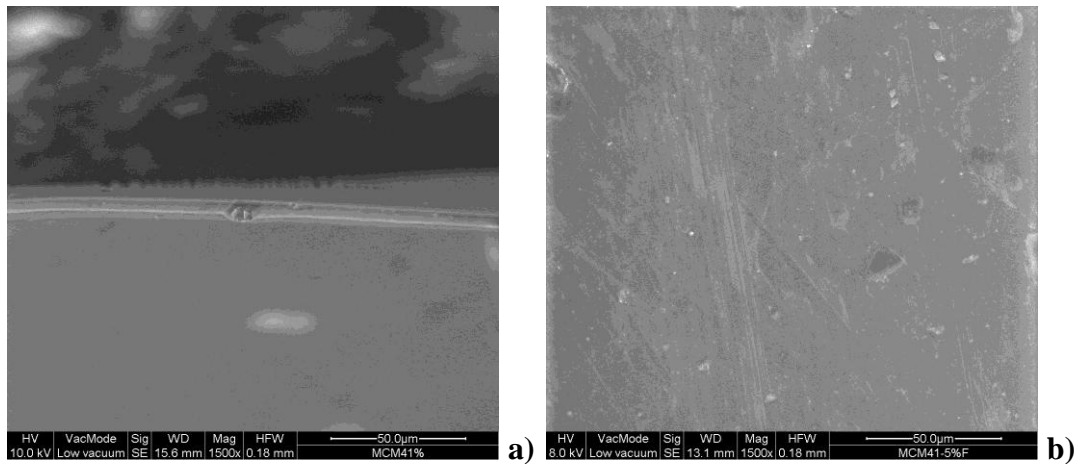


Figura 6.2.2.1 a) Sezione della MCM-41- 5% g/g (1500X), **b)** Superficie della MCM-41- 5% g/g (1500X)

Le figure 6.2.2.1 c) e d) mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana MCM-41- 35% g/g.

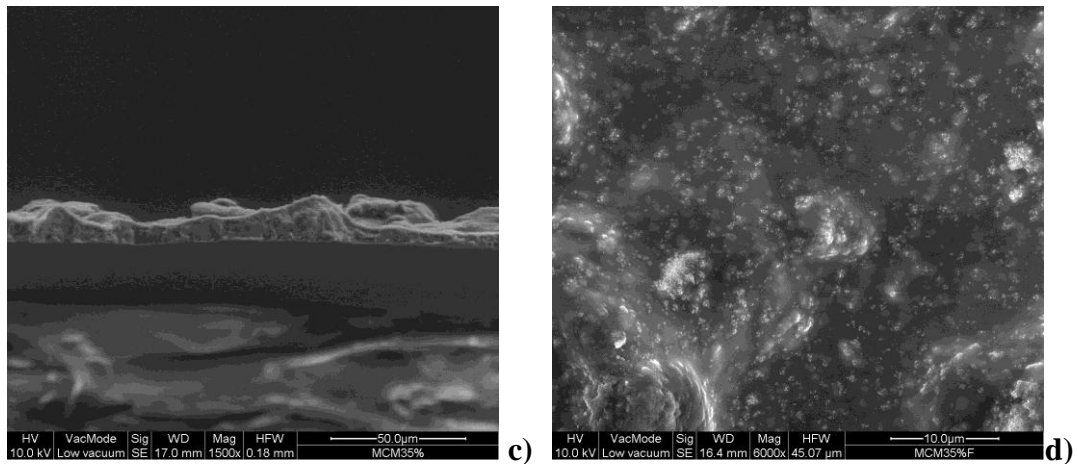


Figura 6.2.2.1 c) Sezione della MCM-41- 35% g/g (1500X), **d)** Superficie della MCM-41- 35% g/g (6000X)

Le figure 6.2.2.1 e ed f) mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana MCM-41- 80% g/g.

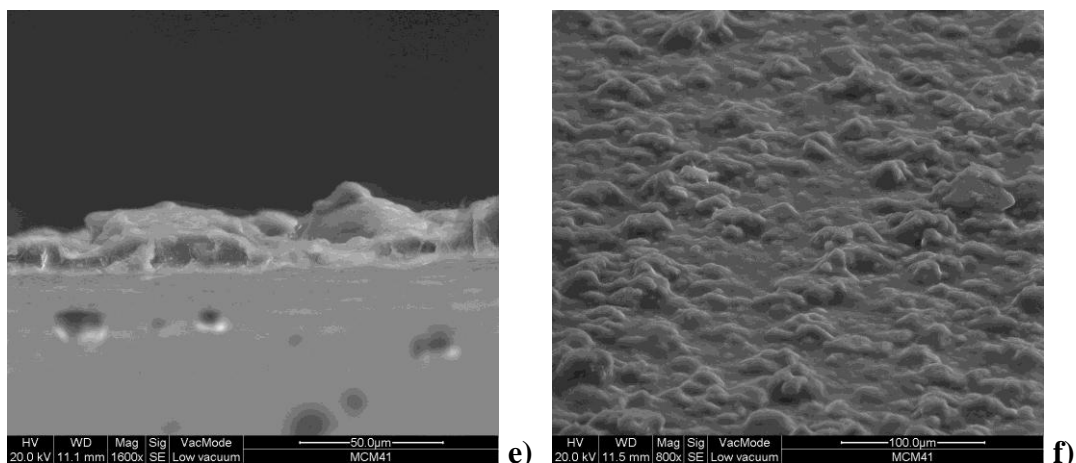


Figura 6.2.2.1 e) Sezione della MCM-41- 80% g/g (1600X), **f)** Superficie della MCM-41- 80% g/g (800X)

Spessore Membrane

MEMBRANA	SPESSORE
MCM-41- 5% g/g	0,021 mm
MCM-41 35% g/g	0,026 mm
MCM-41 80% g/g	0,048 mm

Tabella 6.2.2.1.a Spessori membrane.

Angolo di Contatto

MEMBRANA	ANGOLO DI CONTATTO
MCM-41 5% g/g	79° (lato area) 70° (lato vetro)
MCM-41 -35% g/g	84° (lato area) 73° (lato vetro)
MCM-41 -80% g/g	86° (lato area) 72° (lato vetro)

Tabella 6.2.2.1.b Angolo di Contatto membrane.

Prove Meccaniche

MCM-41 -35% g/g							
		S0	EMod	Rm	Rm 2	{epsilon} Break	
Legends	Nr	mm ²	N/mm ²	N/mm ²	N	%	
	1	0,26	1240,06	21,25	5,52	1,74	
	2	0,26	1832,2	31,27	8,13	1,92	
	4	0,26	1631,88	26,87	6,99	1,72	
			1568,047	26,463	6,880	1,793	Media
			245,918	4,101	1,068	0,090	Std. Dev

Tabella 6.2.2.1.c Prove meccaniche MCM-41 - 35% g/g

Spettroscopia FT-IR

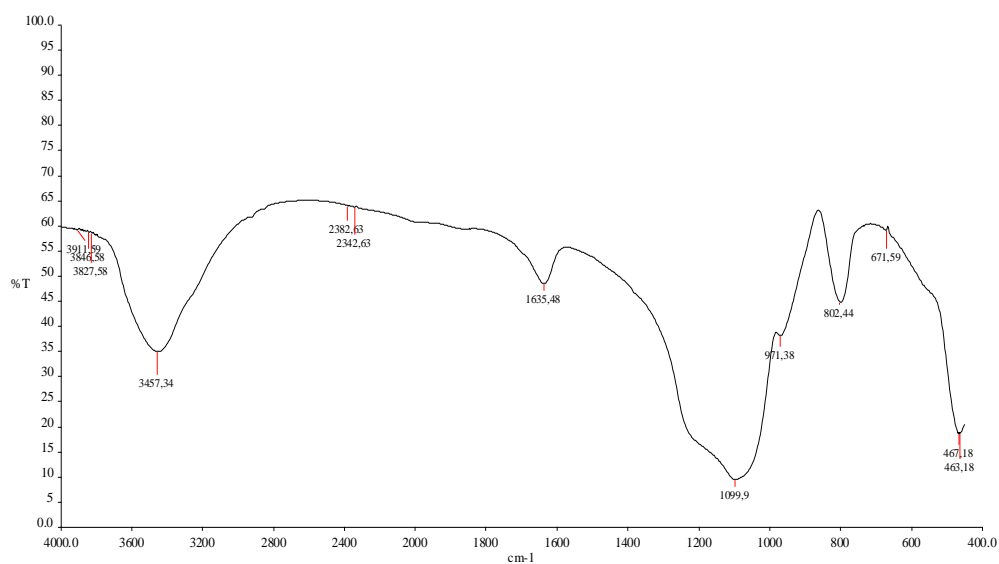


Figura 6.2.2.1.g Spettro FT-IR della membrana MCM-41 -80% g/g

Microscopia a forza atomica (AFM)

La figura 6.4.1.6 a) mostrano le immagini relative all'analisi AFM delle membrane MCM-41 -5% g/g.

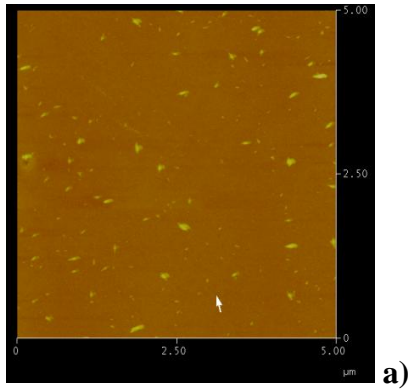


Figura 6.2.2.1.h Immagini AFM della Membrana di MCM-41 -5% g/g

Nella tabella 6.2.2.1.d sono riportati i valori di rugosità delle membrane MCM 41 5% g/g ottenuti attraverso l'analisi di microscopia a forza atomica (AFM).

Rugosità membrana al 5% g/g	superficie
- 2,050	
- 2,211	
- 2,306	
- 2,069	

Tabella 6.2.2.1.d. Valori di rugosità ottenuti mediante AFM.

ATR-FTR

La figura 6.2.2.1.i a mostra l'immagine relativa all'analisi ATR della membrana di MCM-41 -80% g/g.

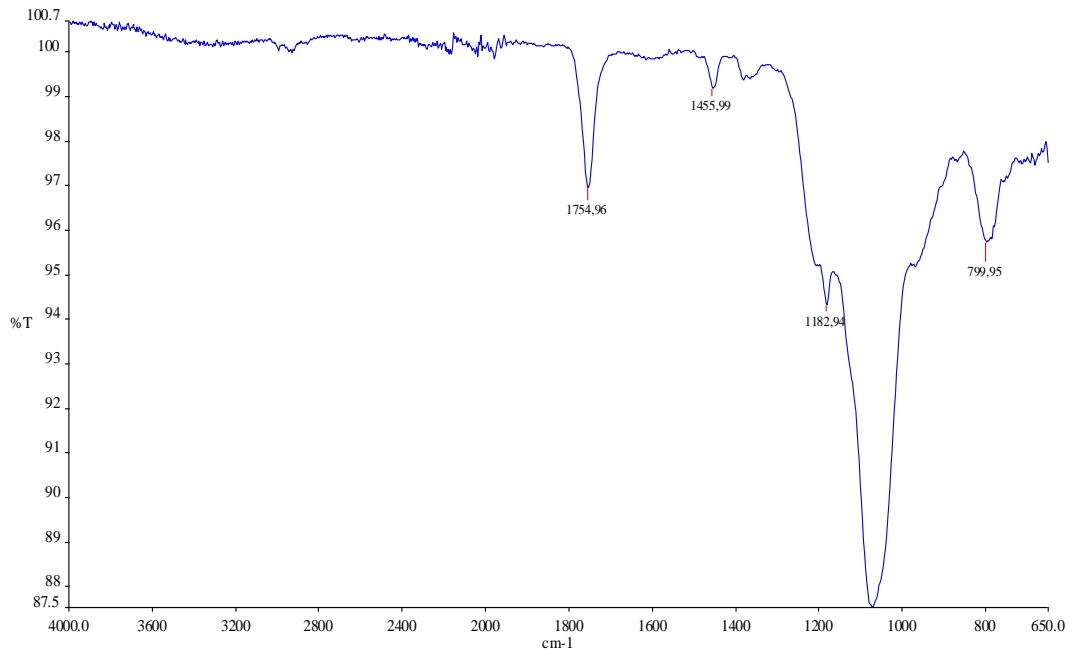


Figura 6.2.2.1.i Immagine ATR della MCM-41- 80% g/g.

6.2.3 Membrane ZeoL

Sono state preparate membrane di ZeoL a tre diverse percentuali di concentrazione di cristalli zeolitici:

- ZeoL -5% g/g
- ZeoL -35% g/g
- ZeoL -80% g/g

6.2.3.1. Caratterizzazione delle membrane ZeoL

Analisi morfologica (SEM)

Le figure 6.2.3.1 a e b mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana ZeoL -5% g/g.

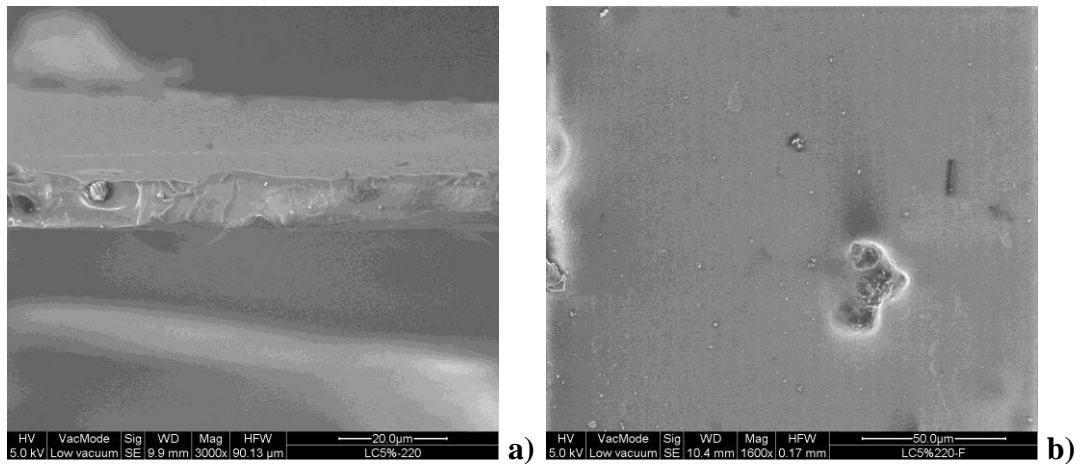


Figura 6.2.3.1 a) Sezione della ZeoL- 5% g/g (3000X), **b)** Superficie della ZeoL- 5% g/g (1600X)

Le figure 6.2.3.1. c e d mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana ZeoL -35% g/g.

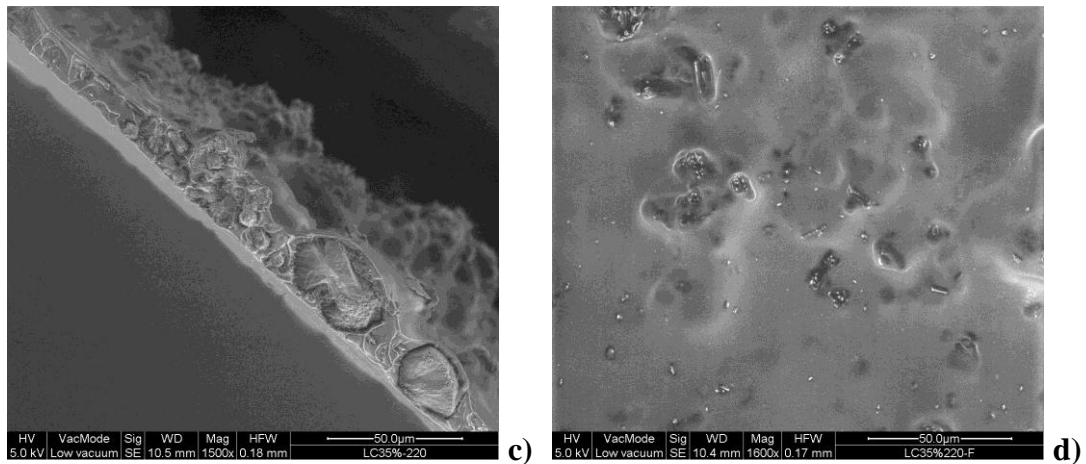


Figura 6.2.3.1 c) Sezione della ZeoL -35% g/g (1500X), **d)** Superficie della ZeoL -35% g/g (1600X)

Le figure 6.2.3.1 e ed f mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana ZeoL -80% g/g.

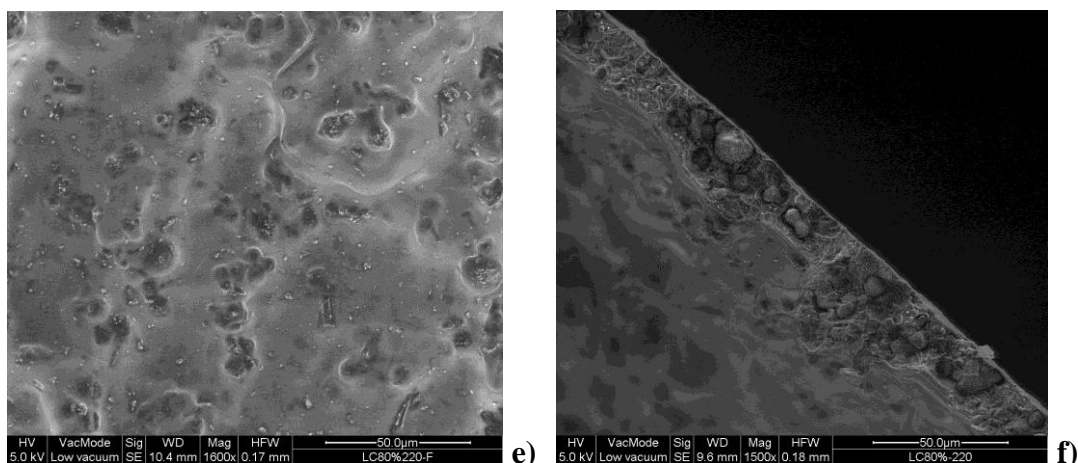


Figura 6.2.3.1 e) Sezione della ZeoL -80% g/g (1600X), **f)** Superficie della ZeoL -80% g/g (1500X)

Spessore delle Membrane

Lo spessore delle membrane aumenta all'aumentare della concentrazione di cristalli nel film polimerico.

MEMBRANA	SPESORE
ZeoL- 5% g/g	0,027 mm
ZeoL -35% g/g	0,032 mm
ZeoL -80% g/g	0,054 mm

Tabella 6.2.3.1.a Spessori membrane

Angolo di Contatto

MEMBRANA	Angolo di contatto
ZeoL -5% g/g	77° (lato area)
	73° (lato vetro)
ZeoL -35% g/g	80° (lato area)
	75° (lato vetro)
ZeoL -80% g/g	82° (lato area)
	77° (lato vetro)

Tabella 6.2.3.1.b Angolo di Contatto membrane

Microscopia a forza atomica (AFM)

Le figure 6.2.3.1.g a, b e c mostrano le immagini relative all'analisi AFM delle membrane ZeoL -5% g/g, 35% g/g e 80% g/g.

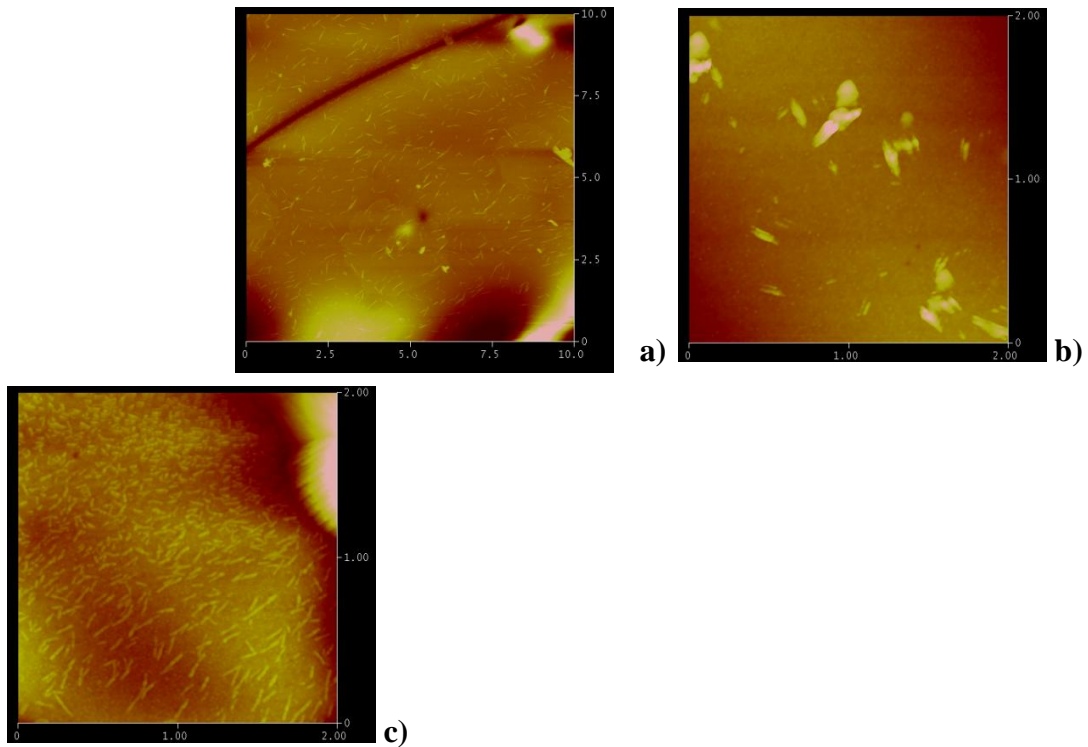


Figura 6.2.3.1.g Immagini AFM a) Membrana di ZeoL -5% g/g, b) Membrana di ZeoL -35% g/g c) Membrana di ZeoL -80% g/g

Nella tabella 6.2.3.1.c sono riportati i valori di rugosità delle membrane ZeoL- 5% g/g, ZeoL- 35% g/g e ZeoL -80% g/g ottenuti attraverso l'analisi di microscopia a forza atomica (AFM).

Rugosità superficie membrana al 5% g/g	Rugosità superficie membrana al 35% g/g	Rugosità superficie membrana al 80% g/g
- 2,831	- 3,199	- 3,7
- 2,724	- 3,018	- 7,5
- 2,399	- 3,173	- 10,8
- 3,532	- 2,678	- 43,5

Tabella 6.2.3.1.c Valori di rugosità ottenuti mediante AFM

ATR-FTR

La figura 6.2.3.1.h mostra l'immagine relativa all'analisi ATR della membrana di ZeoL-80% g/g.

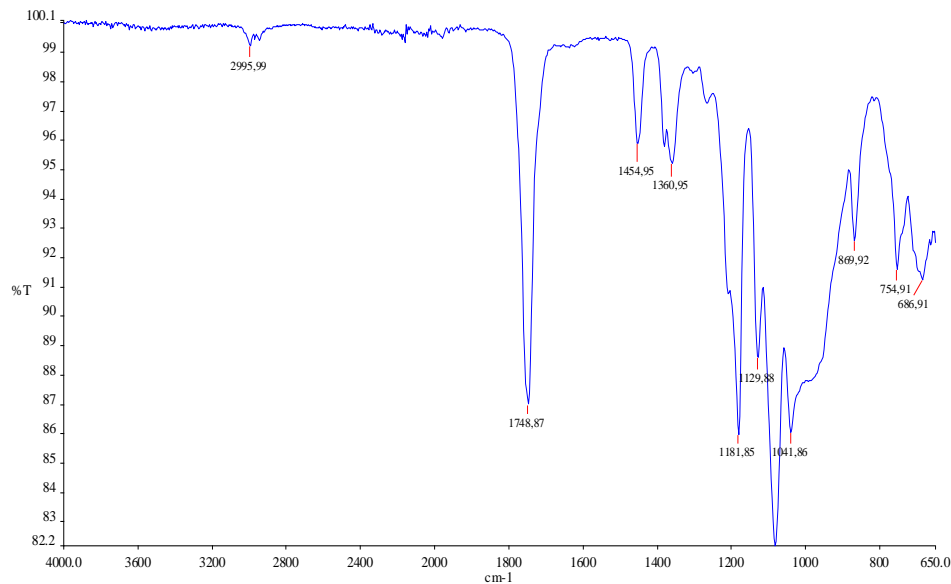


Figura 6.2.3.1.h Immagine ATR della ZeoL- 80% g/g

6.2.4.Membrane B-Sil-1

Sono state preparate membrane di B-Sil-1 a tre diverse percentuali di concentrazione di cristalli zeolitici:

- B-Sil-1 -5% g/g
- B-Sil-1 -35% g/g
- B-Sil-1 -80% g/g

6.2.4.1 Caratterizzazione delle membrane B-Sil-1

Analisi morfologica (SEM)

Le figure 6.2.4.1. a e b mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana B-Sil-1 -5% g/g.

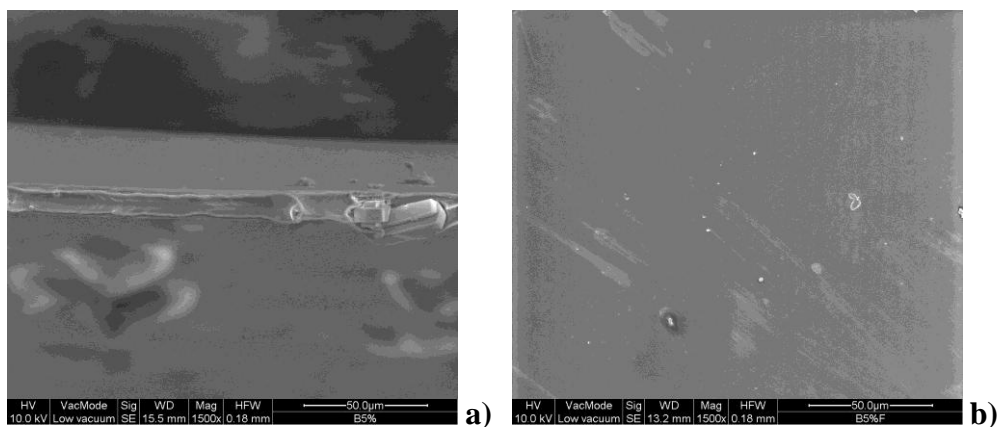


Figura 6.2.4.1 a) Sezione della B-Sil-1 -5% g/g (1500X), **b)** Superficie della B-Sil-1 -5% g/g (1500X)

Le figure 6.2.4.1 c e d mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana B-Sil-1 -35% g/g.

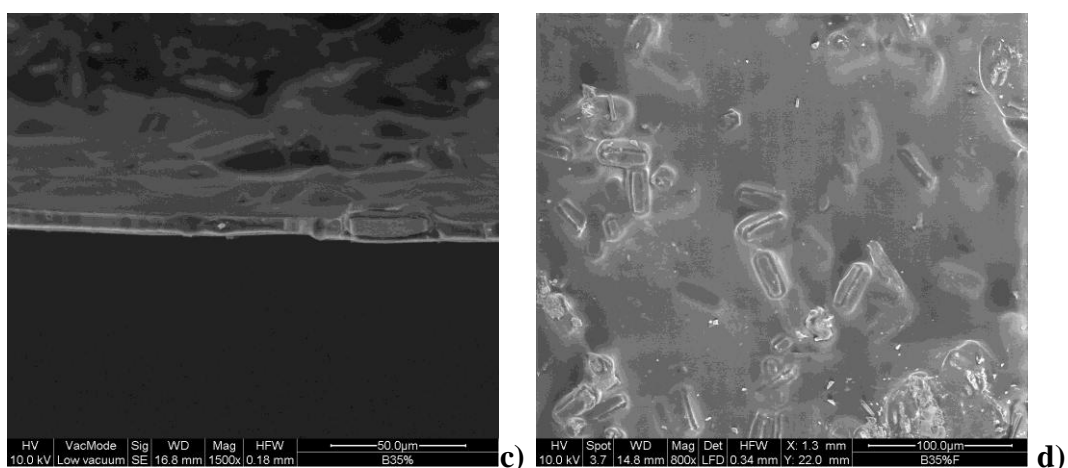


Figura 6.2.4.1 c) Sezione della B-Sil-1 -35% g/g (1500X), **d)** Superficie della B-Sil-1 -35% g/g (800X)

Le figure 6.2.4.1 e ed f mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana B-Sil-1- 80% g/g.

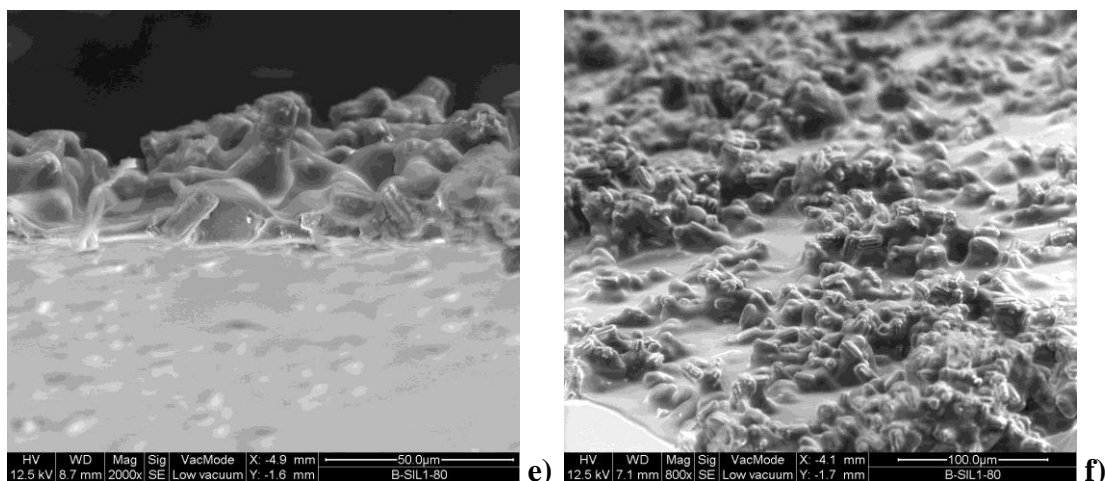


Figura 6.2.4.1. e) Sezione della B-Sil-1- 80% g/g (2000X), f) Superficie della B-Sil-1 - 80% g/g (800X)

Spessore delle Membrane

Lo spessore delle membrane aumenta all'aumentare della concentrazione di cristalli nel film polimerico.

MEMBRANA	SPESSORE
B-Sil-1 -5% g/g	0,028 mm
B-Sil-1 -35% g/g	0,029 mm
B-Sil-1 -80% g/g	0,051 mm

Tabella 6.2.4.a Spessori membrane

Angolo di Contatto

MEMBRANA	Angolo di contatto
B-Sil-1 -5% g/g	76° (lato area)
	75° (lato vetro)
B-Sil-1 -35% g/g	73° (lato area)
	70° (lato vetro)
B-Sil-1 -80% g/g	75° (lato area)
	77° (lato vetro)

Tabella 6.2.4.1.b Angolo di Contatto delle membrane.

Prove Meccaniche

B-Sil-1 -80% g/g		S0	EMod	Rm	Rm 2	{epsilon}	
Legends	Nr	mm ²	N/mm ²	N/mm ²	N	Break %	
	1	0,5	225,28	4,87	2,43	4,8	
	2	0,5	196,93	4,37	2,18	3,86	
	3	0,5	229,81	4,78	2,39	4,21	
			217,340	4,673	2,333	4,290	Media
			14,550	0,218	0,110	0,388	Std. Dev

Tabella 6.2.4.1.c Prove meccaniche B-Sil-1- 80% g/g.

Microscopia a forza atomica (AFM)

Le figure 6.2.4.1.g a e b mostrano le immagini relative all'analisi AFM delle membrane B-Sil-1 -5% g/g e 80% g/g.

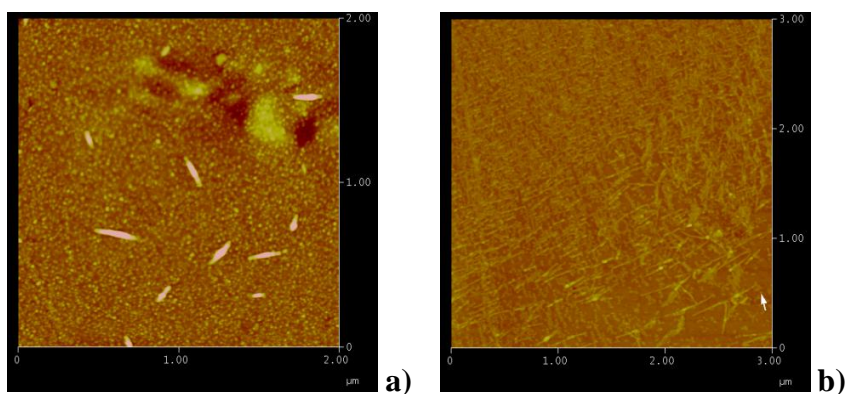


Figura 6.2.4.1.d Immagini AFM a) Membrana di B-Sil-1- 5% g/g, b) Membrana di B-Sil-1- 80% g/g

Nella tabella 6.2.4.1.d sono riportati i valori di rugosità delle membrane B-Sil-1- 5% g/g e B-Sil-1- 80% g/g ottenuti attraverso l'analisi di microscopia a forza atomica (AFM).

Rugosità superficie membrana al 5% g/g	Rugosità superficie membrana al 80% g/g
- 1,669	- 2,617
- 1,503	- 2,027
- 1,878	- 2,427
- 1,550	- 2,521

Tabella 6.2.4.1.d Valori di rugosità ottenuti mediante AFM.

6.2.5 Membrane LTL

Sono state preparate membrane di LTL a due diverse percentuali di concentrazione di cristalli zeolitici:

- LTL -70% g/g
- LTL -80% g/g

6.2.5.1 Caratterizzazione delle membrane LTL

Analisi morfologica (SEM)

Le figure 6.2.5.1 a e b mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana LTL -80% g/g.

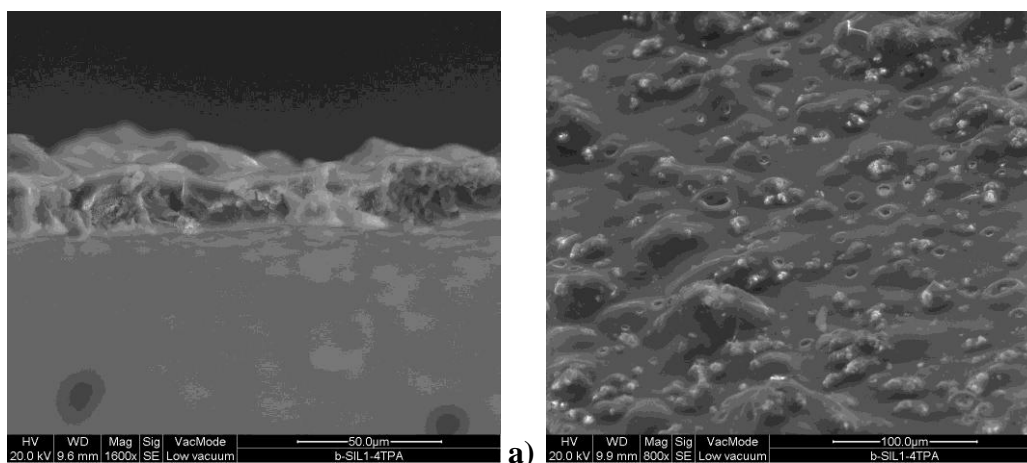


Figura 6.2.5.1.h a) Sezione della LTL -80% g/g (1600X) b) Superficie della LTL- 80%

g/g (800X)

Spessore delle Membrane

Lo spessore delle membrane aumenta all'aumentare della concentrazione di cristalli nel film polimerico.

MEMBRANA	SPESSORE
LTL-70% g/g	0,037 mm
LTLr- 80% g/g	0,055 mm

Tabella 6.2.5.1.a Spessori delle Membrane.

Angolo di Contatto

MEMBRANA	Angolo di contatto
LTL -70% g/g	82° (lato area)
	74° (lato vetro)
LTL -80% g/g	79° (lato area)
	77° (lato vetro)

Tabella 6.2.5.1.b Angolo di contatto delle Membrane.

6.2.6 Membrane N-Sil-1

Sono state preparate membrane di N-Sil-1 a tre diverse percentuali di concentrazione di cristalli zeolitici:

- N-Sil-1 -5% g/g
- N-Sil-1 -35% g/g
- N-Sil-1 -80% g/g

6.2.6.1 Caratterizzazione delle membrane N-Sil-1

Analisi morfologica (SEM)

Le figure 6.2.6.1 a e b mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della

membrana N-Sil-1 5% g/g.

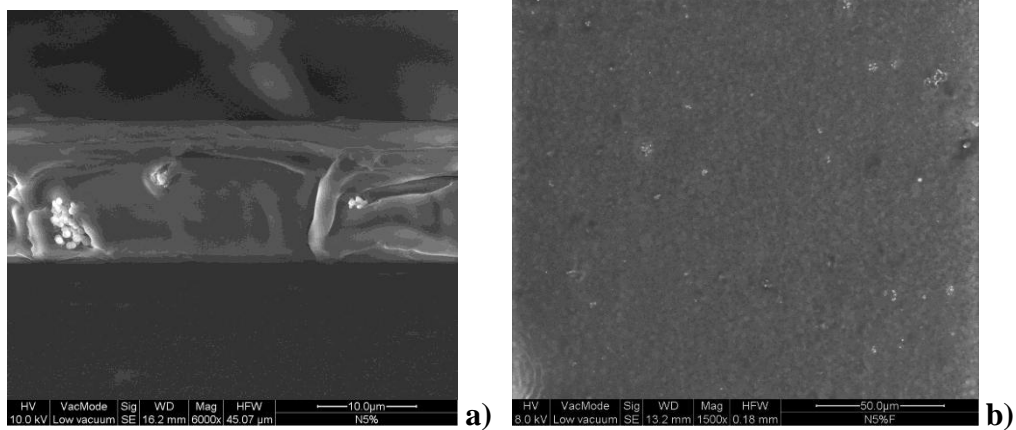


Figura 6.2.6.1. a) Sezione della N-Sil-1 -5% g/g (6000X), **b)** Superficie della N-Sil-1 -5% g/g (1500X)

Le figure 6.2.6.1. c) e d) mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana N-Sil-1 -35% g/g.

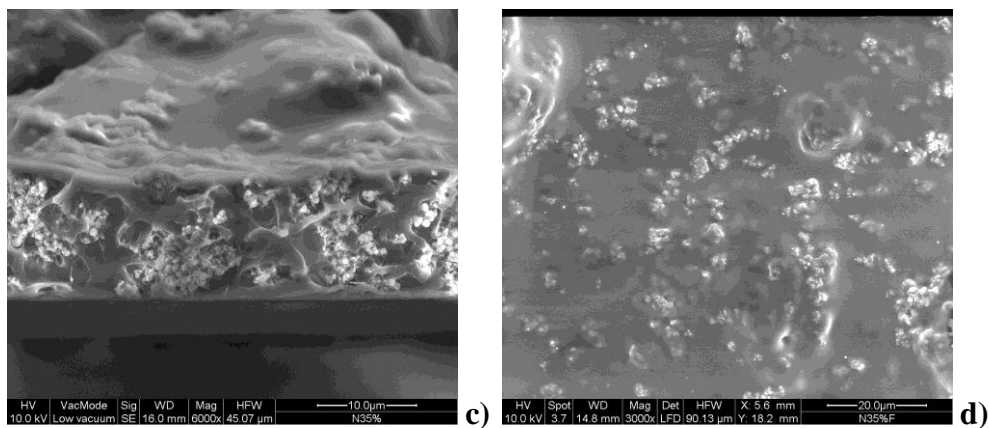


Figura 6.2.6.1. c) Sezione della N-Sil-1 -35% g/g (6000X), **d)** Superficie della N-Sil-1 -35% g/g (3000X)

Le figure 6.2.6.1. e ed f mostrano le immagini relative alla sezione ed alla superficie della membrana N-Sil-1 -80% g/g.

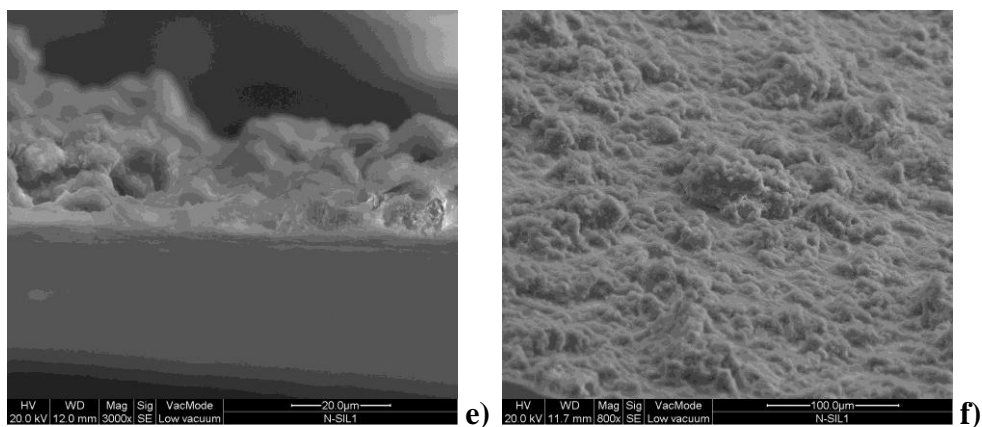


Figura 6.2.6.1 e) Sezione della N-Sil-1 -80% g/g (3000X), **f)** Superficie della N-Sil-1 -80% g/g (800X)

Spessore delle Membrane

MEMBRANA	SPESSORE
N-Sil-1 -5% g/g	0,030 mm
N-Sil-1 -35% g/g	0,042 mm
N-Sil-1 -80% g/g	0,050 mm

Tabella 6.2.6.1.a Spessori delle membrane.

Angolo di Contatto

MEMBRANA	Angolo di contatto
N-Sil-1 -5% g/g	73° (lato area)
	78° (lato vetro)
N-Sil-1 -35% g/g	80° (lato area)
	77° (lato vetro)
N-Sil-1 -80% g/g	80° (lato area)
	77° (lato vetro)

Tabella 6.2.6.1.b Angolo di Contatto delle membrane

Prove Meccaniche

N-Sil-1 -80% g/g		S0	EMod	Rm	Rm 2	{epsilon} Break	
Legends	Nr	mm ²	N/mm ²	N/mm ²	N	%	
	1	0,27	451,85	5,09	1,37	2,22	
	2	0,27	589,54	6,19	1,67	1,83	
	3	0,27	504,17	5,44	1,47	2,1	
			515,187	5,573	1,503	2,050	Media
			56,749	0,459	0,125	0,163	Std. Dev

Tabella 6.2.6.1.c Prove meccaniche N-Sil-1 -80% g/g.

CAPITOLO 7

ADESIONE CELLULARE DELLE DUE LINEE TUMORALI MCF-7 E MDA-MB-231 IN COLTURA SU MEMBRANE ZEOLITICHE PURE ED IBRIDE

7.1 Introduzione

Numerose sono le membrane polimeriche utilizzate quali scaffolds per colture cellulari e test in vitro, che vengono adoperate con successo per la loro facilità di preparazione, maneggiabilità e basso costo di produzione. Tali membrane polimeriche e, più in generale, i polimeri che le compongono (tra i quali l'acido polilattico – PLA), seppure oggi rappresentino il materiale d'elezione per protesi o inserzioni ortopediche, non sono state ancora oggetto di studi sistematici in relazione alle loro interazioni con cellule tumorali.

Allo scopo di ottenere informazioni che consentano di individuare nuove membrane sempre più biocompatibili e idonee alla crescita e differenziazione cellulare e che allo stesso tempo non esaltino le potenzialità metastatizzanti delle cellule, sono state studiate le interazioni tra le cellule di due linee di tumore mammario umano (MCF-7 e MDA-MB-231) e numerose, nuove, differenti membrane zeolitiche pure e ibride.

La biocompatibilità delle membrane è stata valutata mediante coltura cellulare delle due linee tumorali sugli scaffolds le cui superfici di interazione possiedono differenti e modulabili caratteristiche chimico-fisiche quali: il framework cristallino, l'acidità superficiale (PZC), l'idrofilicità e la rugosità.

E' stata, inoltre, condotta un'indagine per mezzo della microscopia elettronica allo scopo di valutare se e come i cambiamenti morfologici delle cellule in adesione sulle membrane sintetiche dipendano dalle diverse proprietà chimico-fisiche e strutturali dei materiali usati.

Poiché l'adattamento morfologico e, in particolare, la riorganizzazione del citoscheletro

della cellula avviene nelle prime ore di coltura, l'adesione e le funzioni specifiche cellulari sono state studiate dopo quattro ore di incubazione.

E' stata, infine, valutata la vitalità delle cellule in coltura sulle diverse membrane in funzione della quantità di cellule adese per unità di superficie.

7.2 Adesione cellulare di due linee di tumore mammario umano MCF-7 e MDA-MB-231

Per lo studio dell'interazione cellulare con le membrane sintetizzate in questo lavoro, è stato usato il test di adesione cellulare. Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 10×10^4 cell/ml sulle membrane adagiate sul fondo di piastre multiwell da ventiquattro pozzetti. A tale scopo, tutte le membrane, pure e ibride, sono state realizzate con un diametro pari a 13 mm. La necessità di ottenere tali dischi a membrana ha comportato lo studio per la realizzazione di un opportuno dispositivo per la formatura delle membrane zeolitiche pure.

La superficie di membrana studiata è stata pari a $1,327 \text{ cm}^2$. Naturalmente, a parità di superficie di membrana, le membrane zeolitiche ibride posseggono una differente densità e quindi una maggiore galleggiabilità delle stesse, rispetto alle membrane zeolitiche pure, nei mezzi di coltura. Per ovviare a tale inconveniente sono stati selezionati o-ring in Viton e su di essi sono stati effettuati i test di biotossicità, biocompatibilità e degradabilità del materiale.

Allo scopo, poi, di ottenere dati utili per il confronto delle caratteristiche d'interazione tra le cellule e le membrane sintetiche, per tutti i test in vitro eseguiti sono state selezionate piastre multiwell prive di alcuna funzionalizzazione superficiale per l'adesione cellulare.

L'adesione cellulare è stata calcolata come la differenza tra il numero di cellule libere nel mezzo di coltura ritrovate dopo quattro ore rispetto al numero di cellule seminate all'inizio dell'esperimento.

Le membrane zeolitiche sintetiche pure usate in questo lavoro sono:

- ZEOA
- Sil-2
- G-Sil2

- Sil-2C6
- 5A
- MCM41

Le membrane zeolitiche ibride usate in questo lavoro sono:

- N-Sil-1 70%
- MCM41 35%
- MCM41 80%
- GSil-2 70%
- LTL 35%
- PLA
- PET

Gli istogrammi relativi all'adesione delle cellule MCF-7 su membrane zeolitiche pure, e su quelle ibride sono riportate, rispettivamente, nelle figure 7.2.a e 7.2.b.

Gli istogrammi relativi all'adesione delle cellule MDA-MB su membrane zeolitiche pure, e su quelle ibride sono riportate, rispettivamente, nelle figure 7.2.c e 7.2.d.

I risultati cumulativamente sono rappresentati in figura 7.2.e.

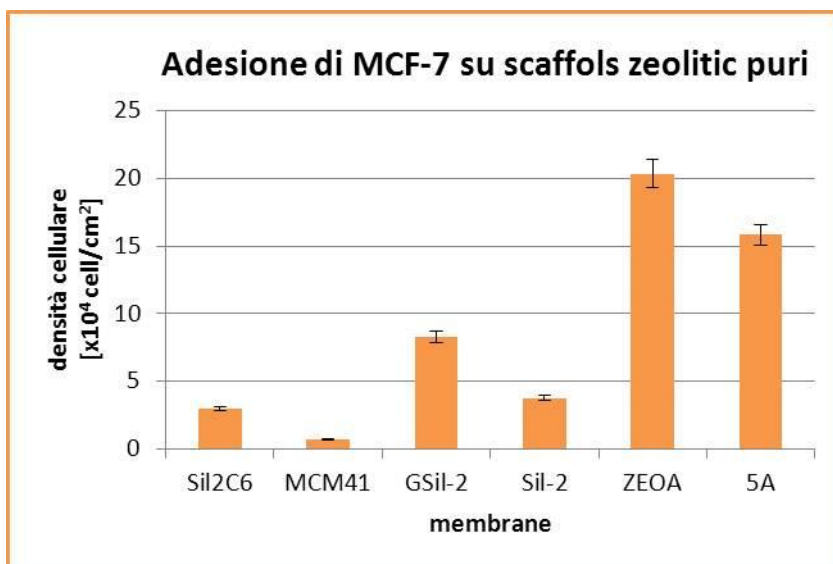


Figura 7.2.a Istogramma dell'adesione delle cellule MCF-7 su membrane zeolitiche pure. I risultati sono rappresentativi di n° 3 determinazioni eseguite in triplo

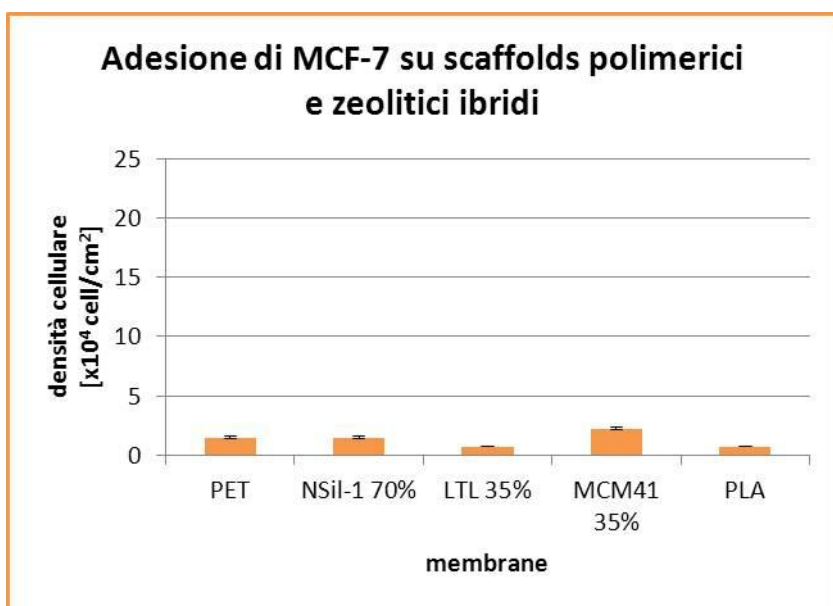


Figura 7.2.b Istogramma dell'adesione delle cellule MCF-7 su scaffolds polimerici e zeolitici ibridi. I risultati sono rappresentativi di n° 3 determinazioni eseguite in triplo

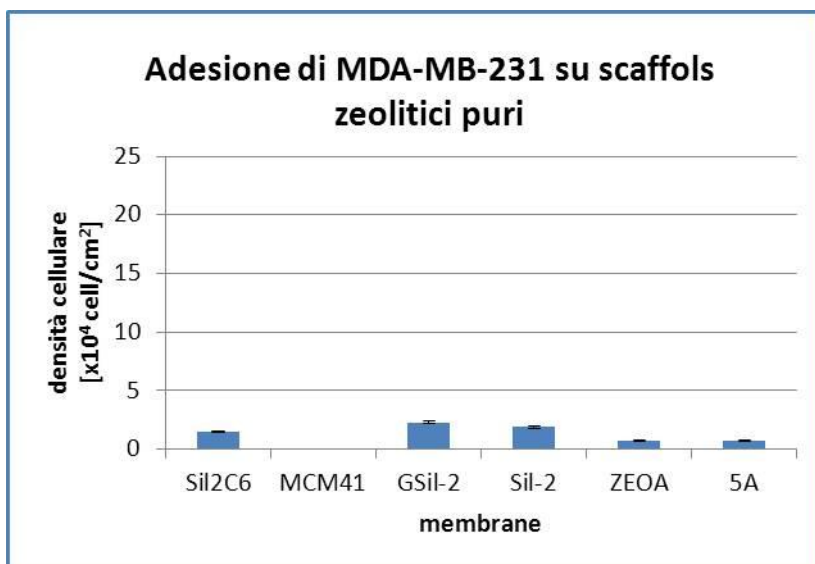


Figura 7.2.c Istogramma dell'adesione delle cellule MDA-MB-231 su membrane zeolitiche pure. I risultati sono rappresentativi di n° 3 determinazioni eseguite in triplo

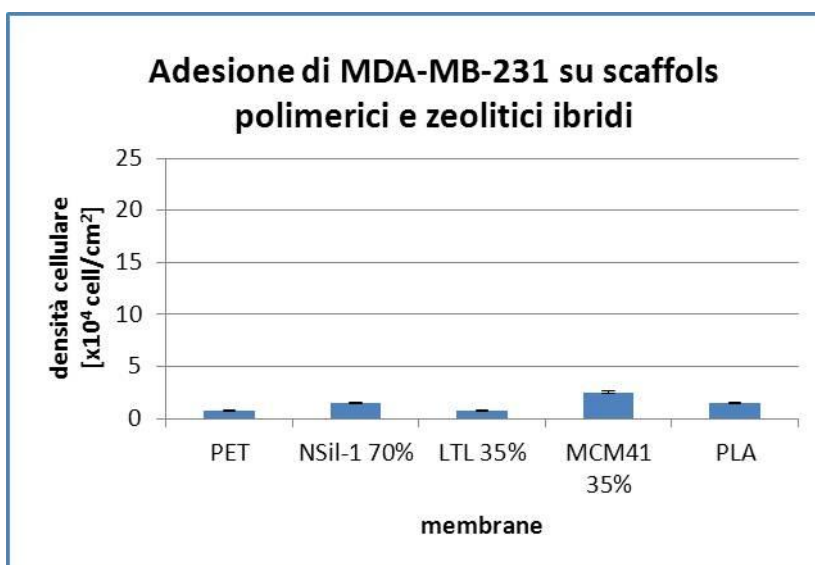


Figura 7.2.d Istogramma dell'adesione delle cellule MCF-7 su scaffolds polimerici e zeolitici ibride. I risultati sono rappresentativi di n° 3 determinazioni eseguite in triplo

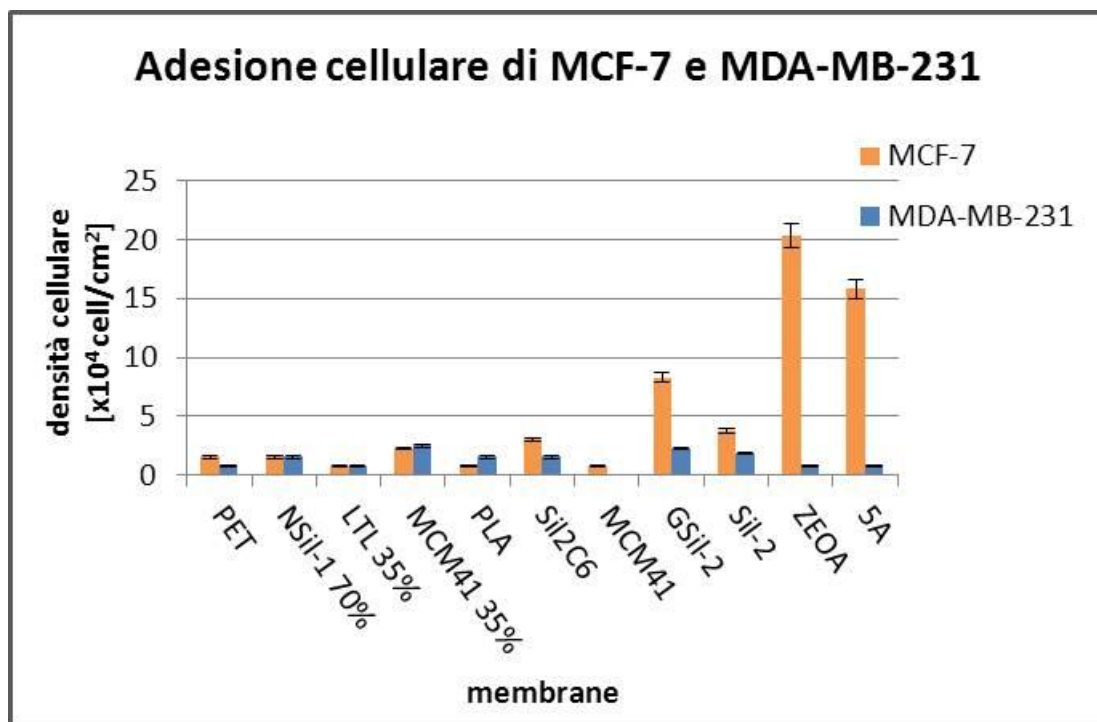


Figura 7.2.e Risultati complessivi dell'adesione delle cellule MCF-7 e MDA-MB-231 su membrane zeolitiche pure e ibride

I risultati ottenuti hanno evidenziato che tutte le superfici delle membrane zeolitiche su cui sono state seminate le cellule hanno consentito l'adesione e la crescita cellulare dimostrando di essere ottimi scaffolds, anche rispetto al supporto standard di polistirene (PET). In particolare, gli istogrammi rivelano che le membrane zeolitiche ibride hanno un differente comportamento rispetto alle membrane zeolitiche pure in relazione alle due linee cellulari studiate. Sulle membrane zeolitiche ibride, così come sui film polimerici puri (PET e PLA), il numero di cellule adese di MCF-7 è all'incirca uguale a quello delle MDA-MB-231. Al contrario, il numero di cellule MCF-7 adese sulle membrane zeolitiche pure è maggiore di un ordine di grandezza rispetto alle altre membrane, prima analizzate. Differentemente, l'adesione delle MDA-MB-231 sulle stesse tipologie di membrane non è così forte, pertanto gli scaffolds puri mostrano una buona selettività per le cellule MCF-7. Questo risultato, indicativo di una differente capacità di adesione delle cellule conferma che la linea MDA-MB-231 è una tipologia cellulare che di per sé interagisce meno con il substrato, mantenendo una più debole adesione.

Un'ulteriore considerazione va fatta riguardo l'idrofilicità delle strutture zeolitiche pure

che sembra influenzare fortemente l'adesione delle cellule MCF-7, infatti il numero di cellule adese aumenta con l'aumentare del rapporto Si/Al presente nel framework cristallino zeolitico.

7.3 Analisi morfologica di due linee di tumore mammario umano MCF-7 e MDA-MB-231 al FESEM

Le osservazioni al FESEM hanno mostrato che le cellule si stratificano bene su tutte le superfici delle membrane zeolitiche, pure ed ibride, confermando che gli scaffolds utilizzati sono degli ottimi supporti. Infatti, le caratteristiche chimico-fisiche (idrofilicità/idrofobicità e PZC) e topografiche (rugosità e grandezza dei cristalli) della superficie di tutte le membrane non favoriscono effetti citotossici e non impediscono l'adesione di cellule tumorali.

La caratteristica saliente è che le cellule di entrambe le linee mostrano un'adesione membrana-specifica. In particolare, le cellule MCF-7 su membrane ibride di NSil-1 70% crescono assumendo una morfologia compatta con il corpo cellulare rotondeggiante e ben ancorato al substrato (Figura 7.3.a). Sulle stesse membrane il corpo cellulare delle MDA-MB-231 assume una forma più allungata con grossi bracci che si protendono verso il supporto (Figura 7.3.b).

Su membrane MCM41 80% le MCF-7 distendono tutto il corpo cellulare assumendo una forma polimorfica in cui si possono evidenziare bene i filopodi che si ancorano sia alla membrana zeolitica sia alle cellule vicine (Figura 7.3.c). Sulle stesse membrane le MDA-MB-231 appaiono, invece, di forma stellata e allungata con pseudopodi evidenti, ancorati quasi esclusivamente alle superfici più rugose (Figura 7.3.d.).

Completamente differente è la forma assunta dalle MDA-MB-231 e dalle MCF-7 adese su GSil2 70%: le microfotografie, infatti, mostrano che mentre le prime, pur avendo il corpo cellulare completamente schiacciato sullo scaffold non sono ancorate ad esso essendo prive di pseudopodi e con pochi filopodi (Figura 7.3.e), le seconde, invece, esibiscono una forma irregolare, distesa e ben ancorata al substrato per mezzo di una moltitudine di adesioni focali e sottili filopodi (Figura 7.3.f).

Sulle membrane ibride di LTL 35% le cellule di entrambe le linee assumono una forma allungata con il corpo cellulare compatto e poco adeso. In particolare, si nota che le MCF-7 tendono a stabilire contatti soprattutto con le cellule vicine, sovrapponendosi le

une alle altre (Figura 7.3.g) mentre le MDA-MB-231 si ancorano allo scaffold, solo con le estremità dei loro corti pseudopodi, ma non alle cellule vicine (Figura 7.3.h).

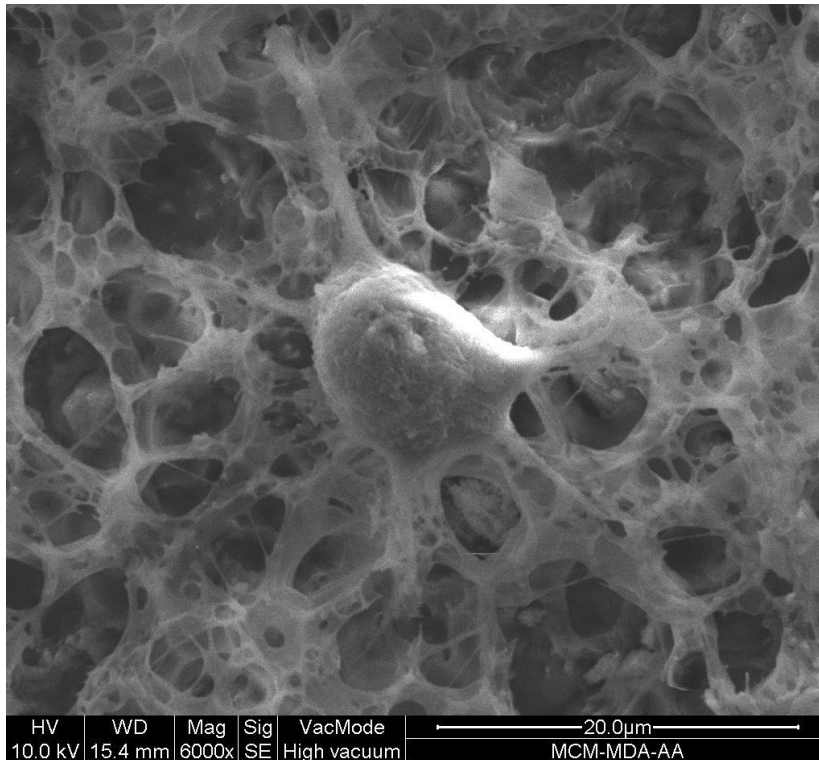


Figura 7.3.a Microfotografia al FESEM di MCF-7 adese su membrana di N-Sil-1 70% (X 6000)

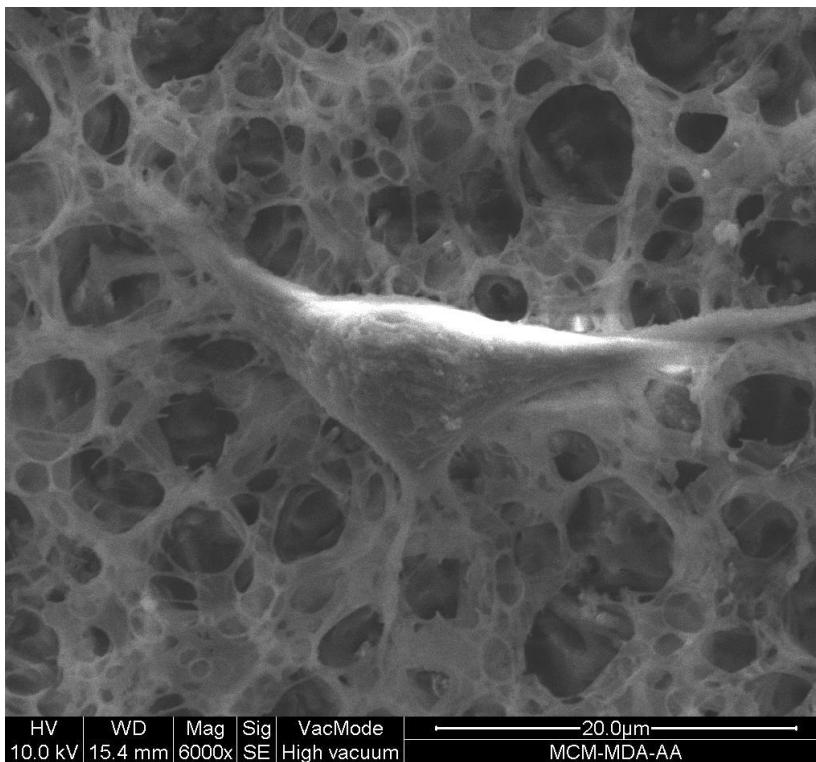


Figura 7.3.b Microfotografia al FESEM di MDA-MB-231 adese su membrana di N-

Sil-1 70% (X 6000)

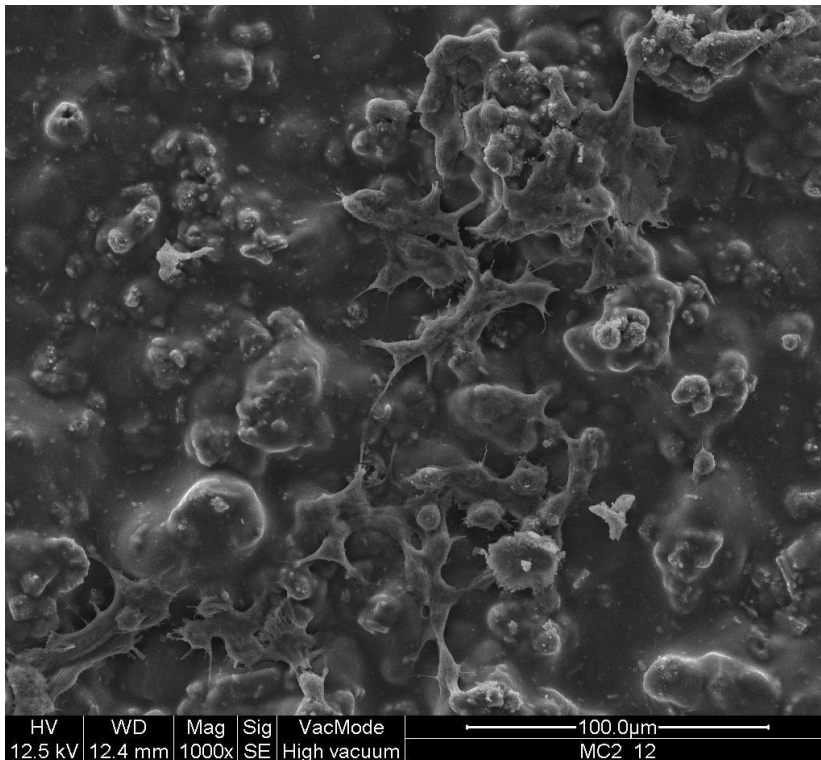


Figura 7.3.c Microfotografia al FESEM di MCF-7 adese su membrana di MCM41 80% (X 1000)

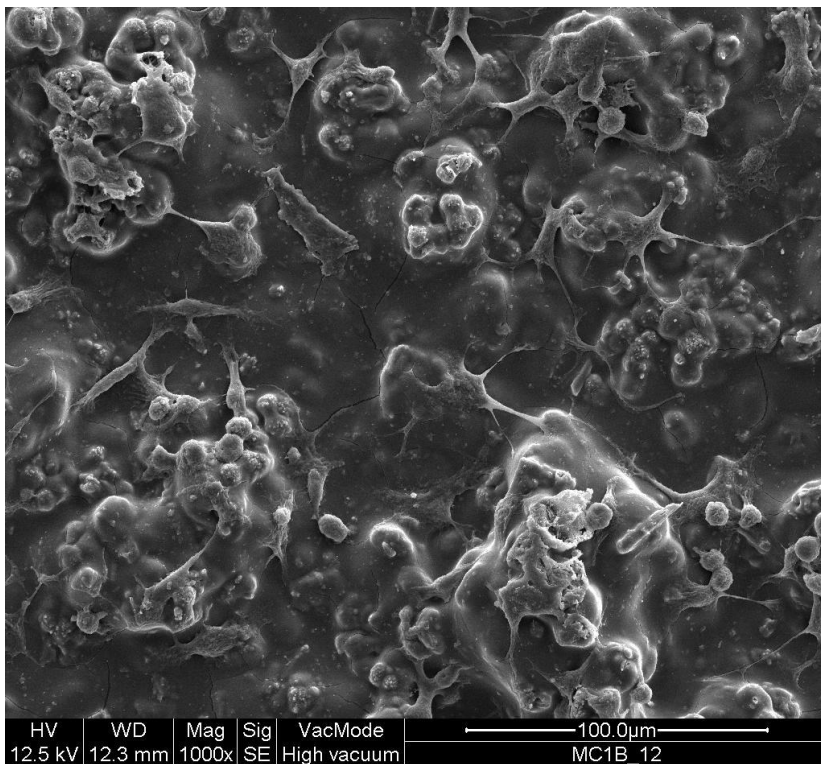


Figura 7.3.d Microfotografia al FESEM di MDA-MB-231 adese su membrana di MCM41 80% (X 1000)

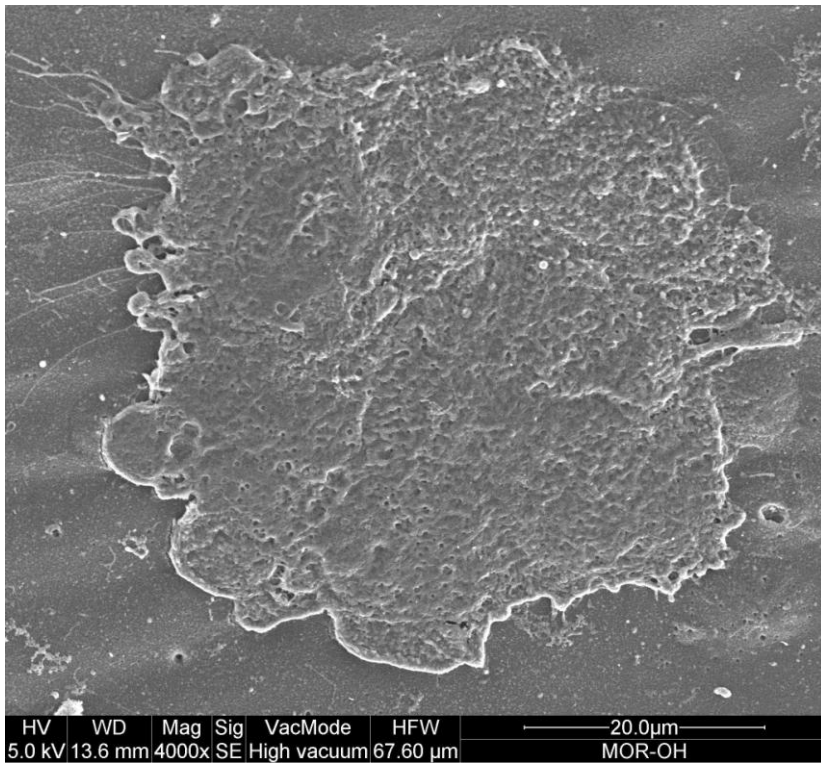


Figura 7.3.e Microfotografia al FESEM di MCF-7 adese su membrana di GSil2 70% (X 4000)

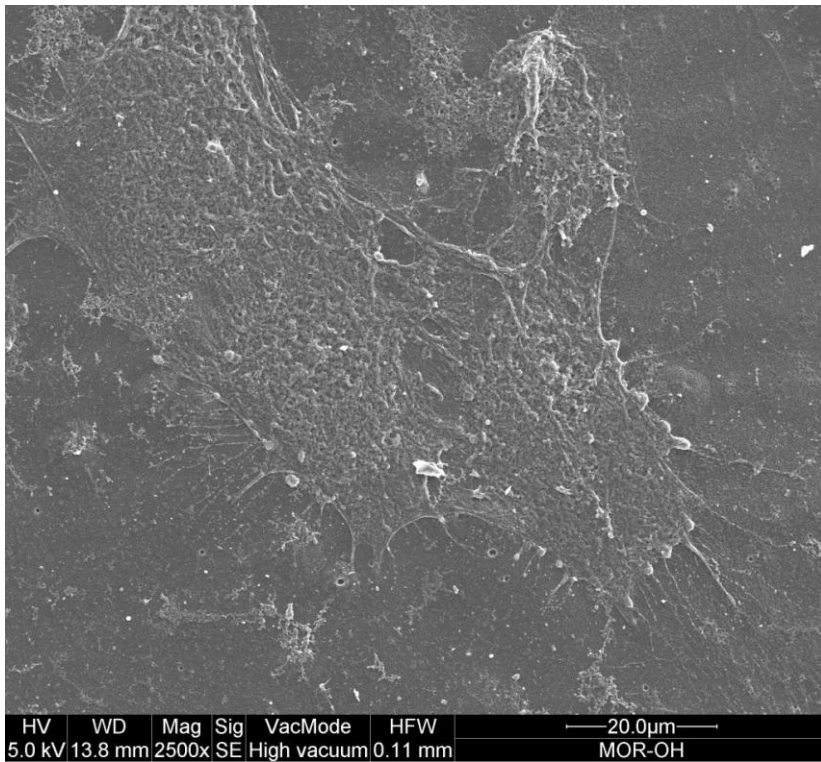


Figura 7.3.f Microfotografia al FESEM di MDA-MB-231 adese su membrana di GSil2 70% (X 4000)

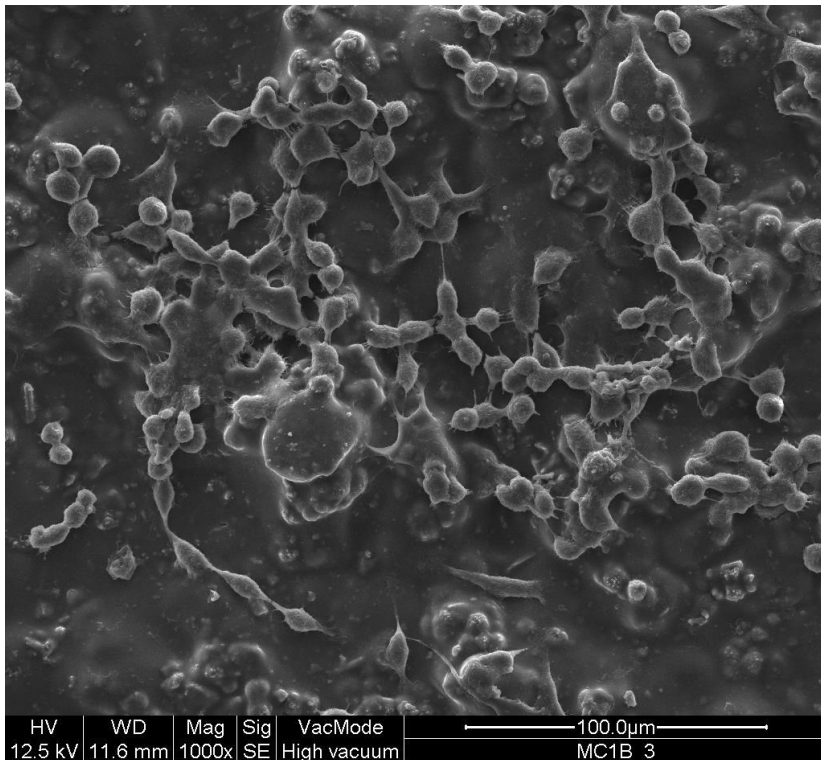


Figura 7.3.g Microfotografia al FESEM di MCf-7 adese su membrana di LTL 35% (X 1000)

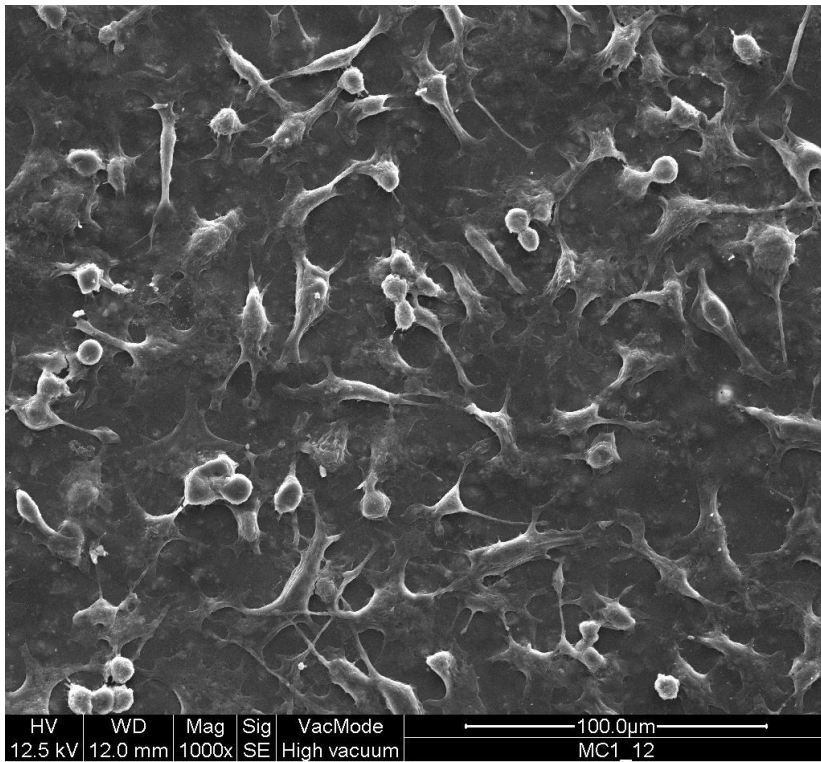


Figura 7.3.h Microfotografia al FESEM di MDA-MB-231 adese su membrana di LTL 35% (X 1000)

I risultati nel complesso ci indicano che le cellule MCF-7 tendono di più ad interagire con gli scaffold, assumendo il più delle volte una forma piuttosto schiacciata, mentre le cellule MDA-MB 231 esibiscono dei contatti prevalentemente con la parte terminale degli pseudopodi citoplasmatici, a conferma di una più labile adesione.

CAPITOLO 8

SOMMINISTRAZIONE DI DOXO E 5-MOP NELLE LINEE MCF-7 E MDA-MB-231 ADESE SU SCAFFOLDS ZEOLITICI PURI ED IBRIDI

8.1 Adsorbimento di DOXO

I cristalli zeolitici sintetizzati e caratterizzati, come descritto nel Capitolo 5, sono stati utilizzati per effettuare le prove di adsorbimento con il farmaco antitumorale DOXO.

In questo lavoro di ricerca, le soluzioni di DOXO utilizzate sono state preparate sia a partire dalla formulazione ospedaliera, sia da soluzioni preparate dalla sostanza pura. Gli esperimenti effettuati sono stati ripetuti cinque volte al fine di controllarne la riproducibilità. L'analisi dei risultati ha evidenziato che la fonte di DOXO usata in tale studio non altera la ripetibilità dei dati, né il loro confronto.

Il farmaco puro è stato solubilizzato sia in soluzione acquosa che in dimetilsolfossido (DMSO), quindi diluito fino all'appropriata concentrazione in soluzione salina. La DOXO è stata conservata sotto forma di soluzione acquosa acida (pH=3). Tale soluzione risulta, infatti, stabile a temperatura ambiente e l'analisi spettrofotometrica UV-vis di soluzioni diluite, effettuata alla lunghezza d'onda di 480 nm, permette l'analisi quantitativa del farmaco. Difatti, nell'intervallo di concentrazione compreso tra i 20 e i 300 µg/ml esiste una relazione lineare tra l'assorbanza e la concentrazione della DOXO (legge di Lambert-Beer) al fine di valutarne l'adsorbimento ed il successivo rilascio in presenza di cristalli zeolitici.

E' noto, infatti, che quando un fascio di luce (monocromatica) di intensità I_0 attraversa uno strato di spessore l di un mezzo, una parte di esso viene assorbita dal mezzo stesso e una parte viene trasmessa con intensità residua I_l .

Il rapporto tra le intensità della luce trasmessa e quella incidente sul mezzo attraversato è espresso dalla seguente relazione:

$$\frac{I_1}{I_0} = 10^{-k\lambda l} = T = 10^{-A}$$

dove:

- $k\lambda$ è detto *coefficiente di estinzione* ed è una costante tipica del mezzo attraversato per la lunghezza d'onda λ ;
- λ è la lunghezza d'onda;
- l è il cammino ottico (cioè lo spessore di soluzione attraversata).

Definita quindi la trasmittanza (T) come il rapporto I_1/I_0 e come assorbanza (A) l'opposto del logaritmo in base 10 della trasmittanza, la legge assume la forma semplificata:

$$A = k\lambda l$$

che per una soluzione viene ulteriormente modificata in:

$$A = \varepsilon_\lambda l C$$

dove:

- ε_λ è detto coefficiente di assorbimento molare;
- C è la concentrazione molare della soluzione;
- l è il cammino ottico.

Il valore di ε_λ è considerato costante per una data sostanza ad una data lunghezza d'onda, benché possa subire lievi variazioni con la temperatura. Inoltre, la sua costanza è garantita solo all'interno di un dato intervallo di concentrazioni, al di sopra delle quali la linearità tra assorbanza e concentrazione può essere inficiata da fenomeni chimico-fisici (ad esempio la precipitazione della specie chimica colorata).

La misura dell'assorbanza di soluzioni chimiche a lunghezze d'onda tipiche è il principio su cui si basa l'analisi per spettrofotometria. E' pertanto possibile rilevare e quantificare il grado di adsorbimento del farmaco sulle diverse strutture zeolitiche utilizzando questo tipo di analisi.

La determinazione del farmaco adsorbito è determinato sottraendo dal farmaco totale quello in forma libera:

$$\text{Farmaco}_{\text{adsorbito}} = \text{Farmaco}_{\text{totale}} - \text{Farmaco}_{\text{libero}}$$

8.1.1 Costruzione della retta di taratura per l'analisi spettrofotometrica

L'analisi è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-160-A.

La determinazione quantitativa è stata condotta per confronto, costruendo preventivamente una retta di taratura con soluzioni a concentrazioni note e registrando l'assorbanza dei campioni incogniti.

Per la costruzione della retta di taratura si preparano gli standard a diversa concentrazione utilizzando i reattivi indicati in tabella 8.1.1.a.

DOXO cloridrato	Pfizer; soluzione 50mg/25ml
NaCl	CARLO ERBA, solido
HCl	CARLO ERBA, soluzione al 33%
H ₂ O bidistillata	

Tabella 8.1.1.a Elenco dei reattivi utilizzati

Gli standards preparati sono i seguenti:

- 1 µg/ml;
- 2 µg/ml;
- 5 µg/ml;
- 10 µg/ml;
- 20 µg/ml;
- 50 µg/ml;
- 100 µg/ml;
- 200 µg/ml;
- 300 µg/ml;

La preparazione degli standard a concentrazione più bassa, cioè pari a 1 µg/ml, 2 µg/ml,

5 µg/ml e 10 µg/ml, si è resa necessaria per meglio quantificare le più piccole variazioni di concentrazione di DOXO. Di seguito, è riportata la procedura utilizzata. Dapprima si preparano due cuvette, contenenti una soluzione acquosa salina per NaCl, le quali costituiranno il “bianco” e saranno utilizzate per tracciare la linea di base, ovvero per eliminare qualsiasi picco inerente la soluzione che non appartenga al nostro campione contenente DOXO. Successivamente, vengono analizzate le cuvette contenenti gli standard di DOXO preparati, partendo dal più diluito per arrivare a quello più concentrato. Dai valori sperimentali ottenuti per l’assorbanza degli standard a concentrazione nota, è possibile ricavare la retta di taratura.

8.2 Adsorbimento di DOXO su cristalli zeolitici

Le prove di adsorbimento sono state effettuate su zeoliti a differente composizione chimica, struttura e morfologia in modo da valutare le differenze nell’adsorbimento nei confronti dello stesso farmaco, ossia la DOXO.

Le zeoliti utilizzate per condurre gli adsorbimenti sono:

- MCM-41;
- 5A;
- SIL-2.

Gli adsorbimenti sono stati condotti, per ciascuna zeolite in esame, a tre diverse temperature pari a 4 °C, 23 °C (temperatura ambiente, RT) e 30 °C, in camere climatiche opportunamente predisposte ed in condizioni dinamiche secondo il metodo di deplezione.

Per ogni zeolite in esame è stato valutato l’adsorbimento alle diverse temperature e a tempi diversi corrispondenti a 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18; 24; 48 e 72 ore e tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte nelle stesse condizioni sperimentali.

In particolare poi, per gli adsorbimenti con la zeolite SIL-2, oltre ai tempi precedentemente indicati, sono state effettuate due ulteriori analisi, rispettivamente a 14 e 16 ore per meglio valutare il comportamento peculiare di questa zeolite.

La metodologia utilizzata consiste nel mettere a contatto una quantità nota di zeolite con

una quantità nota di soluzione standard di DOXO, prelevata dallo standard da 300 µg/ml per i tempi prefissati.

Al termine del tempo stabilito, si effettua una centrifugazione a 6000 rpm per la durata di 30 minuti e si prelevano, successivamente, 1300 µl della soluzione surnatante e contenente il farmaco libero in soluzione che viene, poi, posto nella cuvette ed analizzato allo spettrofotometro secondo la metodologia già descritta.

8.2.1 Analisi spettrofotometrica

Si preparano le seguenti soluzioni nelle cuvettes:

- 2 cuvettes contenenti 1300 µL di H₂O/ NaCl (bianco);
- cuvettes contenenti gli standards (1-2-5-10-20-50-100-200-300 µg/ml);
- cuvettes contenenti 1300 µL di farmaco libero prelevati dai vari campioni a diversi tempi e temperature.

8.2.2 Prove di adsorbimento di DOXO al variare del tempo di incubazione e della temperatura sui cristalli zeolitici MCM-41

Allo scopo di valutare la modalità di adsorbimento della DOXO sui differenti cristalli zeolitici sintetizzati, sono state effettuate numerose prove al variare del tempo di incubazione e della temperatura.

I grafici elaborati su ORIGIN 8.1 PRO mostrano l'adsorbimento di DOXO sui cristalli zeolitici MCM-41 alle temperature di 4 °C, 23 °C e 30 °C, rispettivamente riportati in Figura 8.2.2.a, Figura 8.2.2.b e Figura 8.2.2.c.

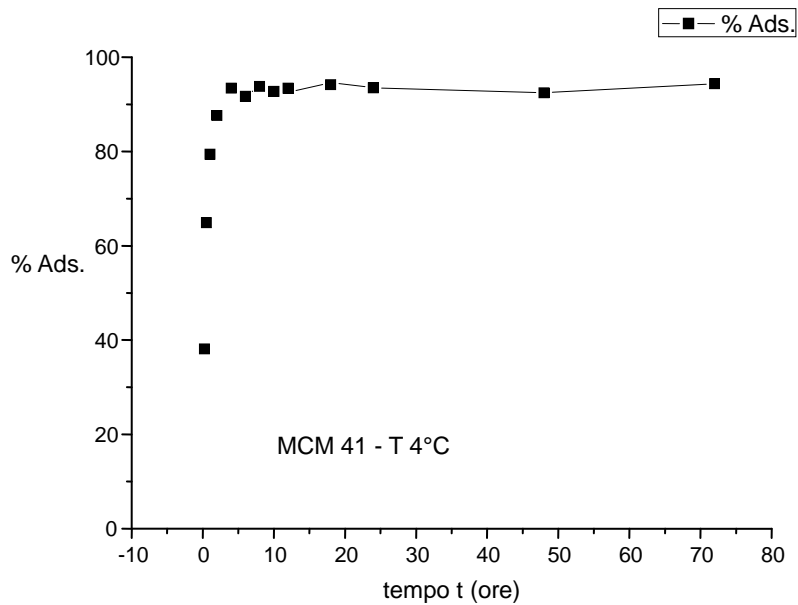


Figura 8.2.2.a: Adsorbimento di DOXO su cristalli MCM-41 alla temperatura di 4 °C.

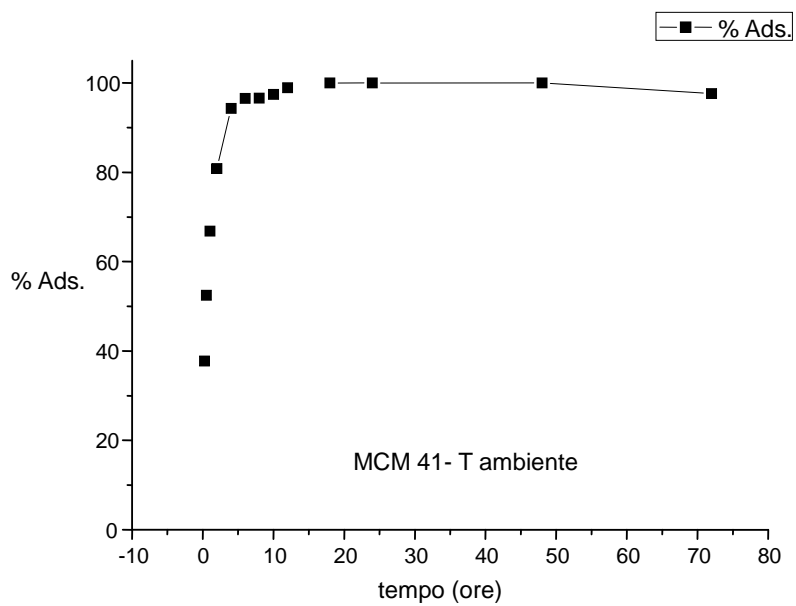


Figura 8.2.2.b: Adsorbimento di DOXO su cristalli MCM-41 alla temperatura di 23 °C (RT).

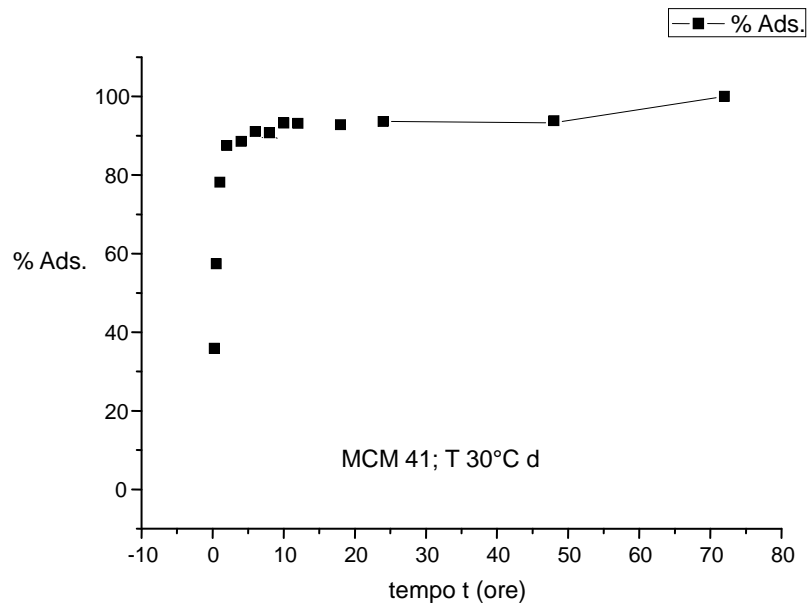


Figura 8.2.2.c: Adsorbimento di DOXO su cristalli MCM-41 alla temperatura di 30 °C.

8.2.3 Prove di adsorbimento di DOXO al variare del tempo di incubazione e della temperatura sui cristalli zeolitici di 5A

Sono di seguito riportati nella Figure 8.2.3.a, Figura 8.2.3.b e Figura 8.2.3.c i grafici riguardanti gli adsorbimenti sulla zeolite 5A alle temperature 4 °C, 23 °C (RT) e 30 °C.

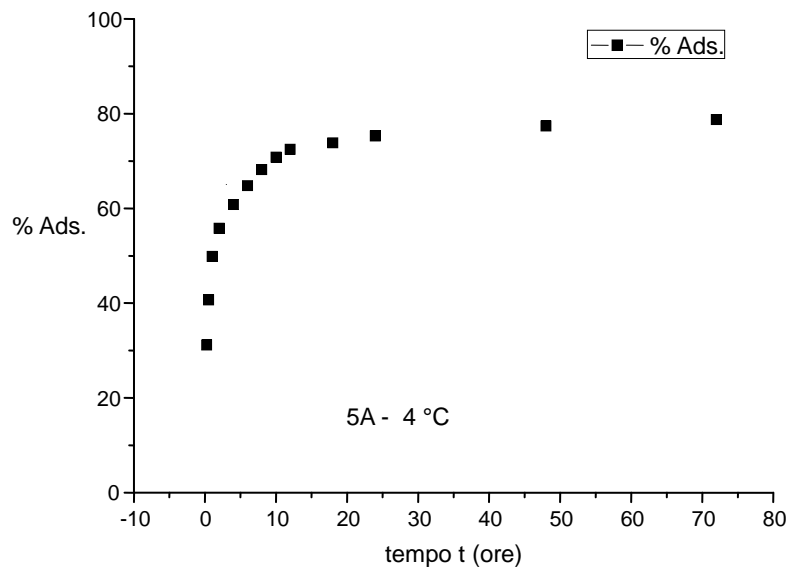


Figura 8.2.3.a: Adsorbimento di DOXO su cristalli di 5A alla temperatura di 4 °C.

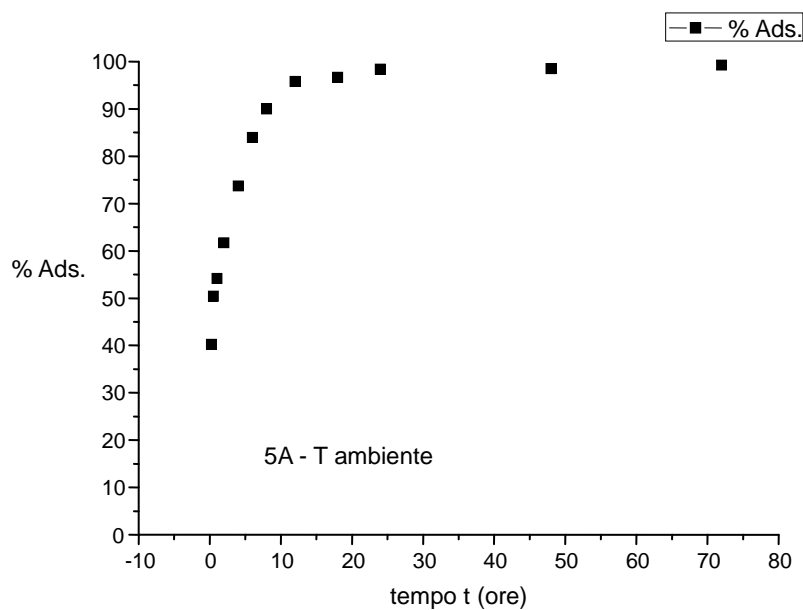


Figura 8.2.3.b: Adsorbimento di DOXO su cristalli di 5A alla temperatura di 23 °C

(RT)

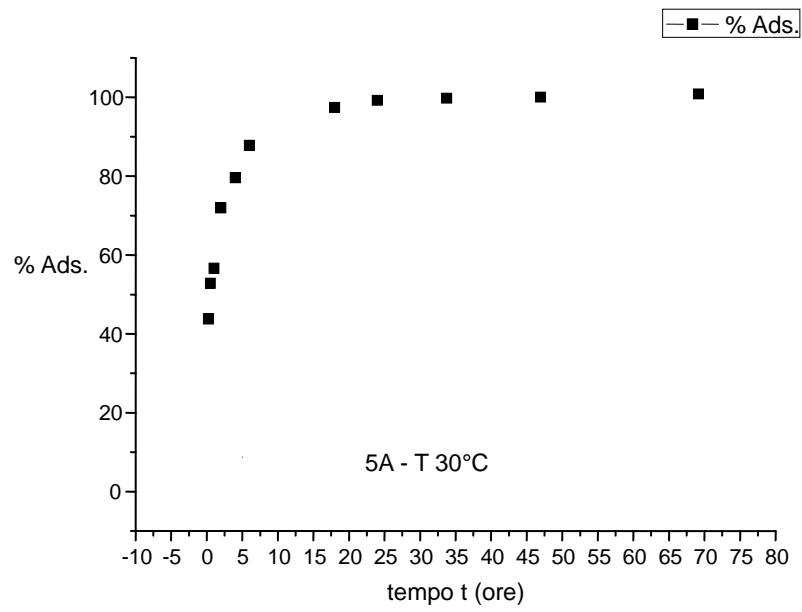


Figura 8.2.3.c: Adsorbimento di DOXO su cristalli di 5A alla temperatura di 30 °C

8.2.4 Prove di adsorbimento di DOXO al variare del tempo di incubazione e della temperatura sui cristalli zeolitici di SIL-2.

Nelle Figura 8.2.4.a, Figura 8.2.4.b e Figura 8.2.4.c sono illustrati i grafici concernenti gli adsorbimenti sulla zeolite SIL-2, rispettivamente alle temperature di 4 °C, 23 °C (RT) e 30 °C.

Questa zeolite mostra un adsorbimento percentuale elevato a (> 60%) a tempi di incubazione dell'ordine dei 15 minuti, adsorbimento che si mantiene nel tempo su valori percentuali molto alti, pur subendo alcune oscillazioni che potrebbero evidenziare "emivite" di rilascio. Per approfondire meglio quest'aspetto, sono stati preparati ed utilizzati standard a più bassa concentrazione come già descritto.

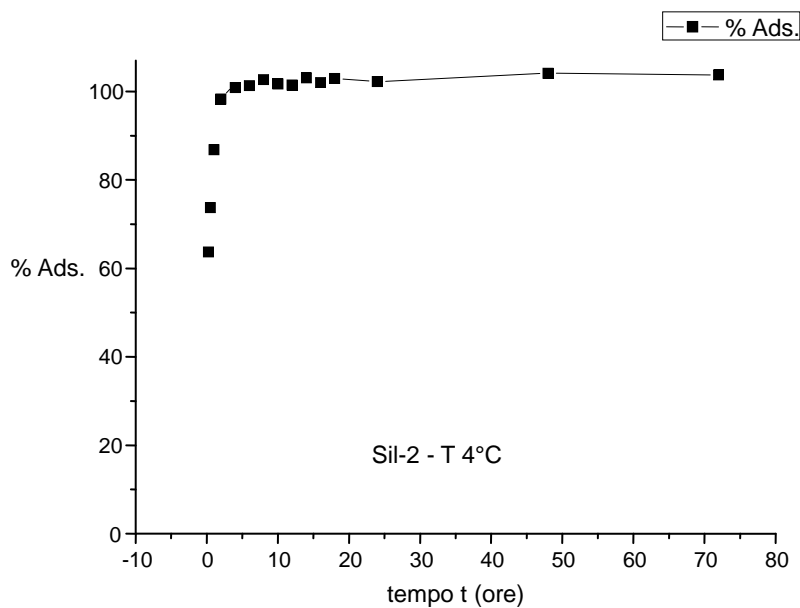


Figura 8.2.4.a: Adsorbimento di DOXO su cristalli di SIL-2 alla temperatura di 4 °C.

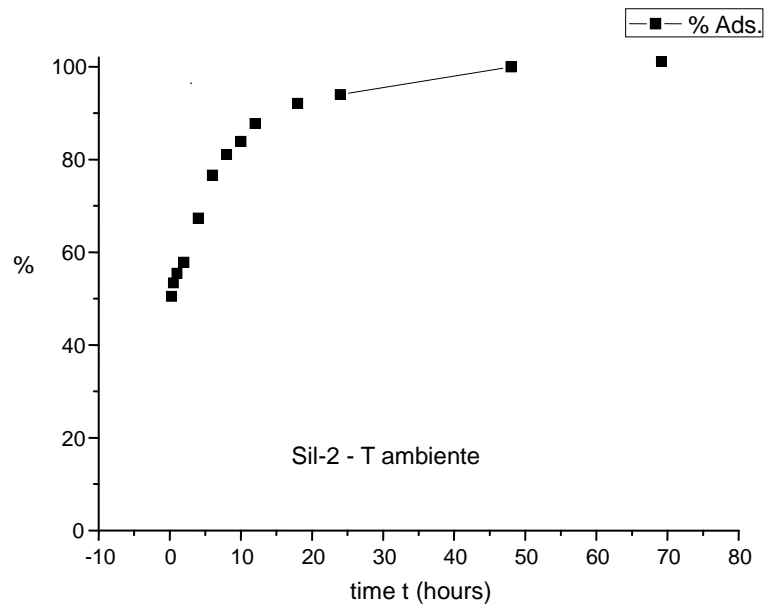


Figura 8.2.4. b: Adsorbimento di DOXO su cristalli di SIL-2 alla temperatura di 23 °C (RT).

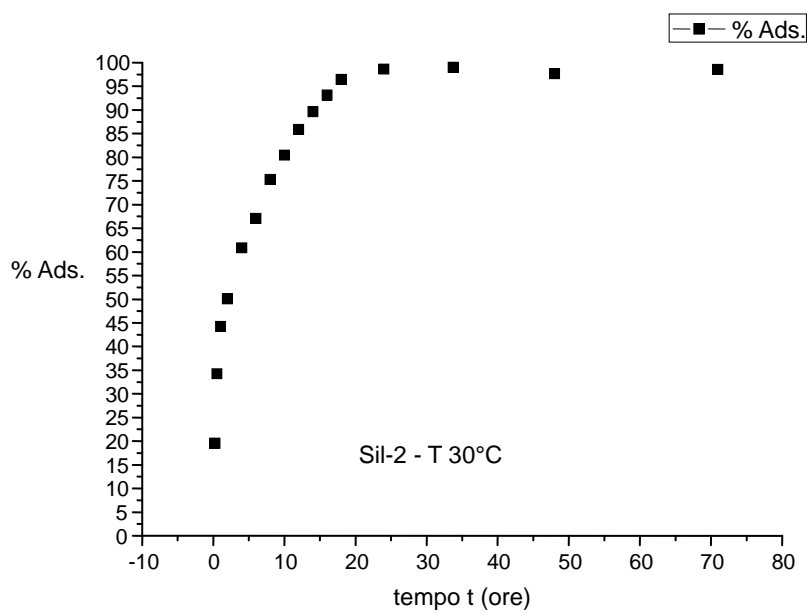


Figura 8.2.4.c: Adsorbimento di DOXO su cristalli di SIL-2 alla temperatura di 30 °C.

8.3 Rilasci.

Una volta visti i risultati ottenuti dall'adsorbimento della DOXO sui tre diversi tipi di cristalli ed evidenziato la ripetibilità di tali risultati, si è deciso di verificare la possibilità di un rilascio in vitro.

L'analisi è stata condotta scegliendo i tempi e le relative temperature ai quali i singoli tipi di cristalli mostrano la più alta percentuale di adsorbimento di seguito indicati:

- MCM-41 : temperatura 30 °C a 72 h di incubazione;
- 5A : temperatura ambiente a 72 h di incubazione;
- Sil-2 : temperatura 4 °C a 12 h di incubazione.

Le prove di rilascio sono state condotte a 30 °C al pH di 7,75 ottenuto grazie all'utilizzo di tampone fosfato, per avere condizioni il più possibile simili a quelle dell'ambiente corporeo, ove la DOXO è chiamata a svolgere il suo ruolo.

Una quantità nota di polvere anidra di zeolite caricata con DOXO viene posta in provetta con 2 ml di tampone fosfato a pH 7,75 e lasciata in incubazione.

Per ciascuna zeolite viene valutato il rilascio a tempi diversi, corrispondenti a 0,25h; 0,5h; 1h ; 2h; 4h; 24h; 48h; 72h e 120h.

Al raggiungimento del tempo di incubazione desiderato il campione viene centrifugato a 6000 rpm per un tempo pari a 0,5 h e si prelevano successivamente 1300 µl della soluzione surnatante contenente il farmaco rilasciato in soluzione dalla zeolite che sono posti in cuvette per l'analisi spettrofotometrica. Questa operazione ricalca la metodica utilizzata per effettuare gli adsorbimenti.

8.3.1 Analisi spettrofotometrica dei rilasci

Per effettuare un'analisi allo spettrofotometro e valutare, dunque, la quantità del nostro farmaco rilasciata, è necessario costruire una nuova retta di taratura con standard a concentrazione nota contenenti il farmaco in una soluzione avente come solvente tampone fosfato a pH 7,75.

Sono stati dunque preparati i seguenti standard:

- 2 µg/ml;
- 5 µg/ml;
- 10 µg/ml;
- 20 µg/ml;
- 50 µg/ml;
- 100 µg/ml;
- 200 µg/ml;
- 300 µg/ml

ottenuti tutti per diluizione dallo standard a 300 µg/ml.

Si preparano due cuvette che costituiranno il “bianco” contenenti il tampone fosfato e saranno utilizzate per tracciare la linea di base per eliminare eventuali picchi di interferenza con quelli caratteristici DOXO, ma appartenenti esclusivamente al tampone. Successivamente verranno predisposte le cuvette contenenti gli standard da noi preparati partendo dal più diluito per arrivare a quello più concentrato. In questo modo dalle concentrazioni note e dall’assorbanza letta si può ricavare la retta di taratura.

Ciascuna cuvette contiene 1300 µl di soluzione, sia essa lo standard, il bianco o il surnatante prelevato dai campioni da analizzare.

Dopo aver costruito la retta di taratura, le cuvettes vengono inserite una alla volta nella cella di lettura spettrofotometrica e dall’assorbanza letta si risale alla concentrazione di DOXO rilasciata.

8.3.2 Risultati del rilascio farmacologico di DOXO da MCM-41

Nei grafici che seguono sono mostrati i risultati dei rilasci da MCM-41 caricato con DOXO. Le prove sono state condotte a 30°C in camera climatica in condizioni di agitazione dinamica. Nella Figura 4.8.2.a è mostrata la concentrazione rilasciata in tempi lunghi (4h; 24h; 48h; 72h e 120h).

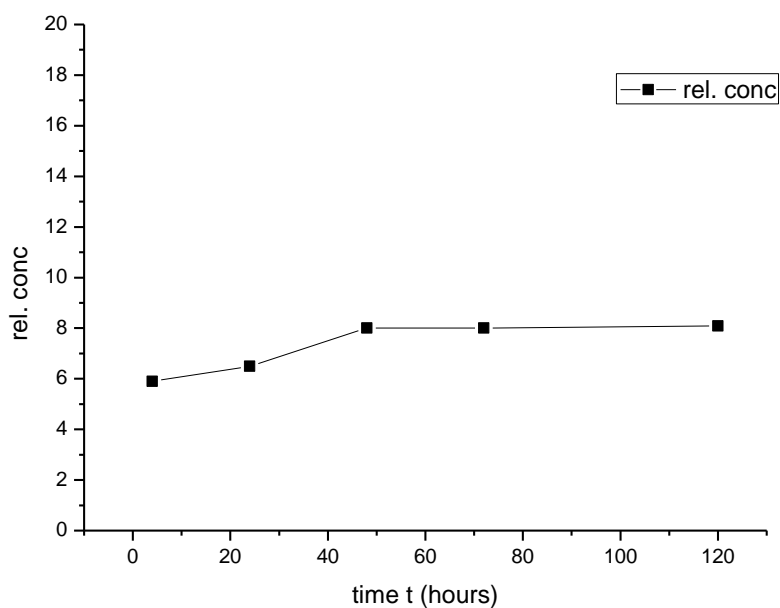


Figura 8.4.2.a: Rilasci di DOXO dal campione MCM-41.

8.3.3 Prove di rilascio da 5A

Nella Figura 8.3.3.a è mostrata la concentrazione rilasciata in tempi lunghi (4h; 24h; 48h; 72h e 120h).

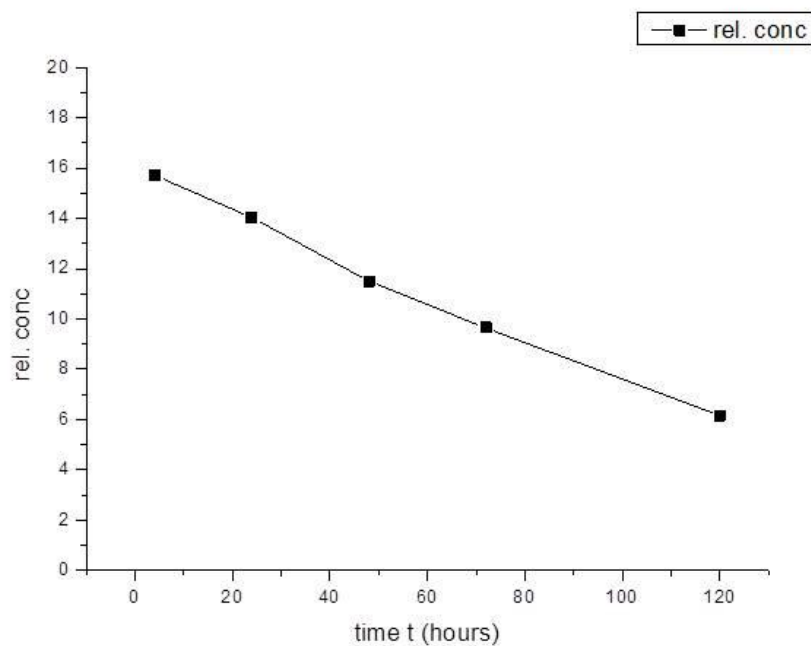


Figura 8.3.3.a: Rilasci di DOXO dal campione 5A. Analisi dei tempi lunghi.

8.3.4 Prove di rilascio da Sil-2

Nella Figura 4.8.4.a è mostrata la concentrazione rilasciata in tempi più lunghi (4h; 24h; 48h; 72h e 120h).

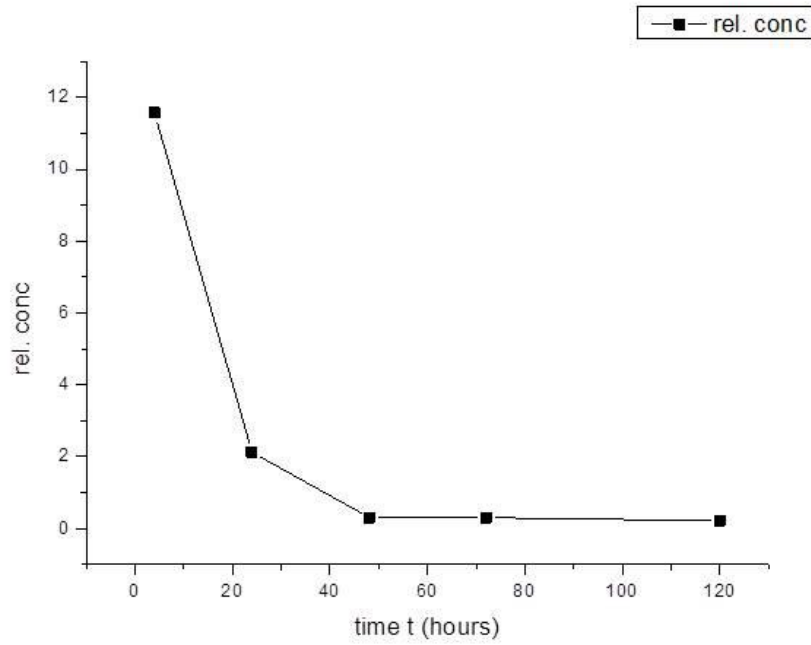


Figura 8.3.4.a: Rilasci di DOXO dal campione Sil-2.

8.4 Adsorbimento di DOXO su membrane zeolitiche

L'adsorbimento di DOXO in un sistema complesso come quello costituito dalle cellule tumorali adese su membrane zeolitiche, immerso nel mezzo di coltura cellulare, può essere influenzato da molti fattori difficilmente valutabili dall'analisi dei dati ottenuti nel sistema tal quale. E' noto, infatti, che il mezzo di coltura contiene sali inorganici, antibiotici, fattori di crescita, eccetera, che possono interagire ed essere adsorbiti dalle membrane zeolitiche o che possono influenzare l'adsorbimento del farmaco variando, per esempio, la forza ionica del sistema. E' risultata, pertanto, evidente la necessità di valutare i contributi dei vari fattori. Allo scopo di ottenere informazioni utili inerenti la percentuale di adsorbimento della DOXO sulle differenti membrane, sono state svolte misurazioni utilizzando il mezzo di coltura delle cellule agli stessi tempi di prelievo e secondo le stesse modalità usate per il sistema contenente le cellule (Tabella 8.4.a).

ZEOLITE	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)
MCM 41 35%	6	2	24	2	168	3
LTL 35%	6	5	24	6	168	6
NSIL1 70%	6	3	24	3	168	4
ZEOL	6	64	24	79	168	100
5A	6	90	24	100	168	100
SIL2	6	72	24	90	168	100

Tabella 8.4.a Adsorbimento di DOXO [4µg/mL] solubilizzata nel mezzo di coltura cellulare al variare del tempo di incubazione e del tipo di scaffold.

Al fine di poter meglio correlare i risultati ottenuti, gli adsorbimenti effettuati sulle membrane sono stati eseguiti su campioni statici, cioè nelle stesse condizioni delle membrane con cellule adese, quindi, in maniera differente rispetto a quelle effettuate sui cristalli. Le analisi effettuate hanno mostrato, nel tempo, che membrane diverse hanno cinetiche e capacità di adsorbimento differenti (Tabella 8.4.b e Tabella 8.4.c).

ZEOLITE	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)
MCM 41 35%	6	39	12	54	24	64
LTL 35%	6	30	12	43	24	56
NSIL1 70%	6	37	12	50	24	58
ZEOL	6	75	12	100	24	100
5A	6	100	12	100	24	100
SIL2	6	82	12	100	24	100

Tabella 8.4.b Adsorbimento di DOXO [4 μ g/mL] su MCF-7 cresciute su scaffolds zeolitici.

ZEOLITE	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)
MCM 41 35%	6	29	12	40	24	54
LTL 35%	6	25	12	37	24	46
NSIL1 70%	6	27	12	39	24	50
ZEOL	6	68	12	82	24	100
5A	6	95	12	100	24	100
SIL2	6	77	12	96	24	100

Tabella 8.4.c Adsorbimento di DOXO [4 μ g/mL] su MDA-MB-231 cresciute su scaffolds zeolitici.

Una sostanziale, macroscopica differenza può essere evidenziata tra le membrane zeolitiche pure e quelle ibride. Infatti, mentre il primo gruppo di scaffolds mostra un adsorbimento evidente di DOXO già dopo sei ore di incubazione, come si rileva dal confronto tra lo spettro della 5A (figura 8.4.a) e quello della soluzione di DOXO

iniziale (figura 8.4.b), il secondo gruppo non adsorbe quasi affatto il farmaco per analisi effettuate anche per tempi di incubazione estremamente lunghi (168 ore), (Figura 8.4.c, Figura 8.4.d, Figura 8.4.e).

Queste differenze di comportamento sono sorprendenti, ma in linea, comunque, con le analisi condotte in soluzioni acquose su cristalli zeolitici e già riportate nel paragrafo 8.2 e 8.3. In particolare, è possibile evidenziare che, dopo sei ore di incubazione la membrana pura di tipo 5A mostra il maggiore adsorbimento (90%) rispetto alle altre membrane pure.

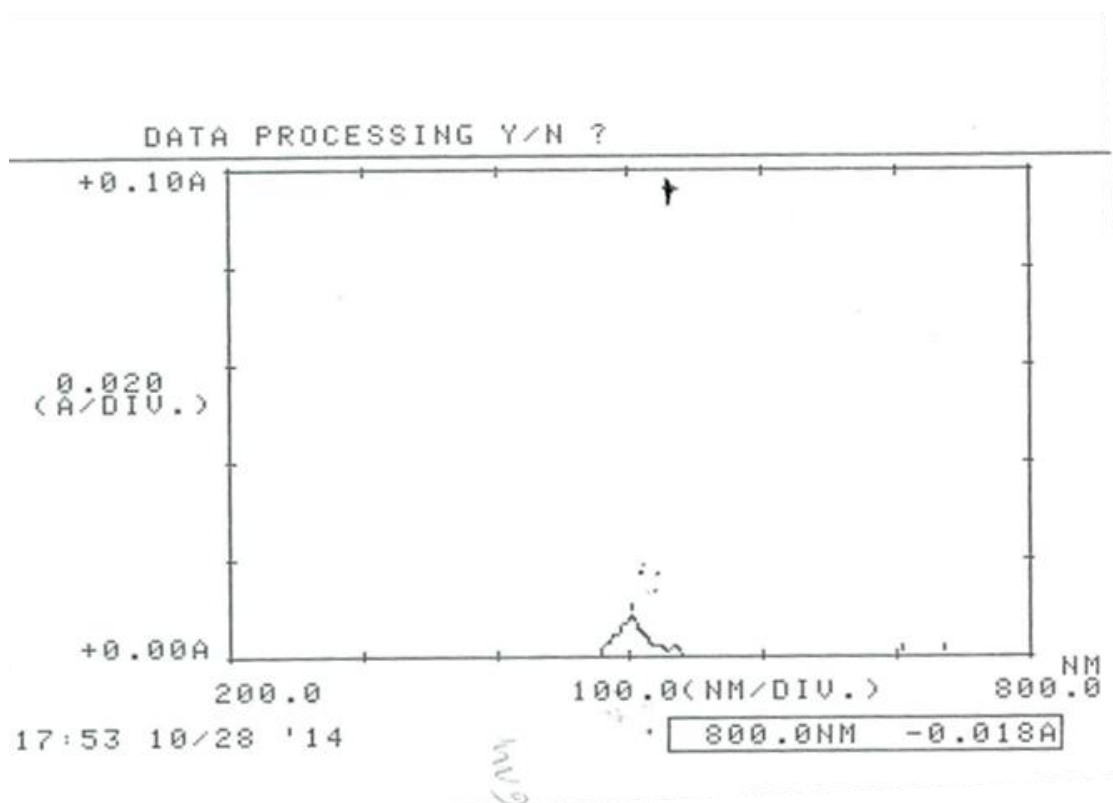


Figura 8.4.d Spettro UV-vis della DOXO solubilizzata nel mezzo di coltura cellulare dopo 6 ore di incubazione con la membrana pura 5A.

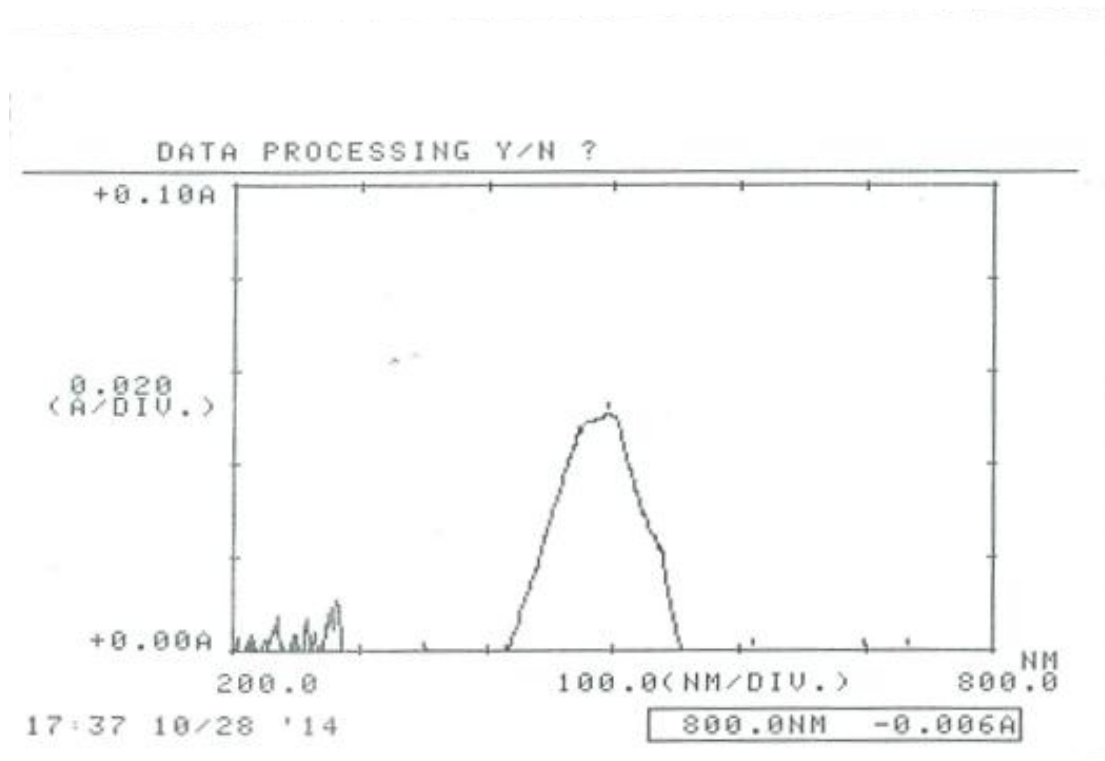


Figura 8.4.e Spettro UV-vis della soluzione iniziale di DOXO nel mezzo di coltura.

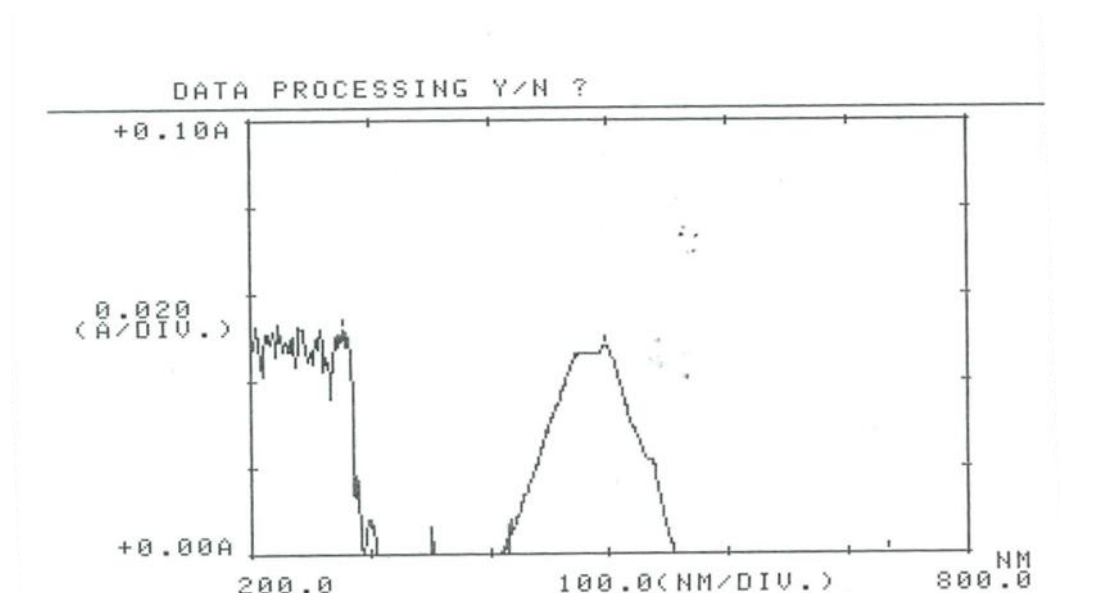


Figura 8.4.f Spettro UV-vis della DOXO solubilizzata nel mezzo di coltura cellulare dopo 6 ore di incubazione con la membrana ibrida N-Sil-1 70%.

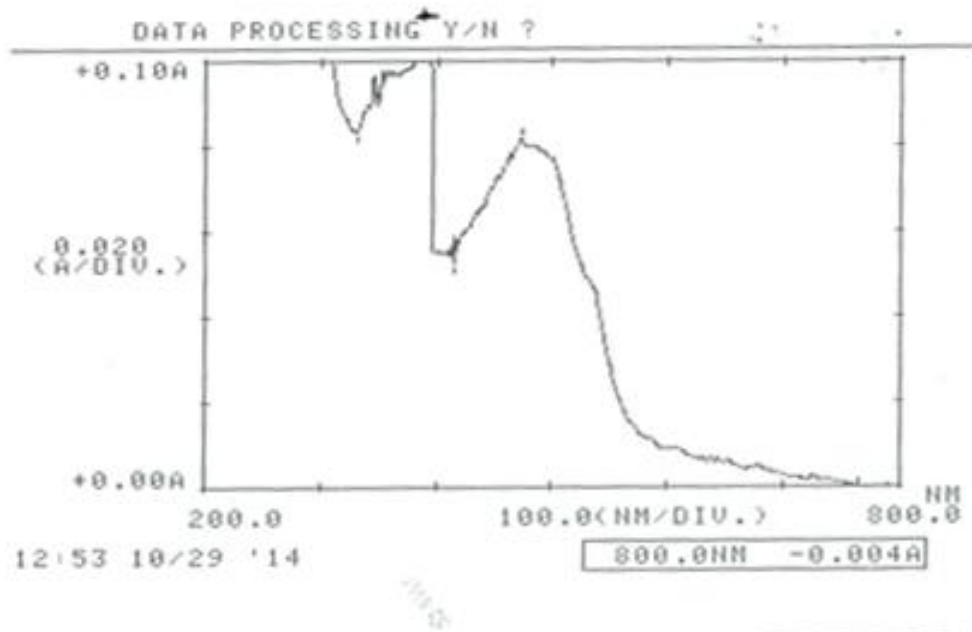


Figura 8.4.1.g Spettro UV-vis della DOXO solubilizzata nel mezzo di coltura cellulare dopo 24 ore di incubazione con la membrana ibrida N-Sil-1 70%.

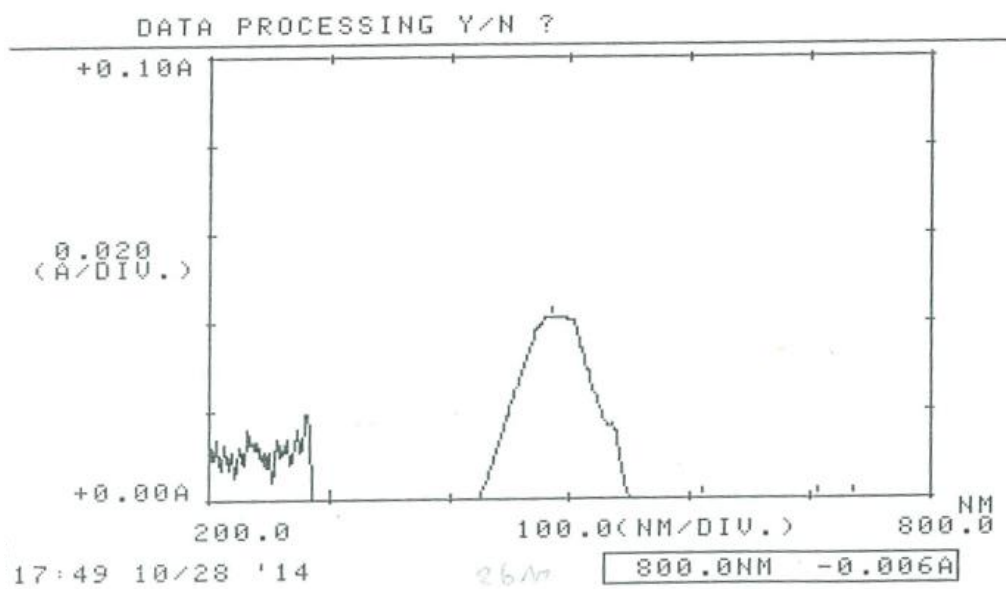


Figura 8.4.h Spettro UV-vis della DOXO solubilizzata nel mezzo di coltura cellulare dopo 168 ore di incubazione con la membrana ibrida N-Sil-1 70%.

La presenza di cellule (MCF-7) induce un repentino adsorbimento di DOXO sulle membrane ibride già dopo le prime 6 ore di incubazione (Tabella 8.5.b) con incrementi superiori al 50% dopo 24 ore di incubazione. Con le membrane pure il dato di adsorbimento non si discosta molto rispetto ai risultati ottenuti in assenza di cellule a tutti i tempi di incubazione.

Le cellule MDA-MB-231, cresciute sugli stessi scaffolds hanno indicato un adsorbimento di DOXO leggermente inferiore al dato ottenuto su MCF-7, riproponendo comunque lo stesso comportamento a seconda del tipo di membrana.

8.5 Analisi morfologica delle cellule delle due linee di tumore mammario umano adese su membrane zeolitiche pure ed ibride trattate con DOXO

Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione hanno mostrato che le cellule di entrambe le linee MCF-7 e MDA-MB-231 sono cresciute su tutti gli scaffolds zeolitici. Le immagini e le analisi relative alla crescita e alla differenziazione cellulare sulle membrane zeolitiche, pure e ibride, hanno mostrato, inoltre, che tutte le membrane hanno influenzato le alterazioni morfologiche delle cellule trattate con DOXO modulando, le modificazioni sia dei corpi cellulari che dei prolungamenti citoplasmatici delle cellule in relazione al tempo di contatto con il farmaco.

Un risultato rappresentativo delle osservazioni effettuate al microscopio elettronico a scansione sulle cellule MDA-MB-231 cresciute sulla membrana zeolitica ibrida di NSi11 70% mette in evidenza la presenza di alcune alterazioni morfologiche in seguito al trattamento per 48 ore con DOXO [4µg/mL] (Figura 8.5.a e Figura 8.5.b).

Le membrane cellulari, paragonate alle stesse cellule non trattate farmacologicamente, appaiono raggrinzite e bitorzolute, gli pseudopodi sono completamente staccati dal substrato e non presentano le caratteristiche adesioni terminali.

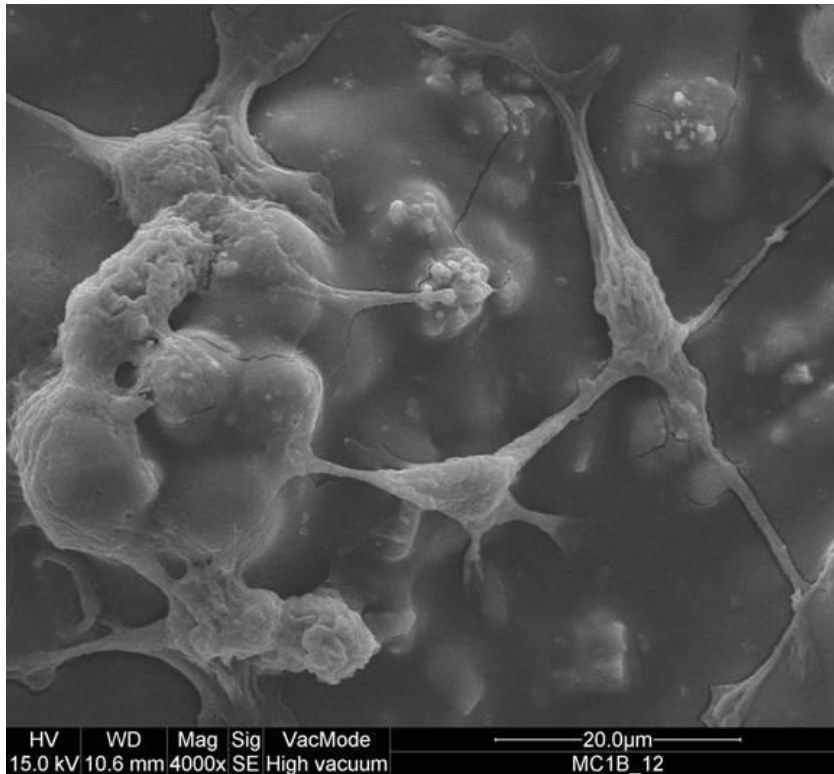


Figura 8.5.a Microfotografia FESEM di cellule MDA-MB-231 cresciute sulla membrana zeolitica ibrida di NSil1 70% senza trattamenti

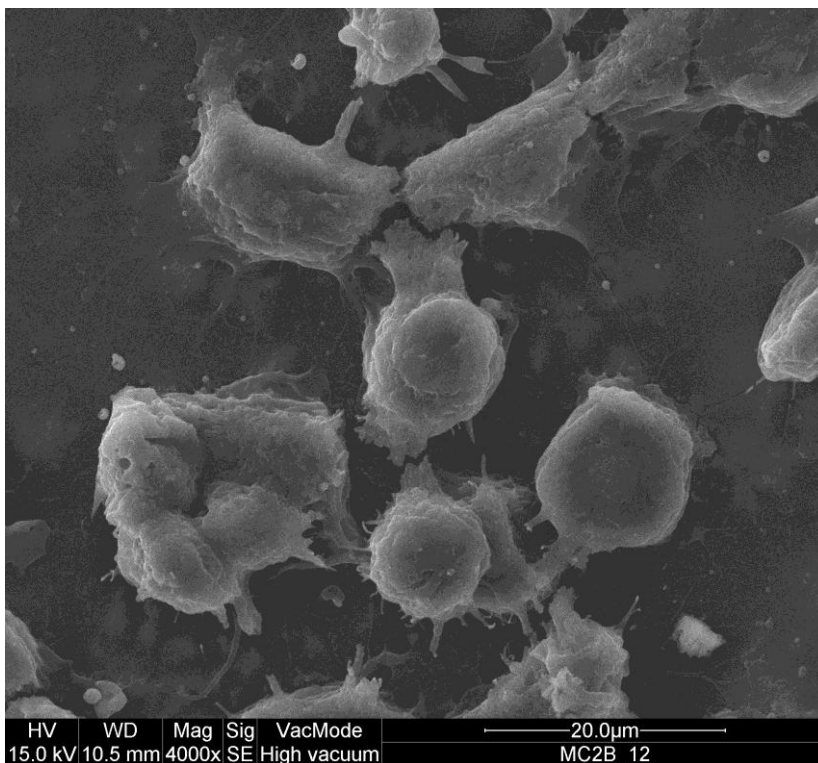


Figura 8.5.b: Microfotografia FESEM di cellule MDA-MB-231 cresciute sulla membrana zeolitica ibrida di NSil1 70% e trattate per 48 ore con DOXO [4μg/mL]

Inoltre, l'osservazione a forte ingrandimento delle membrane di entrambe le tipologie cellulari, cresciute sulle membrane zeolitiche ibride mostra la presenza di numerose microvescicole libere che si dipartono dalla membrana citoplasmatica (Figura 8.5.c e Figura 8.5.d).

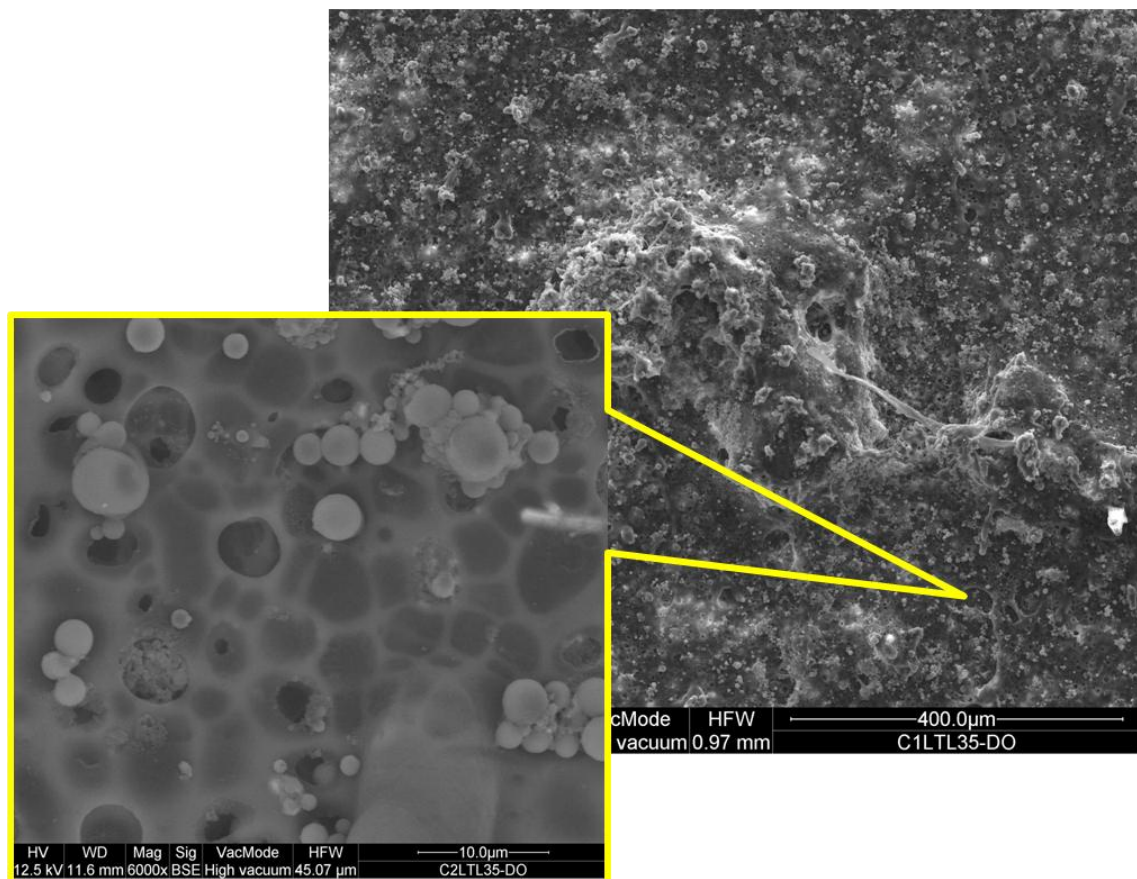


Figura 8.5.c Microfotografia FESEM di MCF-7 cresciuta su scaffold zeolitico LTL 35% e trattata per 24 ore con DOXO alla concentrazione di 4 µg/mL.

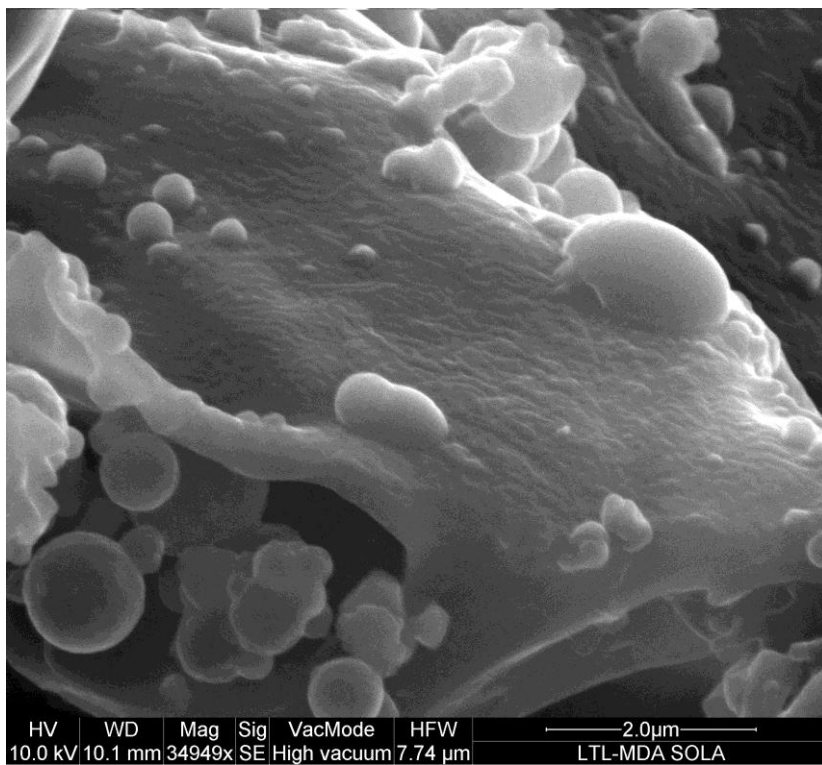


Figura 8.5.d Microfotografia FESEM di MDA-MB-231 cresciuta su scaffold zeolitico LTL 35% e trattata per 24 ore con DOXO alla concentrazione di 4 μg/mL.

8.6 Adsorbimento di 5-MOP su membrane zeolitiche

Analogamente alla DOXO, abbiamo valutato l'adsorbimento del 5-MOP somministrandolo dapprima solo su scaffolds zeolitici (Tabella 8.6.a) e, successivamente in presenza di cellule, al fine di compararne i risultati (Tabella 8.6.b e tabella 8.6.c).

A tale scopo sono state eseguite prove di adsorbimento del 5-MOP su scaffolds zeolitici puri ed ibridi utilizzando la spettrofotometria UV-vis.

Per i trattamenti farmacologici è stata selezionata la concentrazione di 10 μ M.

ZEOLITE	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)
MCM 41 35%	6	1	24	2	168	2
LTL 35%	6	3	24	6	168	7
NSIL1 70%	6	2	24	4	168	4
SIL2C6	6	45	24	65	168	86
5A	6	72	24	92	168	100
SIL2	6	62	24	80	168	98

Tabella 8.6.a Adsorbimento di 5-MOP [10 μ M] solubilizzata nel mezzo di coltura cellulare al variare del tempo di incubazione e del tipo di scaffold.

I risultati mostrati in tabella, ancora una volta confermano che le membrane ibride adsorbono molto di meno rispetto a quelle pure, dato già evidenziato prima per il farmaco DOXO. L'andamento dell'adsorbimento del 5-MOP nel tempo, non muta, riproponendo gli stessi risultati ottenuti con la DOXO.

ZEOLITE	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)
MCM 41 35%	6	17	12	54	24	64
LTL 35%	6	10	12	43	24	56
NSIL1 70%	6	15	12	50	24	58
ZEOL	6	60	12	85	24	100
5A	6	79	12	93	24	100
SIL2	6	66	12	89	24	100

Tabella 8.6.b Adsorbimento di 5-MOP [10 μ M] su MCF-7 cresciute su scaffolds zeolitici.

ZEOLITE	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)	Tempo Incub. (ore)	Adsorbimento (%)
MCM 41 35%	6	14	12	34	24	42
LTL 35%	6	12	12	32	24	46
NSIL1 70%	6	13	12	32	24	44
ZEOL	6	55	12	75	24	95
5A	6	75	12	89	24	100
SIL2	6	70	12	83	24	100

Tabella 8.6.b Adsorbimento di 5-MOP [10 μ M] su MDA-MB-231 cresciute su scaffolds zeolitici.

La somministrazione di 5-MOP in presenza di cellule ha messo in evidenza un incremento graduale di adsorbimento del farmaco nel tempo, per entrambe le linee. Tuttavia le cellule MCF-7 sono più responsive all'adsorbimento farmacologico rispetto alle MDA-MB-231 le quali mostrano valori inferiori rispetto alle prime.

8.8 Studio morfologico delle cellule MCF-7 e MDA-MB-231 cresciute su membrane zeolitiche pure ed ibride

Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione hanno mostrato che le cellule di entrambe le linee MCF-7 e MDA-MB-231, cresciute sugli scaffolds zeolitici, hanno subito alterazioni morfologiche, confrontabili per tipologia di membrana, in seguito al trattamento con 5-MOP [10 μ M]. Lo studio ha evidenziato, inoltre, una variazione morfologica della linea cellulare in relazione al tempo di contatto con il farmaco.

Osservando le MDA-MB-231 cresciute su membrane zeolitiche ibride, NSil-1 70% e trattate per 24 ore con 5-MOP, per esempio, si osserva che esse hanno subito un danno a carico della membrana cellulare e soprattutto del corpo cellulare. Quest'ultimo, infatti, appare raggrinzito e di volume ridotto rispetto a quello delle cellule non trattate (Figura 7.3.b e Figura 8.8.a).

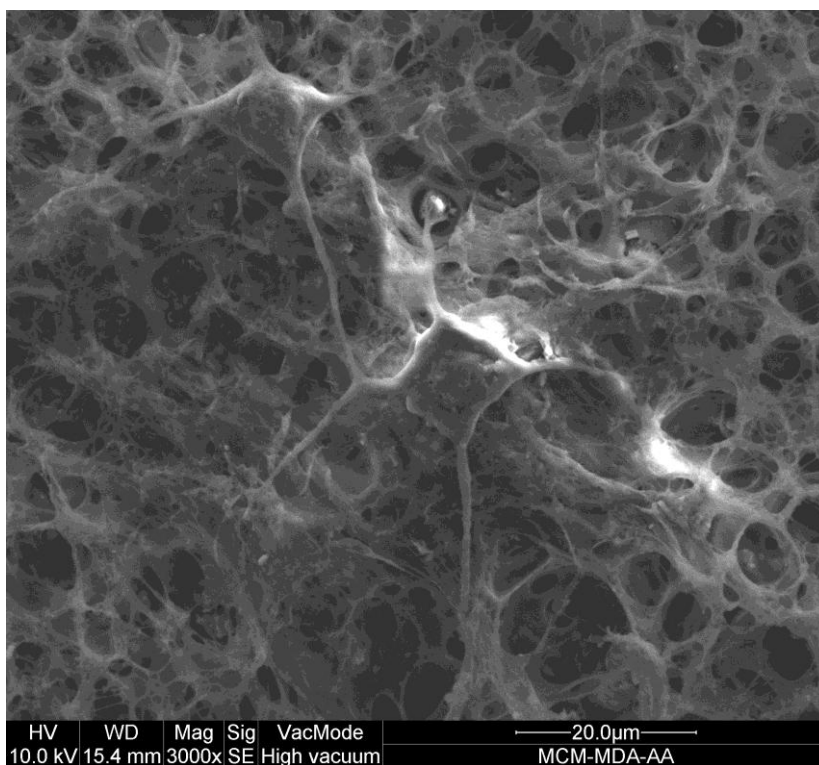


Figura 8.8.a Microfotografia al FESEM di MDA-MB-231 su membrana di N-Sil-1 70% e trattate con 5-MOP [10 μ M] per 24 ore (X 3000)

8.9 Analisi della vitalità cellulare delle due linee MCF-7 e MDA-MB-231 cresciute su membrane zeolitiche pure ed ibride dopo trattamento con farmaci antineoplastici

Le prove di vitalità cellulare sono state eseguite utilizzando il test MTT in assenza e presenza di trattamento per 24 ore con 5-MOP e DOXO. Le figure 8.9.a e 8.9.b riportano i risultati dei test effettuati.

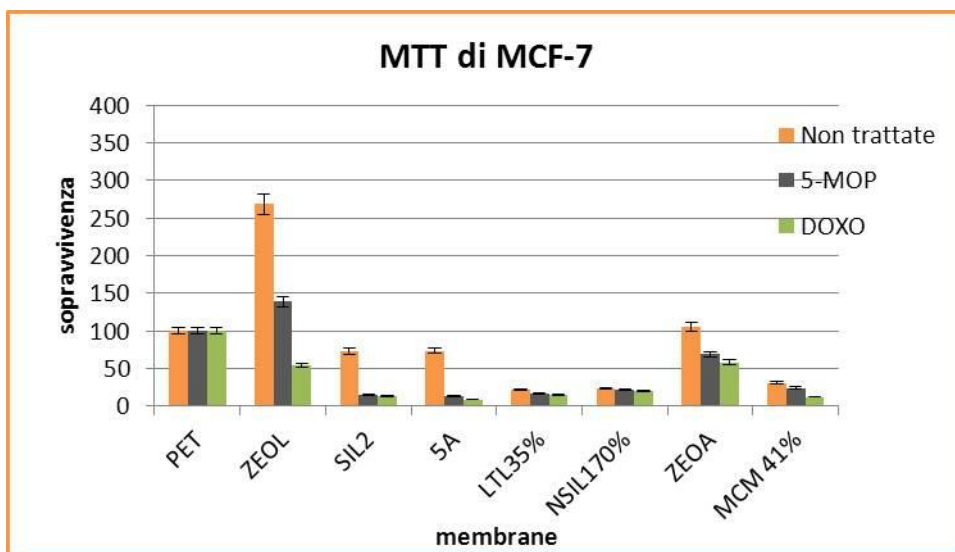


Figura 8.9.a Vitalità cellulare determinata per mezzo del test MTT su cellule MCF-7 dopo 24 ore di trattamento con 5-MOP [10 μ M] e con DOXO [4 μ g/mL].

I risultati sono media di 3 determinazioni condotte in triplicato

- $P < 0.05$ vs PET
- * $P < 0.05$ vs Non trattate

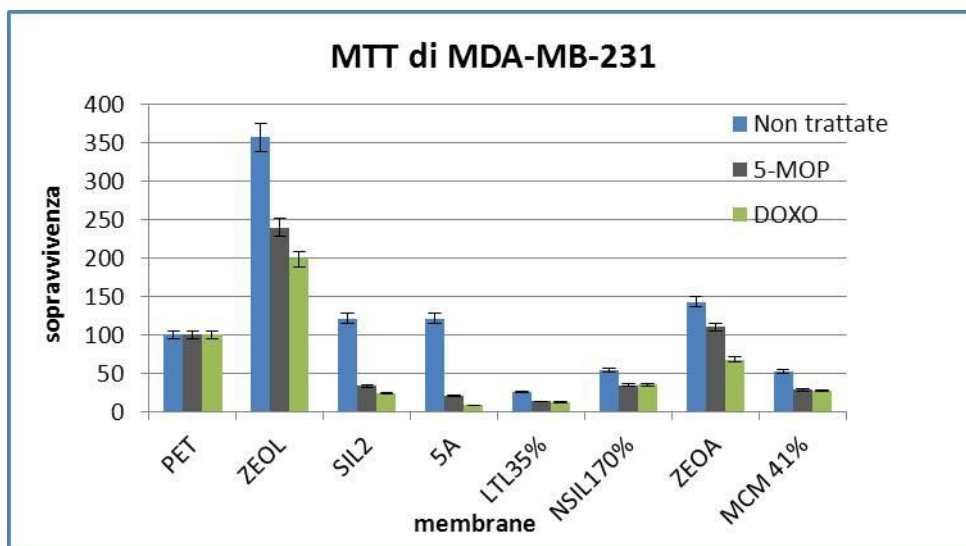


Figura 8.9.b Vitalità cellulare determinata per mezzo del test MTT su cellule MDA-MB-231 dopo 24 ore di trattamento con 5-MOP [10 μ M] e con DOXO [4 μ g/mL].

I risultati sono media di 3 determinazioni condotte in triplicato

- $P < 0.05$ vs PET
- * $P < 0.05$ vs Non trattate

Entrambe le linee cellulari mostrano una riduzione della sopravvivenza in presenza di trattamento con entrambi i farmaci studiati, rispetto alle cellule non trattate.

Tutte e due le linee cellulari, rispetto al controllo di piastratura su PET, mostrano una buona crescita, soprattutto sulle membrane pure. Fra tutte, quella maggiormente in grado di mantenere elevata la sopravvivenza cellulare è la ZeoL. Dal confronto tra le due linee in assenza di trattamento si evidenzia come le cellule MDA-MB-231 siano sempre quelle più vitali rispetto alle altre linee. Il trattamento con 5-MOP e con DOXO riduce la sopravvivenza sia nelle MCF-7 che nelle MDA-MB-231. Queste ultime, tuttavia, sembrano essere più responsive ai trattamenti in presenza degli scaffolds Sil-2 e 5A. Inoltre, le cellule MCF-7 cresciute su membrane ibride (LTL 35%, NSil-1 70%) risentono meno l'effetto del 5-MOP, rispetto alle MDA, analizzate nelle stesse condizioni sperimentali. Risultati analoghi sono stati ottenuti col chemioterapico DOXO che risulta essere più efficace rispetto al 5-MOP.

Un risultato importante ottenuto da questo studio è che entrambi i farmaci sono attivi sulle cellule piastrate sui differenti supporti e che la presenza delle membrane pure modula l'adsorbimento farmacologico.

Capitolo 9

DETERMINAZIONE DELLE METALLOPROTEASI MMP-2 E MMP-9 NEI MEZZI CONDIZIONATI DI COLTURE DI MCF-7 E MDA-MB-231 CRESCIUTE SU MEMBRANE ZEOLITICHE PURE ED IBRIDE

9.1 Determinazione di MMPs

Poiché la produzione delle MMPs, legate alle membrane o secrete dalla cellula, è uno dei meccanismi implicati nell'invasione della matrice extracellulare e nella migrazione cellulare, la loro aumentata produzione nelle cellule tumorali è correlata ad un aumento dell'attività proteolitica e invasiva. Inoltre, poiché i fenomeni complessi che si realizzano, tra le cellule e le superfici dei substrati con le quali interagiscono, influenzano la quantità e la qualità dell'espressione delle MMPs, la quantificazione della loro attività e lo studio della variazione della loro espressione al variare delle proprietà superficiali del supporto, è un interessante indicatore della loro cancerogenicità. E' evidente, quindi, che la valutazione dei quadri di espressione delle MMPs e la loro alterazione, al variare delle caratteristiche fisico-chimiche superficiali e di framework del substrato, sono di notevole importanza.

Pertanto, in questo lavoro di tesi si è voluto analizzare questa correlazione che è stata suffragata dall'analisi morfologica FESEM e dall'analisi chimica elementare EDX. Entrambe queste analisi hanno evidenziato differenti comportamenti cellulari sulle diverse membrane utilizzate, in presenza ed in assenza di DOXO e 5-MOP (Figura 9.4.a).

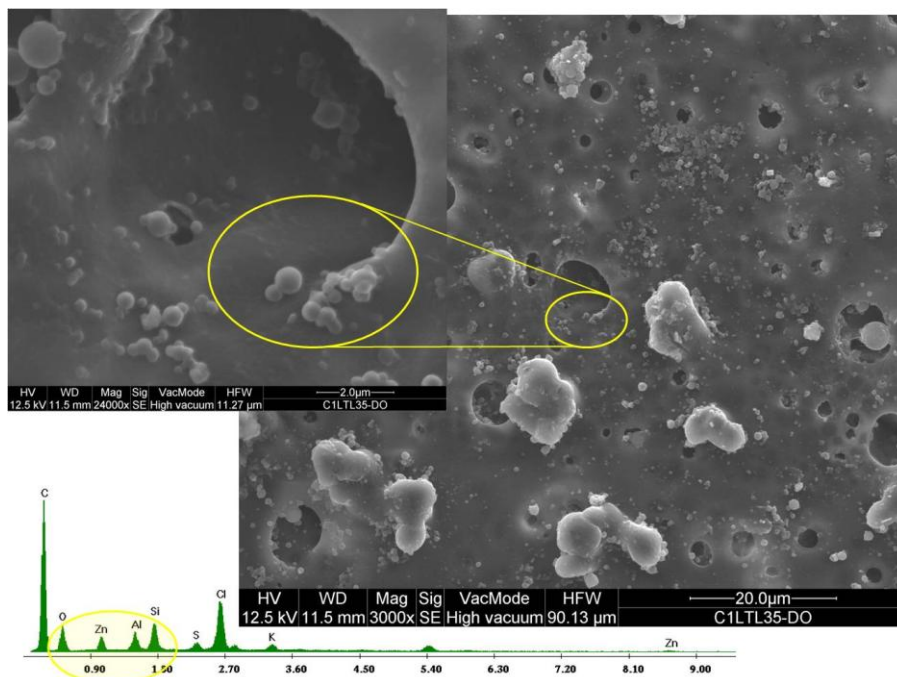


Figura 9.1.a Microfotografie SEM ed analisi EDX su membrana ibrida di LTL 35% con cellule MDA-MB-231 adese e trattate con DOXO per 24 ore.

Inoltre, questo studio ha messo in evidenza come questa metodologia di analisi sia di fondamentale importanza, poiché può rappresentare un test di qualità per saggiare, *in vitro*, le proprietà cancerogene di nuovi biomateriali da utilizzare *in vivo*. Un'ulteriore, importante applicazione suggerita da questo lavoro, è la possibilità di utilizzare questa metodologia, sia per la valutazione degli effetti secondari dovuti alla somministrazione di farmaci antitumorali da utilizzare *in vivo*, sia per saggiare materiali usati per protesi o come innesti o riempimento allo scopo di studiare preventivamente l'eventuale potenziamento dei processi di metastatizzazione e cancerogenicità per applicazioni in molti campi della medicina.

In questo lavoro è stata studiata l'attività delle metalloproteasi MMP-2 e MMP-9 (dette anche gelatinasi A e B, rispettivamente), secrete nei mezzi di coltura dalle cellule tumorali, cresciute su membrane zeolitiche aventi differenti caratteristiche chimico-fisiche (idrofilicità/idrofobicità, acidità superficiale e framework cristallino), composizione chimica e configurazione a membrana. L'espressione della loro attività è stata analizzata attraverso la zimografia per ogni membrana utilizzata come scaffold,

rispetto al controllo seminato su PET. Gli stessi saggi sono stati effettuati nelle medesime condizioni sperimentali in presenza di DOXO, in quanto farmaco elettivo antineoplastico.

Tutti i gel delle zimografie realizzate sono state acquisite per via informatica e le densità relative delle bande sono state determinate ed analizzate con il programma d'immagine JImage 3.4.7.

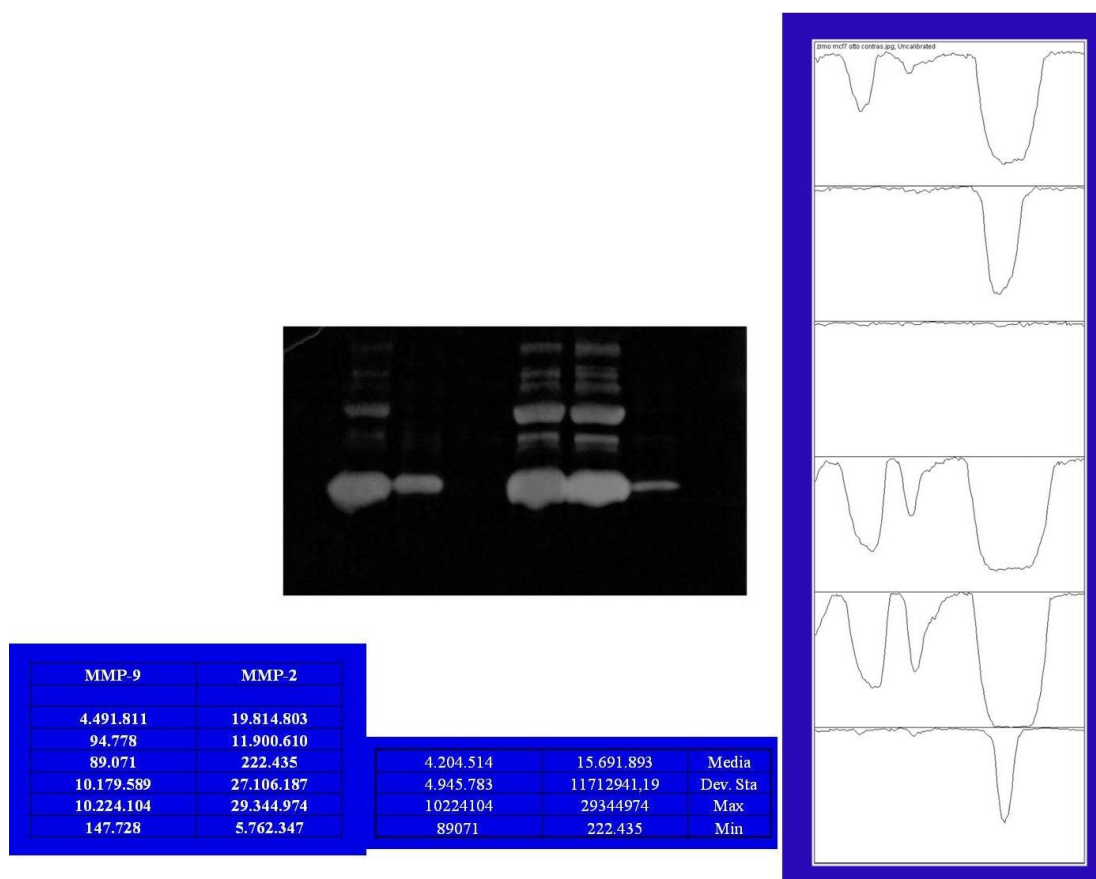


Figura 9.1.b Esempio della determinazione delle MMPs per mezzo dell'analisi d'immagine.

Le membrane zeolitiche sintetiche pure usate in questo lavoro sono:

- ZeoA
- 5A
- ZeoL
- Sil-2
- G-Sil2
- Meso-S2
- MCM41

Le membrane zeolitiche ibride usate in questo lavoro sono:

- N-Sil-1 70%
- MCM41 35%
- LTL 35%
- PLA

L'attività della MMP-2 e della MMP-9 risulta ben evidente nei mezzi condizionati di cellule cresciute su PET.

Le bande relative alle proteasi rilevate nei mezzi condizionati delle cellule cresciute su membrane evidenziano, invece, notevoli differenze relative sia alla linea che al tipo di gelatinasi.

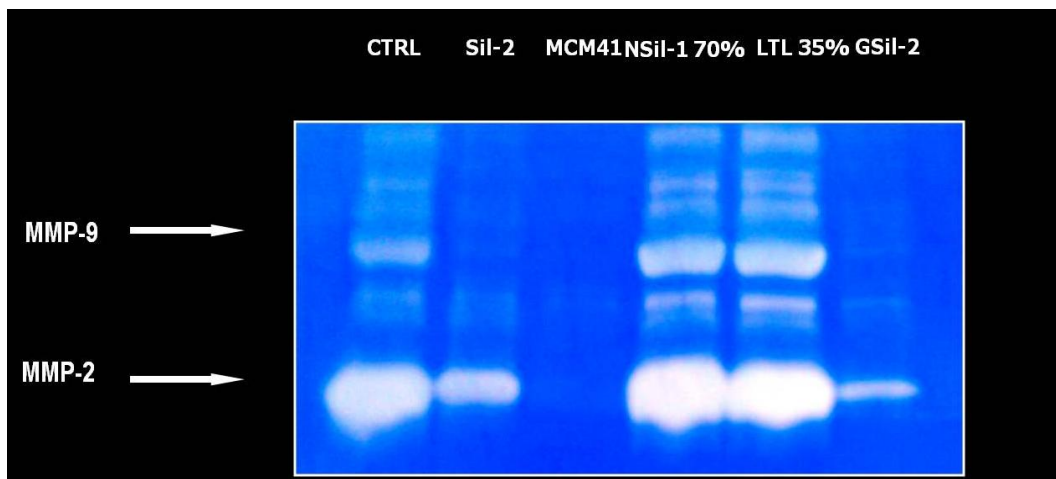


Figura 9.1.c Zimografia relativa ai mezzi condizionati di cellule MCF-7 su membrane zeolitiche sintetiche (CTRL = Cellule seminate su PET).

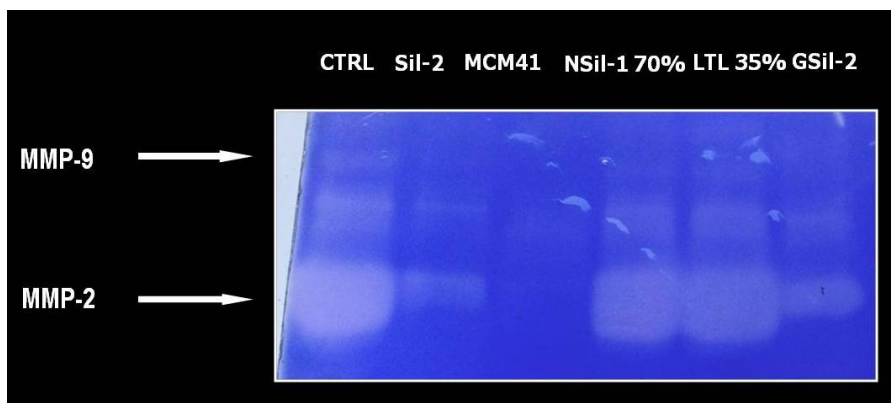


Figura 9.1.d Zimografia relativa ai mezzi condizionati di cellule MDA-MB-231 su membrane zeolitiche sintetiche.

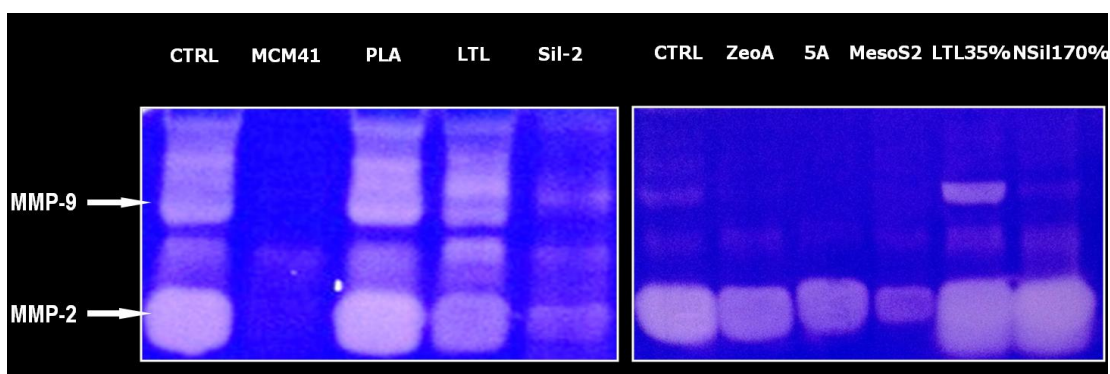


Figura 9.1.e Zimografia relativa ai mezzi condizionati di cellule MCF-7 su membrane zeolitiche sintetiche.

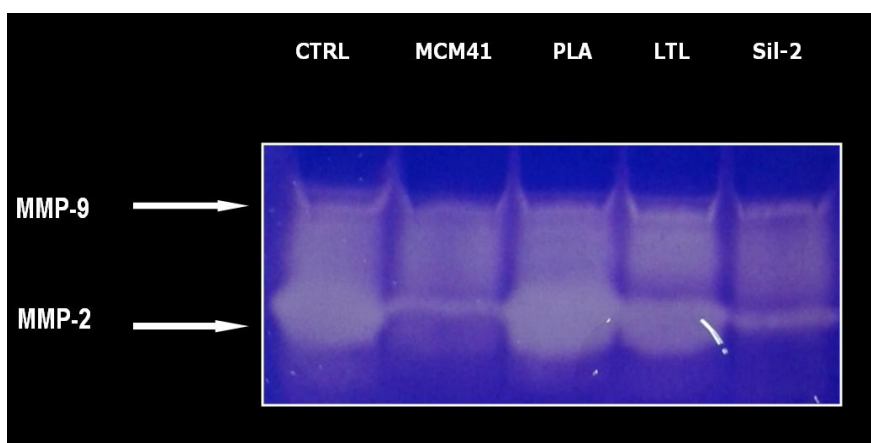


Figura 9.1.f Zimografia relativa ai mezzi condizionati di cellule MDA-MB-231 su membrane zeolitiche sintetiche.

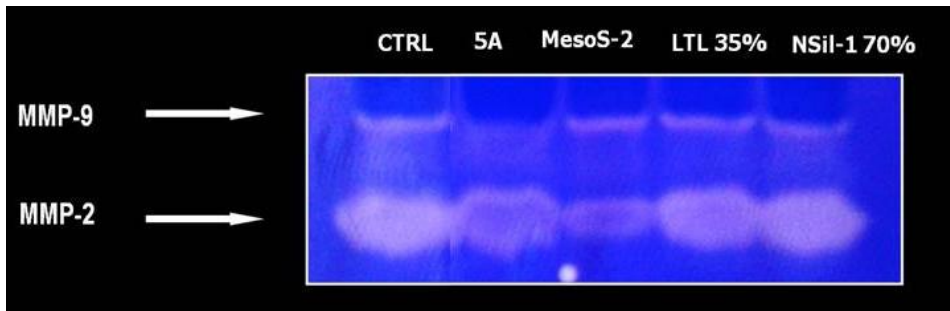


Figura 9.1.g Zimografia relativa ai mezzi condizionati di cellule MDA-MB-231 su membrane zeolitiche sintetiche.

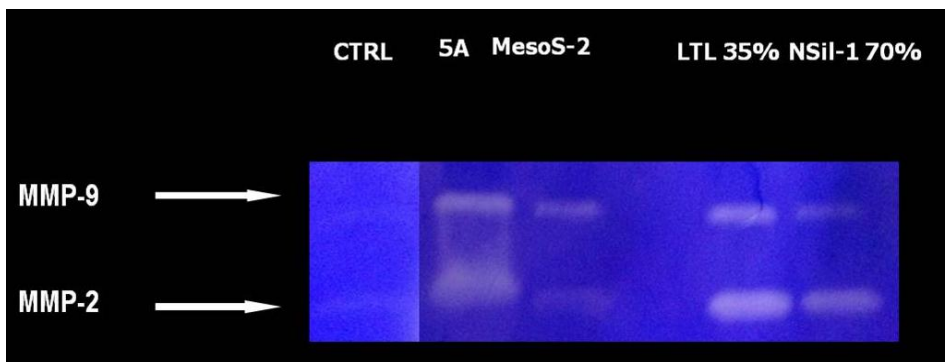


Figura 9.1.h Zimografia relativa ai mezzi condizionati di cellule MDA-MB-231 su membrane zeolitiche sintetiche con DOXO.



Figura 9.1.i Zimografia relativa ai mezzi condizionati di cellule MCF-7 su membrane zeolitiche sintetiche con DOXO.

L'espressione delle proteasi per ogni linea cellulare, cresciuta su un particolare tipo di membrana è caratteristica e ben definita per tipologia di scaffold utilizzato. In particolare, si nota che ognuna delle due linee cellulari esprime maggiormente un tipo di gelatinasi, in accordo alle caratteristiche proprie della cellula. Le MDA-MB-231 esprimono di più le MMP-2 rispetto alle MCF-7 sia nei controlli che nelle cellule seminate sugli scaffolds.

Le cellule MCF-7 ed MDA-MB-231 cresciute su membrane di N-Sil-2 al 70% di PLA , LTL al 35% di PLA e PLA puro esprimono valori più alti di entrambe le gelatinasi rispetto alle altre membrane; le cellule cresciute su membrane di Sil-2, G-Sil-2 ed MCM41 (tutte pure) mostrano una riduzione delle gelatinasi rispetto al PET ed alle ibride. In particolare, la MCM41 esprime livelli bassissimi di proteasi ai limiti della determinazione analitica..

L'analisi zimografica nel complesso ha mostrato l'evidente influenza delle strutture zeolitiche usate come scaffold, rispetto al polietilene tradizionalmente usato per le colture *in vitro*.

La scala di espressione può essere così schematizzata:

per MDA-MB-23

PLA > CTL > LTL 35% > NSil-1 70% > G-Sil-2 > LTL > Sil-2 > MCM-41

per MCF-7

PLA > LTL 35% > NSil-1 70% > CTL > LTL > Sil-2 > G-Sil-2 > MCM-41.

Dopo trattamento con DOXO, per 24 ore, alla concentrazione di 4 µg/mL, le zimografie e le correlate analisi morfologiche SEM mostrano che l'espressione delle MMP-2 e MMP-9 diminuisce notevolmente in entrambe le linee cellulari, soprattutto su quelle adese sugli scaffolds zeolitici puri.

Le analisi qualitative delle zimografie sono state accompagnate da determinazioni quantitative riportate negli istogrammi sottostanti (Figura 9.1.1 e Figura 9.1.m).

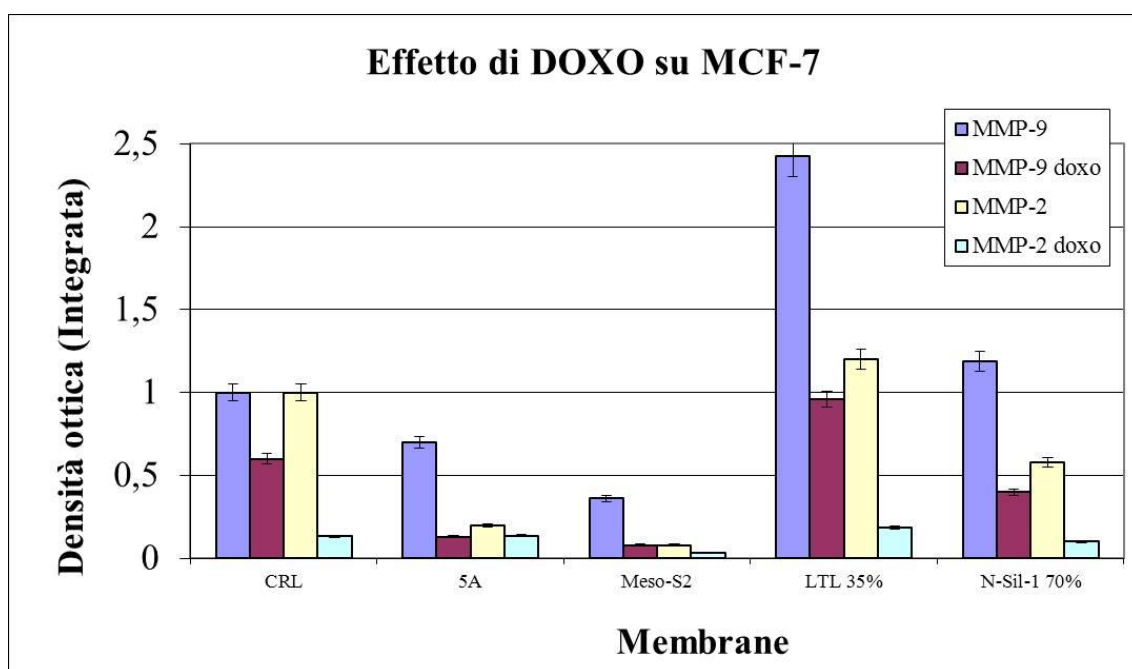


Figura 9.1.1 Influenza del tipo di membrana sull'espressione delle MMPs di MCF-7 dopo somministrazione di DOXO.

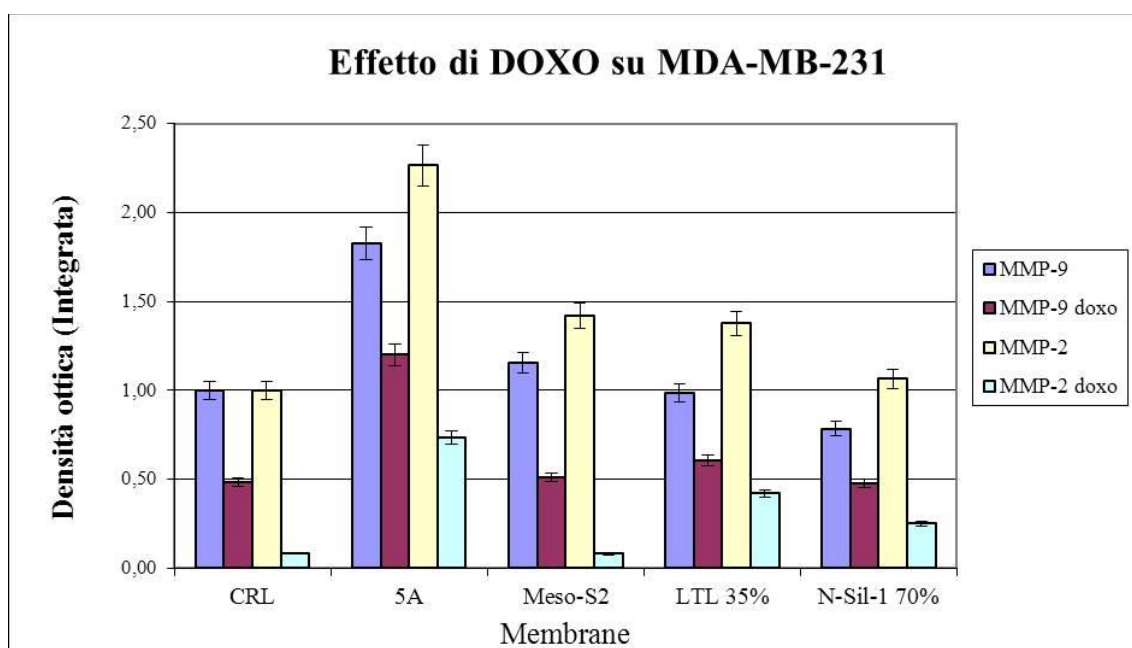


Figura 9.1.n Influenza del tipo di membrana sull'espressione delle MMPs di MDA-MB-231 dopo somministrazione di DOXO.

CAPITOLO 10

MATERIALI E METODI

10.1 Materiali

Di seguito sono riportati i materiali relativi alla parte biologica, quelli relativi alla sintesi e caratterizzazione chimica sono riportati nel relativo capitolo.

PBS, DMEM, DMEM/F-12, FBS, L-glutamine, penicillin/streptomycin, aprotinin, leupeptin, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Tripsina Sigma Aldrich (Milan, Italy); sodium orthovanadate; Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); Albumina di siero bovino (BSA); Hydrocortisone; Dimetilsolfossido; MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltatrazolum bromide; Milk; ECL system; acrilammide-bis acrilammide 37:5:1; acrilamide bis 29:1; blu di bromofenolo; Bergaptene, Sigma Aldrich (Milan, Italy); Doxorubicina cloridrato, Pfizer; NaCl, HCl, Carlo Erba (Milan, Italy).

10.2 Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su linee cellulari di epitelio mammario trasformato , MCF7 ed MDA MB 231.

- La linea MCF7 è stata isolata nel 1970 da adenocarcinoma mammario, da una donna caucasica di 69 anni di età. Le cellule crescono in adesione e mantengono alcune caratteristiche dell'epitelio mammario differenziato come la capacità di legare l'estradiolo, attraverso specifici recettori intracellulari, e di dare le corrispondenti risposte. Le cellule vengono mantenute in coltura nel mezzo DMEM/F12 arricchito del 5% di siero e "in vivo" mantengono la capacità di crescere solo se supplementate con estradiolo, caratteristica distintiva dell'epitelio cellulare mammario differenziato.

- La linea MDA MB-231 è stata isolata nel 1973 da effusione pleurica di una donna caucasica di 51 anni, affetta da adenocarcinoma mammario. Le cellule hanno morfologia epiteliale, crescono in adesione formando un monolayer, ma presentano un fenotipo cellulare differente dal precedente (fig.2). Sono cellule invasive, indicate anche come triple negative in quanto mancano di recettore estrogenico, progestinico e di recettore per l'EGF (HER-2). L'assenza di questi recettori conferisce un maggior grado di autonomia proliferativa in quanto le cellule sono capaci di crescere anche in assenza di fattori ormonali. Prediligono in coltura il mezzo DMEM, arricchito del 5% di siero, ed hanno un potere proliferativo nettamente superiore alle prime.

Considerate le differenti caratteristiche fenotipiche e comportamentali delle cellule, entrambi i cloni rappresentano i due modelli di tumore mammario che più frequentemente si possono riscontrare nelle lesioni "in vivo" e che risultano, pertanto, di grande utilità nei protocolli di studio. Per la loro formazione, le cellule MCF-7 sono state cresciute in un mezzo privo di siero, ricco di fattori di crescita e in piastre non trattate chimicamente (Dontu G., et al., 2003) in modo da non consentire l'attacco delle cellule sul fondo. Il mezzo HMEC (Human mammary epithelial medium) è quello utilizzato per questa modalità di coltura, privo di siero, a cui sono stati aggiunti EGF 20 ng/ml, B27 1x, Eparina 4 µg/ml e Idrocortisone 1ng/ml, Amfotericina B 0,25 µg/ml e Penicillina/Streptomicina 1%. Le cellule vengono piastrate ad una densità di 300.000 cell/Petri (150mm) e lasciate crescere in sospensione per 7 giorni a 37 °C in un'atmosfera 5% CO₂ ottenendo, così, la prima generazione indicata: MCF-7 M1. Le cellule derivanti da questa generazione, al termine della prima settimana di crescita, sono state raccolte, centrifugate (800 g, 1 min), tripsinizzate con 0.05% Tripsina/0.53 mM EDTA-4Na, e lo stesso numero di cellule è stato seminato e mantenuto in coltura per un'altra settimana per ottenere la seconda generazione di MCF-7 denominata pertanto M2.

10.3 MTT Test

L'MTT è un test di vitalità cellulare di tipo colorimetrico basato sulla capacità del sistema mitocondriale di trasporto di elettroni, ed in particolare della succinato deidrogenasi, di ridurre e quindi convertire un sale tetrazolico solubile [3-(4,5-dimetil-

2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolio bromide] di colore giallo, in un prodotto insolubile costituito dai sali di formazano, di colore viola, in quantità direttamente proporzionale alla vitalità cellulare.

Le cellule sono state seminate in piastra da 24 pozzetti alla densità, per pozzetto, di 1×10^5 cellule. Per i trattamenti farmacologici trascorse le prime 24 ore il mezzo è stato cambiato con un mezzo privo di siero ed il giorno successivo le cellule sono state trattate con 5-MOP (10 μ M) o con DOXO (4 μ g/mL). Al termine del trattamento, il surnatante è stato eliminato dai pozzetti e sono stati aggiunti 100 μ l di soluzione di MTT alla concentrazione di 0.5 mg/ml. La piastra è stata incubata per 3 h a 37°C e successivamente ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di DMSO 100%, per lisare le cellule e solubilizzare il sale precipitato. Dopo aver lasciato la piastra in agitazione per qualche minuto, si è condotta la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 570 nm. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo, calcolata come l'assorbanza delle cellule trattate/cellule controllo x 100.

10.4. Zimografia

La tecnica zimografica è una variante della classica metodica di analisi elettroforetica che permette di evidenziare su gel l'attività enzimatica delle metalloproteasi (MMP), grazie alla presenza di uno specifico substrato, la gelatina (per le gelatinasi MMP-9 ed MMP-2).

L'esame è stato condotto su mezzo condizionato prelevato dalle linee cellulari in studio cresciute su membrane zeolitiche pure ed ibride, tal quali e dopo trattamento farmacologico..

Dapprima le proteine del mezzo sono state concentrate in acetone freddo a -20°C e risospese in opportuno solubilizzante contenente glicerolo, SDS 10% e blu di bromofenolo. La corsa è effettuata in condizioni denaturanti ma non riducenti, cioè caricando immediatamente il campione dopo aver aggiunto tampone di denaturazione non riducente, senza bollitura.

Alla corsa elettroforetica è fatta seguire una fase prima di rinaturazione con speciali buffer contenenti Triton X 100, che rimuove i residui di SDS presenti nel gel di poliacrilammide; a questa prima fase segue quella di incubazione in condizioni di

temperatura idonea e in presenza di cofattori in modo da favorire l'attività dell'enzima. La tecnica si conclude con la colorazione del gel con Blu di Comassie o con un altro colorante generico per le proteine. La presenza nel campione analizzato di attività MMP è evidenziata con la presenza di bande "non colorate" che rappresentano l'esito della digestione da parte dell'enzima delle proteine substrato presenti nel gel.

10.5 Diffrazione a raggi X.

Lo strumento utilizzato nel presente lavoro di tesi è un Philips PW-3830 X-ray generator.

La diffrazione ai raggi X è la tecnica più importante per l'analisi dei solidi cristallini, siano essi in polvere o a cristalli singoli. L'analisi di uno spettro di diffrazione a raggi X (XRD), pur non fornendo informazioni dirette sulla composizione chimica di un campione, permette di definire e quantificare le fasi cristalline presenti in un qualsiasi materiale nei primi 20 micron di superficie.

Qualunque radiazione elettromagnetica è in grado di interagire con la materia attraverso due processi principali:

- assorbimento: nel corso del quale la radiazione cede tutta o parte della propria energia al sistema materiale, aumentandone la temperatura o determinandone la transizione ad uno stato eccitato. Nel caso dei raggi X, la radiazione incidente ha energia sufficiente per provocare transizioni elettroniche, ed espellere elettroni dagli atomi (effetto fotoelettrico).
- diffusione (*scattering*): nel corso del quale la radiazione viene diffusa dalla materia e le onde elettromagnetiche ad essa associate cambiano direzione di propagazione. Tale cambiamento può essere accompagnato da scambio di energia tra fotoni e materia (*scattering anelastico*; *scattering termico diffuso*) o no (*scattering elastico*).

La tecnica della diffrazione di raggi X si basa sullo scattering elastico coerente: il fenomeno macroscopico della diffrazione nasce infatti dalla somma coerente di tutte le onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi che si trovano lungo una stessa famiglia di piani reticolari. Per manifestarsi, richiede necessariamente la presenza di un ordine a lungo raggio, come si riscontra nei cristalli.

A seconda della natura del campione sotto esame si divide in diffrazione su cristallo singolo (SC-XRD, *single crystal X-ray diffraction*) e diffrazione di polveri (XRPD, *X-ray powder diffraction*). La prima tecnica è in grado di dare informazioni tridimensionali sulla densità elettronica e sui moti termici di ogni atomo costituente il cristallo: tuttavia, la difficoltà di ottenere cristalli singoli e la complessità dell'analisi dei dati la rendono una tecnica non routinaria. Estremamente più diffusa è invece la diffrazione di raggi X di polveri, che è molto più veloce ed economica, e permette di quantificare le varie componenti di un campione solido, e di ricavare anche informazioni sulla struttura cristallina e sulla dimensione dei cristalliti.

Una radiazione X incide la superficie di un campione; interagendo con il reticolo cristallino si determina una variazione di energia dovuta al passaggio degli elettroni da uno stato eccitato a quello di riposo: una sonda opportunamente orientata registra queste variazioni.

Tale processo quantistico di rilascio, per il principio di conservazione dell'energia, è accompagnato da emissione di radiazioni da parte del reticolo, per effetto della radiazione catodica incidente, essenzialmente nella banda delle frequenze dei raggi X.

I raggi X si possono suddividere in due gruppi a seconda dei processi che li originano:

- *raggi X di frenamento*: emessi da fasci di elettroni con energie maggiori di 100 eV, quando vengono bruscamente frenati dall'urto con gli atomi dell'anticatodo;
- *raggi X caratteristici degli atomi*: derivanti dall'esercitazione degli elettroni interni degli atomi dell'anticatodo per bombardamento di elettroni.

Il secondo gruppo è quello sfruttato per l'analisi in diffrazione, in quanto l'energia presenta picchi di intensità in corrispondenza di lunghezze d'onda ben definite.

Il tipo di analisi effettuate è l'XRPD utilizzando lo strumento PW 3830 X-ray generator, Philips.

I campioni cristallini vengono finemente macinati in un mortaio di agata allo scopo di evitare l'orientazione preferenziale dei cristalli e, in seguito, sottoposti ad un fascio monocromatico di raggi X. Il processo di interazione è regolato dalla legge di Bragg, la quale afferma che facendo incidere un'opportuna onda elettromagnetica su di un cristallo si osservano fenomeni di interferenza, causate dalla riflessione di onde da parte di piani cristallini diversi ma paralleli.

Essa è riassunta dall'equazione:

$$n\lambda = 2d \sin(\Theta)$$

dove:

- θ è l'angolo che il fascio incidente forma col piano cristallino,
- λ è la lunghezza d'onda della radiazione,
- d è la distanza tra due piani adiacenti,
- n indica l'ordine della diffrazione (tipicamente solo quello per $n=1$ è apprezzabile).

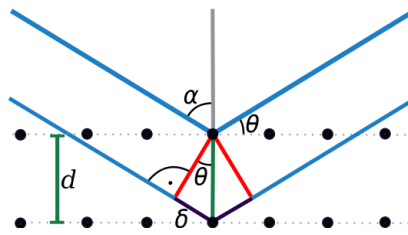


Figura 5.5a: Schema illustrativo della legge di Bragg.

10.6 Microscopia elettronica a scansione (SEM).

Il microscopio elettronico è un tipo di microscopio che non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni ma un fascio di elettroni. L'utilizzo di questo tipo di apparecchiature consente di avere una risoluzione superiore di parecchi ordini di grandezza rispetto ad un microscopio ottico, in quanto il potere di risoluzione di un microscopio è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda della radiazione che utilizza, e quella dei fotoni è di molto maggiore rispetto a quella degli elettroni. Nel microscopio elettronico a scansione un fascio di elettroni, generato da un emettitore costituito da un filamento di tungsteno, o di esaboruro di lantanio, più costoso ma con migliore rendimento energetico con guadagno in termini di sensibilità, che viene portato oltre i 1000 °C per riscaldamento elettrico, funge da sorgente di elettroni per effetto termoionico. Il fascio elettronico così generato viene dapprima accelerato da una differenza di potenziale di 0,3-30 KV e quindi passa prima attraverso un collimatore elettromagnetico per essere deflesso, in modo da generare la scansione, e finalmente collimato verso il campione in esame.

Gli elettroni del fascio incidente, primari, danno luogo a vari effetti, quali l'emissione

di elettroni secondari e retrodiffusi da parte del campione. Questi elettroni vengono rilevati da uno speciale rivelatore e convertiti in impulsi elettrici. Il fascio non è fisso ma viene fatto scandire: viene cioè fatto passare sul campione in una zona rettangolare, riga per riga, in sequenza. L'immagine fornita viene formata in un tubo a raggi catodici. Per l'osservazione di un campione, è necessario creare il vuoto all'interno del microscopio ($P = 10^{-4} / 10^{-5}$ mbar) in modo da ridurre le interazioni tra elettroni e molecole di gas. Uno schermo fluorescente fornisce la classica immagine generata dal SEM. La risoluzione spaziale ottenibile in immagini da elettroni retrodiffusi è inferiore a quella ottenibile con gli elettroni secondari. Tuttavia le immagini da elettroni retrodiffusi consentono di ottenere il cosiddetto contrasto di fase, cioè la distribuzione spaziale delle varie fasi presenti nel campione.

La forma del volume di emissione degli elettroni backscatterati dipende, a parità di energia degli elettroni incidenti, dal numero atomico medio del campione. Questo fatto viene impiegato soprattutto nell'analisi di materiali compositi dove la diversità di numero atomico viene visualizzata con diverse tonalità di grigio: i campioni e le regioni dei campioni emettono tanto maggiormente elettroni retrodiffusi quanto maggiore è il loro numero atomico medio e perciò appaiono più chiare nelle immagini. L'ingrandimento prodotto dal microscopio a scansione è il rapporto tra le dimensioni tra l'immagine finale prodotta e il campo esplorato dal fascio elettronico sul campione.

L'ingrandimento può andare da 10 a 200.000 x ed il potere risolutivo può spingersi fino a 4 nm.

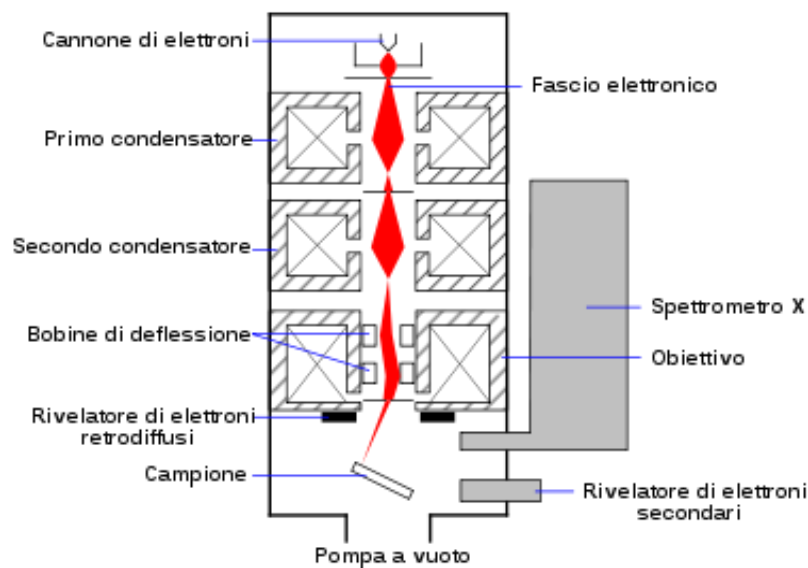


Figura 10.6 Schema di un microscopio SEM-EDX.

10.7 Analisi EDX.

L'analisi EDX, (analisi a dispersione di energia dei raggi X) è un'apparecchiatura aggiuntiva del microscopio SEM (Scanning Electron Microscopy) che fornisce, nel giro di poco tempo, informazioni sul materiale in esame con una metodica non distruttiva. Gli elettroni creati dal flusso di elettroni vengono proiettati sul campione. Con il detector EDX montato sul SEM viene determinata l'energia emanata che viene, a sua volta, immessa in un programma e rappresentata sotto forma di diagramma.

Il rivelatore, che è disposto in modo tale da ricevere il massimo livello di radiazione assorbibile, può essere del tipo a *dispersione di lunghezza d'onda (WDS)* o a *dispersione di energia (EDS)*, ognuno con rispettivi pro e contro:

- *rivelatore WDS*: sfrutta le caratteristiche ondulatorie dei fotoni X. È costituito da un cristallo ricurvo, il "cerchio di Rowland", con un determinato passo d del reticolo cristallino, sul quale sono disposti il campione e il contatore di fotoni. Seguendo la legge di Bragg, solamente una determinata lunghezza d'onda sarà riflessa sul contatore, lunghezza d'onda che può essere variata ruotando il rivelatore.
- *rivelatore EDS*: sfrutta l'interazione energetica tra i raggi X e un opportuno materiale. È caratteristicamente rappresentato da un monocristallo di silicio drogato con litio, rivestito alle due estremità con uno strato conduttivo in oro, mantenuto in alto vuoto e alla temperatura di $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ con azoto liquido. Il cristallo di germanio ad elevata purezza rappresenta una moderna evoluzione più efficiente. Il principio di funzionamento sfrutta la produzione di corrente elettrica, che viene sensibilmente amplificata, generata per interazione tra fotoni e cristallo. Sono i rivelatori attualmente più utilizzati.

L'analisi EDX sfrutta l'emissione di raggi X di determinata lunghezza d'onda. L'analisi che viene prodotta può essere sia sull'area che in quel momento è ingrandita oppure fermando la scansione del fascio elettronico su un punto di interesse preciso sulla superficie del campione (per esempio sparando un singolo cristallo di zeolite).

Dato che la porzione di spazio citata dal fascio elettronico, che produce lo spettro X, è un intorno del punto di pochi micron, il SEM-EDS è un potente mezzo di indagine su solidi chimicamente disomogenei a scala microscopica. Le applicazioni pratiche sono principalmente rivolte alla caratterizzazione qualitativa di sostanze solide e all'analisi

elementare, con la possibilità di rilevare anche la presenza di elementi in tracce. Con l'ausilio di opportuno software è anche possibile un approccio quantitativo sulla base della legge di Lambert-Beer.

Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è un FESEM, FEI- Philips, Quanta 200.

10.8 Spettrofotometria.

La spettrofotometria è una tecnica analitica, qualitativa e quantitativa che, avvalendosi dell'uso dello spettrofotometro, permette il riconoscimento e la precisa determinazione di una sostanza in base al suo spettro di assorbimento della luce.

E' noto che molte sostanze naturali ed artificiali si presentano al nostro occhio colorate. Questo fenomeno è dovuto al fatto che le sostanze illuminate da una luce policromatica (luce bianca) assorbono selettivamente i raggi di talune lunghezze d'onda e la luce riflessa si presenta quindi colorata del colore complementare a quello assorbito.

Lo spettrofotometro è costituito dai seguenti componenti:

- una sorgente luminosa che da origine ad una radiazione policromatica in un certo intervallo di lunghezze d'onda (lampada a filamento di tungsteno per la luce visibile);
- un selezionatore di lunghezza d'onda o monocromatore che risolve il fasciopolicromatico in radiazioni a lunghezza d'onda determinata;
- un pozzetto per l'introduzione delle cuvette;
- una cellula fotoelettrica sulla quale incide il raggio emergente dalla soluzione in esame;
- un sistema di amplificazione della corrente emessa dalla fotocella;
- un galvanometro per la misura di tale corrente elettrica.

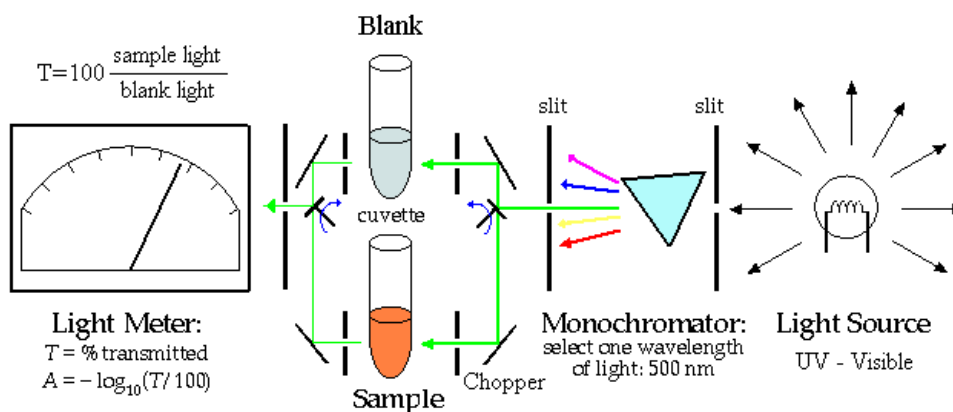


Figura 10.8a: Schema di funzionamento di uno spettrofotometro a doppio raggio.

L'analisi spettrofotometrica è applicabile con specifici accorgimenti alla determinazione di tutte le sostanze. In particolare, se la sostanza in esame è di per sé fotoassorbente alla lunghezza d'onda scelta è possibile una misura diretta, se non lo è allora viene fatta reagire con una sostanza che è un colorante dando un prodotto finale colorato (addotto) che può essere facilmente determinato.

Condizione essenziale è che esista un rapporto stechiometrico tra il composto colorato e la sostanza in esame ed inoltre che la reazione sia specifica per la sostanza in questione onde evitare reazioni secondarie indesiderate con le altre sostanze presenti in soluzione. Quando si esamina un soluto in soluzione, sia direttamente che dopo determinate reazioni chimiche, è molto probabile che le altre sostanze presenti nella soluzione possano assorbire alla lunghezza d'onda scelta per l'analisi. L'eliminazione di assorbimenti che costituiscono un "rumore di fondo" si ottiene allestendo un "bianco" che contenga tutti i reagenti usati per la prova in questione, tranne il soluto che interessa per l'analisi fotometrica.

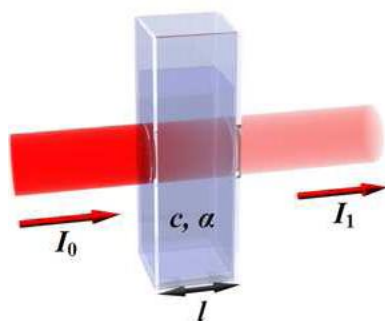
La differenza di assorbimento fra la prova ed il bianco è quindi il vero valore dell'assorbimento che corrisponde al soluto in esame. In pratica, questo si ottiene azzerando lo spettrofotometro ad un valore 100% T_s quando viene inserito nel pozzetto il bianco. Quando si inserisce il campione, si ottiene quindi l'assorbimento del soluto.

La spettrofotometria nel campo del visibile (350-750 nm) e dell'ultravioletto vicino (190-350 nm, range comunemente esplorato da uno spettrofotometro convenzionale UV-visibile) ha una vastissima serie di applicazioni sia per quel che riguarda la determinazione e l'identificazione della struttura di molecole sia per quel che riguarda problemi analitici (determinazioni quantitative).

La spettrofotometria UV-Visibile, infatti, rappresenta un metodo molto potente per l'analisi quantitativa di soluzioni diluite (10^{-3} - 10^{-5} M).

Il metodo analitico si basa sulla LEGGE DI LAMBERT-BEER, che esprime la relazione lineare tra concentrazione ed assorbanza misurata ad una definita lunghezza d'onda.

- *Legge di Lambert-Beer*: “Si consideri una soluzione di una sostanza colorata. Un raggio luminoso passando attraverso la soluzione può essere assorbito in maniera diversa, a seconda della sua lunghezza d'onda. Se I_0 è l'intensità del raggio incidente, l'intensità I_1 del raggio emergente o trasmesso sarà tanto minore rispetto a I_0 quanto maggiore è stato l'assorbimento.”



Si definisce *trasmittanza* (T) della soluzione colorata il rapporto $T = I_1/I_0$.

L'*assorbanza* è la grandezza inversa della trasmittanza.

La trasmittanza di una soluzione contenente un soluto colorato dipende dai seguenti fattori:

- lunghezza d'onda,
- natura chimico-fisica del soluto,
- concentrazione del soluto nella soluzione,
- lunghezza del cammino ottico, ovvero della distanza che il raggio incidente percorre attraverso la soluzione.

10.9 Spettroscopia infrarossa.

La spettroscopia infrarossa o spettroscopia IR è una tecnica spettroscopica di assorbimento normalmente utilizzata nel campo della chimica analitica e della caratterizzazione dei materiali, oltre che in chimica fisica per lo studio dei legami chimici.

Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. In un tipico spettro infrarosso in ascissa troviamo una scala di frequenze espresse in numero d'onda, ovvero quantità di onde per centimetro, e in ordinata la percentuale di trasmittanza. Se un materiale è trasparente alla radiazione infrarossa il suo spettro si presenterà come una linea parallela all'asse delle ascisse. Se un materiale non è completamente trasparente si verificheranno degli assorbimenti e quindi delle transizioni tra livelli energetici vibrazionali. In questo secondo caso lo spettro registrato sarà caratterizzato da una serie di picchi di altezza variabile per ciascuna transizione.

Il modello teorico considera una semplice molecola formata da due atomi diversi comportarsi come un oscillatore armonico per il quale è applicabile la legge di Hooke (nella realtà è presente una certa anarmonicità che rende conto della dissociazione del legame chimico). Applicando l'equazione di Schrödinger a un tale sistema si ottiene

$$-\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2\Psi}{dx^2} + \frac{1}{2}kx^2\Psi = E\Psi$$

dove μ è la massa ridotta e k la costante di forza del legame.

La risoluzione di tale equazione fornisce i livelli energetici vibrazionali permessi, che possiedono energia

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) \hbar\omega$$

dove v è il numero quantico vibrazionale e ω la frequenza vibrazionale data dalla relazione

$$\omega = \left(\frac{k}{\mu}\right)^{1/2}.$$

Introducendo il termine vibrazionale $G(v)$ è possibile esprimere le energie in funzione del numero d'onda:

$$G(v) = \left(v + \frac{1}{2}\right) \tilde{\nu}$$

il numero d'onda vibrazionale si ricava applicando l'equazione

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \left(\frac{k}{\mu}\right)^{1/2}.$$

Da quanto detto è banalmente verificabile che tanto maggiore è la forza del legame

tanto maggiore sarà la frequenza di vibrazione per un dato livello vibrazionale, mentre più pesanti saranno gli atomi minore sarà la frequenza vibrazionale. Di conseguenza è sperimentalmente verificabile un effetto isotopico sullo spettro.

La condizione necessaria affinché una radiazione infrarossa possa originare una transizione vibrazionale consiste nel verificarsi di un cambiamento del dipolo elettrico molecolare a seguito del cambiamento di posizione degli atomi. Quindi le molecole omoatomiche (come N_2 o O_2) non sono attive all'infrarosso, mentre molecole apolari quali CO_2 possono entrare in risonanza con la radiazione solamente grazie alle vibrazioni asimmetriche che producono un dipolo istantaneo.

Considerando una molecola lineare formata da N atomi, in base all'orientamento lungo i tre assi cartesiani (x , y , z) sono possibili $3N-5$ diversi modi vibrazionali; per una molecola non lineare tali modi sono $3N-6$. Questo perché abbiamo $3N$ gradi di libertà meno 3 di traslazione e 3 di rotazione (quindi $3N-6$) per le molecole non lineari e 3 di traslazione e 2 di rotazione (quindi $3N-5$) per le molecole lineari.

Le vibrazioni possono essere di due tipi: stiramento del legame chimico (stretching) e deformazione dell'angolo di legame (bending). Lo stiramento consiste in una variazione periodica della distanza interatomica e può essere simmetrico se i due atomi si avvicinano o allontanano contemporaneamente (indicato con ν_s) o asimmetrico nel caso contrario (indicato con ν_a). La deformazione può pure essere simmetrica o asimmetrica e può avvenire lungo il piano su cui giace l'angolo di legame o fuori da tale piano. La deformazione simmetrica nel piano è detta scissoring (apertura e chiusura di una forbice, indicata con δ), mentre quella asimmetrica è chiamata rocking (oscillazione, indicata con ρ); la deformazione simmetrica fuori dal piano è detta twisting (torsione, indicata con τ) mentre quella asimmetrica fuori dal piano è chiamata wagging (agitamento, indicata con la lettera w).

Schematicamente un classico spettrofotometro IR è essenzialmente costituito da una sorgente il cui fascio di luce viene convogliato verso il campione e il riferimento, quest'ultimo costituito solitamente dal liquido in cui tale campione è disciolto. Segue il monocromatore la cui funzione è quella di selezionare una specifica lunghezza d'onda e un chopper (sistema ottico a forma di semidisco che negli strumenti a doppio raggio è posto anche dopo la sorgente per sdoppiare il raggio di luce) che indirizza alternativamente al rivelatore la radiazione proveniente rispettivamente dal campione e dal riferimento. Il rivelatore è il componente finale che genera un segnale in funzione

della concentrazione di analita presente.

Le sorgenti IR comunemente utilizzate sono del tipo a incandescenza e sono rappresentate dai filamenti di Nernst costituiti da ossidi sinterizzati, le global formate da bacchette di carburo di silicio e che richiedono un raffreddamento esterno, mentre negli strumenti a minor costo vengono utilizzate anche comuni resistenze al nichel-cromo. Alcuni strumenti sono dotati anche di una sorgente a laser.

I campioni solidi per essere analizzati necessitano di essere sottoposti a uno dei seguenti trattamenti:

- ridotti in strati sottili di pellicola;
- portati in fine sospensione macinando in apposito mortaio con nujol;
- macinati finemente con KCl o KBr in modo da ottenere poi, grazie ad una apposita pastigliatrice, un dischetto omogeneo.

I rivelatori sono costituiti da dispositivi in grado di convertire il contenuto termico della radiazione infrarossa in segnale. A questo scopo comunemente diffusi sono le termocoppie e i termistori: le termocoppie generano una differenza di potenziale a seguito della differenza di temperatura che si stabilisce tra due giunti sensibili, mentre i termistori sono dei componenti resistivi che costituiscono uno dei quattro rami di un ponte di Wheatstone che viene sbilanciato al variare della loro resistenza in funzione della temperatura. Il rivelatore di Golay è un dispositivo molto sensibile e praticamente insostituibile nel lontano IR; esso sfrutta l'aumento di pressione di un gas all'interno di una microcella provocato da un aumento di temperatura. Tale aumento di pressione deforma una parete elastica speculare e la luce prodotta da una sorgente ausiliare che colpisce questa parete viene riflessa su una fotocellula, la quale genera una corrente elettrica che varia al variare della deformazione. I rivelatori fotoelettrici possono essere utilmente impiegati solamente nel vicino IR, in particolare vengono adoperate le celle fotoconduttive. Vengono utilizzati anche rivelatori basati su materiali piroelettrici, dotati di tempo di risposta molto basso.

La spettroscopia IR a trasformata di Fourier, o in forma abbreviata FT-IR, viene realizzata sfruttando un interferometro che permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione IR generata dalla sorgente (quasi esclusivamente le global). La scansione è possibile grazie a uno specchio mobile che spostandosi introduce una differenza di cammino ottico, che origina una interferenza costruttiva o distruttiva con il raggio riflesso da uno specchio fisso. In questo modo si ottiene un interferogramma che

mostra la rappresentazione dell'intensità nel dominio del tempo. Applicando la trasformata di Fourier un calcolatore permette di ottenere lo spettro infrarosso, ovvero la rappresentazione dell'intensità nel dominio della frequenza. In questo tipo di strumenti è presente anche un laser He-Ne che emette luce rossa (632,8 nm) e serve a misurare la posizione esatta dello specchio ed è utilizzato anche per il campionamento del segnale. Tra i principali vantaggi della FT-IR, che garantisce prestazioni più elevate, vi è l'elevata disponibilità di energia che si traduce in un rapporto segnale/rumore nettamente migliore rispetto alla classica spettroscopia infrarossa. Inoltre i tempi di analisi risultano sensibilmente ridotti. Altre caratteristiche sono la presenza trascurabile di luce diffusa e il potere risolutivo che resta costante lungo tutto lo spettro IR.

Discussione e Conclusioni

La ricerca svolta ha messo in risalto come alcuni scaffolds zeolitici possano essere degli ottimi substrati su cui stratificare le cellule e studiarne il loro comportamento. In effetti le interazioni tra le cellule e gli scaffolds sono fortemente influenzate dalle proprietà di superficie dei materiali sintetizzati aventi differenti caratteristiche chimico-fisiche (idrofilicità/idrofobicità, acidità superficiale e framework cristallino), composizione chimica e configurazione a membrana.

Difatti, il lavoro svolto ha evidenziato che le Membrane Zeolitiche pure sono un eccellente biomateriale per supportare l'adesione e la crescita di cellule neoplastiche, questo risultato prospetta ulteriori e future investigazioni. E' bene ribadire come le cellule MCF-7 mostrino una selettività di crescita proprio su tali membrane rispetto a quanto visto per le cellule MDA-MB-231.

Inoltre, l'osservazione al SEM ha evidenziato per quest'ultima tipologia cellulare una minore capacità di adesione al supporto rispetto alle MCF-7. A tale riguardo è bene ricordare come le cellule MDA-MB-231 siano un fenotipo cellulare più aggressivo e mobile rispetto alle altre cellule in quanto non esprimono sulla loro superficie le proteine di adesione quali le E-caderine (Mbalaviele G., et al. 1996).

Una ulteriore differenza tra le membrane zeolitiche pure ed ibride è il loro differente comportamento rispetto all'adsorbimento delle molecole farmacologiche prese in esame (DOXO e 5-MOP). Le prime, pur sostenendo meglio la sopravvivenza come prima anticipato, sono capaci di adsorbire più farmaco rispetto a quanto fanno le membrane ibride, veicolandone molto di più, e provocando, nel contempo, una riduzione più drastica della sopravvivenza in seguito a trattamento. Tale dato infatti è ben evidente dall'analisi dei risultati degli adsorbimenti farmacologici eseguiti sulle sole membrane. Pertanto lo scaffold zeolitico puro in quanto capace di sostenere la vitalità cellulare e contemporaneamente di adsorbire più facilmente molecole farmacologiche, potrebbe rappresentare il substrato elettivo per veicolare sostanze. Le caratteristiche superficiali di struttura di queste membrane potrebbero permettere la realizzazione di nuovi materiali mirati ad adsorbimenti e rilasci gradualmente nel

tempo a seconda del framework zeolitico.

Un altro parametro da noi preso in esame è quello riguardante le MMP, enzimi che “segnano” il potere metastatico ed invasivo proprio delle cellule tumorali. Anche in tal caso la struttura e le caratteristiche fisico-chimiche dei differenti supporti ha variamente influenzato l’attivazione di questa classe di enzimi. Dall’analisi dei dati, le membrane ibride sono risultate quelle che in maggior misura potevano esprimere e sostenere di più le gelatinasi. E’ bene ribadire che queste ultime tipologie di membrane, pur sostenendo di meno la vitalità cellulare, sono quelle che permettono un maggior rilascio di questa classe di proteasi. Anche l’analisi al SEM ha mostrato in maniera inconfutabile la presenza di molte microvescicole proprio sulle cellule stratificate sui supporti membranosi ibridi, la cui natura enzimatica riconducibile alle gelatinasi è stata confermata tramite la rilevazione di zinco per mezzo dell’analisi chimica elementare EDX.

Complessivamente il lavoro di tesi ha messo in risalto, per la prima volta, come sia possibile utilizzare scaffolds “zeolitici puri ed ibridi” che, in funzione proprio delle differenti caratteristiche superficiali di struttura possono essere utilizzati per veicolare sostanze a livello cellulare e guidarne, così le diverse risposte biologiche. Inoltre il settaggio dei differenti metodi di analisi di coltura cellulare su supporti a membrana, così come riportato in questo lavoro, può rappresentare un’utile metodologia per testare le proprietà funzionali delle cellule e delle molecole da veicolare nei sistemi biologici.

Riferimenti bibliografici

- Black J. *Biological performance of materials*, (1992) 2nd ed. New York M. Dekker
- Breck W., Grose R. W., *A correlation of the Calculated Intracrystalline Void Volumes and Limiting Adsorption Volumes in Zeolites*, Molecular Sieves-Advances in Chemistry, 121 (1973), 319-329,
- Breck W., *Recent Advances in Zeolite Science*, Molecular Sieves-Advances in
- Chabner B. A., Amrein P. C. , Druker B. J., Michaelson M.D., Mitsiades C.S., Goss P. E., Ryan D.P., Ramachandran S., Richardson P.G., Supko J.G., Wilson W. H. , in *Goodman & Gilman: Le Basi Farmacologiche della terapia, IX edizione* McGraw Hill, 2000
- Coronas J. , *Present and future synthesis challenges for zeolites* , Chemical Engineering Journal 156 (2010) 236-242
- Diawara M.M. and Trumble J.T., *Linear furanocoumarins*, in D'Mello JPF (ed) Handbook of plant and fungal toxicants. 1st ed. CRC Press: New York, NY, (1997) 175-188
- Fukuzaki H., Yoshida M., Asano M., Kumakura M., Mashimo T., Yuasa H., Iman K., Yamanaka H., Kawaharada U., Suzuki K., *A new biodegradable pasty-type copolymer of L-lactic acid and omega-valerolactone with relatively low-molecular weight for application in drug delivery systems*, Journal of Controlled Release 10 (1989) 293-303
- Gabriel Mbalaviele G., Dunstan C.R., Akira Sasaki A., Williams P.J., Mundy R.G., Yoneda T., **E-Cadherin Expression in Human Breast Cancer Cells Suppresses the Development of Osteolytic Bone Metastases in an Experimental Metastasis Model** CANCER RESEARCH 56 (1996) 4063-4070
- Grabb A. and Smith S. *Plastic surgery*, (1991) 4th ed. Smith JW, Aston SJ Boston: Little, Brown and Company
- Gunatillake P. A., Adhikari R., *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, European Cells and Materials* (2003) 5 1-16
- Han H.D. , Lee A. , Hwang T. , Song C.K. , Seong H. , Hyun J. , Shin B.C. , *Enhanced circulation time and antitumor activity of doxorubicin by comblike polymer-incorporated liposomes*, Journal of Controlled Release 120 (2007) 161-168

- Hanessian S. , Grzyb J.A. , Cengelli F. , Juillerat-Jeanneret L., *Synthesis of chemically functionalized superparamagnetic nanoparticles as delivery vectors for chemotherapeutic drugs* , Bioorganic & Medicinal Chemistry 16 (2008) 2921–2931
- Hao L. , Gong X. , Xuan S. , Zhang H. , Gong X. , Jiang W. , Chen Z. , *Controllable fabrication and characterization of biocompatible core-shell particles and hollow capsules as drug carrier* , Applied Surface Science 252 (2006) 8724 –8733
- Jounson, G.K., H. E. Florow, P. A. G. O'Henne, *Thermodynamic studies of zeolites: analcime and dehydrated analcimer*, American Mineralogist, 67 (1982), 736-748,
- Kawamoto N., Mori H., Terano M., Yui N., *Blood compatibility of polypropylene surfaces in relation to the crystalline-amorphous microstructure*, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 7 (199) 859-77
- Lanciani R. , *Doxorubicin-Eluting beads used for chemoembolization*, 32nd Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology; Abstract 125 (2007)
- Larlus O. , Mintova S. , Wilson S. T. , Willis R. R. , Abrevaya H. , Bein T., *A powerful structure-directing agent for the synthesis of nanosized Al- and high-silica zeolite BETA in alkaline medium*, Microporous and Mesoporous Materials 142 (2011) 17-25
- Maver U. , Bele M. , Makovec D. , Campelj S. , Jamkin J. , Gaberscek M. , *Incorporation and release of drug into/from superparamagnetic iron oxide nanoparticles* , Journal of Magnetism and Magnetic Materials 321 (2009) 3187–3192
- McNeely W., Goa KL., *5-Methoxypsoralen. A review of its effects in psoriasis and vitiligo*, Drugs. 56 (1998) 667-690
- Mies M.J.M., Rebrov E.V., Jansen J.C., De Croon M.H.J.M., Schouten J.C.,*Hydrothermal synthesis of a continuous zeolite Beta layer by optimization of time, temperature and heating rate of the precursor mixture*, Microporous and Mesoporous Materials, 106 (2007), 95-106,
- Munnier E. , Cohen-Jonathan S. , Linassier C. , Douziech-Eyrolles L. , Marchais H. , Soucé M. , Hervé K. , Dubois P. , Chourpa I., *Novel method of*

- doxorubicin–SPION reversible association for magnetic drug targeting*, International Journal of Pharmaceutics 363 (2008) 170–176
- Neubert A. , Sternberg K. , Nagel S. , Harder C. , Schmitz K-P. , Kroemer H. K., Weitschies W. , *Development of a vessel-simulated flow-through cell method for the in vitro evaluation of release and distribution from drug eluting stents* , Journal of Controlled Release 130 (2008) 2-8
 - Nori A., Yim E. K. F., Chen S., Leong K. W., “*Cell-Substrate Interactions*” *Principles of Regenerative Medicine* Cap. 38 (2008) 666-685
 - Panno M.L., Giordano F., *Effects of psoralens as anti-tumoral agents in breast cancer cells*, World J Clin Oncology 5 (2014) 348-58
 - Panno M.L., Giordano F., Mastroianni F, Palma M.G., Bartella V, Carpino A, Aquila S, Andò S., *Breast cancer cell survival signal is affected by bergapten combined with an ultraviolet irradiation*, FEBS Letter 584 (2010) 2321-6
 - Petushkov A. , Ndiege N. , Salem A. K. , Larsen S. C. , *Toxicity of silica nanomaterials: zeolites, mesoporous silica and amorphous silica nanoparticles*, in Advances in Molecular Toxicology vol 4 cap. 7, Elsevier B. V. 2010
 - Prokopowicz M. , Lukasiak J., *Synthesis and in vitro characterization of freeze-dried doxorubicin-loaded silica/PEG composite*, Journal of Non-Crystalline Solids 356 (2010) 1711–1720
 - Prokopowicz M., *Correlation between physicochemical properties of doxorubicin-loaded silica/polydimethylsiloxane xerogel and in vitro release of drug*, Acta Biomaterialia 5 (2009) 193–207
 - Rocha M.S., Viana N.B., Mesquita O.N., *DNA-psoralen interaction: a single molecule experiment*, J Chem Phys, 121(2004) 9679-9683
 - Rummelhart J M, Mellonig J T, Gray J L, Towle H J., *A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects*, Journal of Periodontology 60 (1989) 655-663
 - Salernitano E., Migliaresi C., *Composite materials for biomedical applications: a review*, Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics 1 (2003) 3-18
 - Sivak W. N. , Zhang J. , Petoud S. , Beckman E. J. , *Simultaneous drug release at different rates from biodegradable polyurethane foams* , Acta Biomaterialia 5 (2009) 2398-2408

- Sniadecki N. J., Desai R. A., Ruiz S. A., Chen C. S., *Nanotechnology for cell-substrate interactions*, (2006) University of Pennsylvania Scholarly Commons 1-1-2006
- Spielmann HP, Dwyer TJ, Sastry SS, Hearst JE and Wemmer DE., *DNA structural reorganization upon conversion of a psoralen furan-side monoadduct to an interstrand crosslink: implications for DNA repair*, Proc Natl Acad Sci, 92 (1995) 2345-2349
- Tavolaro A., Drioli E., *Zeolite membranes*, Advanced Materials, 12 (1999), 975-996,
- Tavolaro A., P. Tavolaro and E. Drioli, Zeolite inorganic supports for BSA immobilization: comparative study of several zeolite crystals and composite membranes, Colloid Surface B, 2007, 55, pp. 67-76 I.F. 2.780 – Med. I.F. 2.246
- Tavolaro A., Riccio I.I., Tavolaro P., *Hydrothermal synthesis of zeolite composite membranes and crystals as potential vectors for drug-delivering biomaterials*, Microporous and Mesoporous Materials 167 (2013) 62-70
- Tavolaro A., Tavolaro P., *Zeolitic inorganic supports for the cytochrome c immobilization: comparative study of several zeolite membranes*, Desalination, 200 (2006), 516–517,
- Tavolaro and A. Tavolaro, *Zeolitic inorganic support for the cytochrome C immobilization: comparative study of several zeolite membranes*, Desalination, 200 (2006) 516-517 I.F. 1.851 – Med. I.F. 0.938
- Tavolaro and P. Tavolaro, “The preparation of transition metal-containing mordenite catalytic tubular composite membranes”, Catal Commun, 10 (5), 2009, pp. 586-59 I.F. 2.827 – Med. I.F. 2.130
- Tavolaro and P. Tavolaro, Sintesi di Membrane Zeolitiche Composite: Nanomateriali per l’adsorbimento di proteine, La Chimica & L’industria, 2007, 4, 140- 145, 2007
- Tavolaro P and P. Tavolaro A, *LTA zeolite composite membrane preparation, characterization and application in a Zeolitic Membrane Reactor*, Catal Commun, 8 (2007) 789-794 I.F. 2.827 – Med. I.F. 2.130
- Tavolaro, A. Tavolaro and G. Martino, “Influence of zeolite PZC and pH on the immobilization of cytochrome c: a preliminary study regarding the preparation

of new biomaterials”, Colloid Surface B, 2009, 70 (1), pp. 98-107 I.F. 2.780 – Med. I.F. 2.246

- Tavolaro, I. Riccio, P. Tavolaro, *Hydrothermal synthesis of zeolite composite membranes and crystals as potential vectors for drug-delivering biomaterials" Microporous and Mesoporous Materials"*, 2013, 167 (2), pp. 62-70
- Tavolaro A., Tavolaro P., E. Drioli, *Influence of synthesis parameters on vanadium-silicalite-1 crystal growth prepared with fluoride-containing media* , J Cryst Growth 289 (2006) 609-616 I.F. 1.746 – Med. I.F. 1.653
- Tosheva L., Valtchev V.P., *Nanozeolites: Synthesis, Crystallization Mechanism, and Applications*, Chem. Mater., 17 (2005), 2494-2513,
- Vaccari L. , Canton D. , Zaffaroni N. , Villa R. , Tormen M. , di Fabrizio E. , *Porous silica s drug carrier for controlled delivery of doxorubicin anticancer agent* , Microelectronic Engineering 83 (2006) 1598-1601

Articoli su riviste internazionali:

- Tavolaro A., Riccio I.I., **Tavolaro P.** “Hydrothermal synthesis of zeolite composite membranes and crystals as potential vectors for drug-delivering biomaterials” *Microporous and Mesoporous Materials*, 167, 62-70, 2013
- D. Coello Fiallos, C. Vacacela Gómez, G. Tubón Usca, D. Cid Pérez, **P. Tavolaro**, G. Martino, L. S. Caputi and A.Tavolaro, “Removal of Acridine Orange from Water by Graphene Oxide”, 2014, submitted
- **P. Tavolaro**, A. Tavolaro e G. Martino, “Zeolite membrane as new biomaterials for cellular adhesion, growth and cultures and process for preparation thereof”, submitted
- G. Tubón Usca, C. Vacacela Gómez, D. Coello Fiallos, **P. Tavolaro**, G. Martino, L. S. Caputi and A.Tavolaro, “Preparation of Graphene Oxide as biomaterials for drug adsorption”, 2014, submitted.
- A.Tavolaro, **P. Tavolaro** “Adsorption of doxorubicina on zeolite crystals” submitted
- A. Tavolaro, I.I. Riccio and **P. Tavolaro**, Synthesis and Characterization of Silicalite-2, 2012, submitted

Brevetti:

- **P. Tavoraro**, A. Tavoraro e G. Martino, Zeolite membrane for cellular adhesion, growth and cultures and process for preparation thereof. PCT European Patent/2011/051915 presentation 09.02.2011
- A. Tavoraro e **P. Tavoraro** Membrana zeolitica microporosa a cristallo singolo e metodo di preparazione, CNR, in corso di presentazione 2014

Partecipazione a Congressi Internazionali:

- A. Tavoraro, I.I. Riccio and **P. Tavoraro**, Hydrothermal synthesis of Zeolite Composite Membranes and Crystals as potential vectors for drug-delivering biomaterials, NANOTECHITALY, VENICE, NOVEMBER 21-23, 2012
- A. Tavoraro, I.I. Riccio and **P. Tavoraro** Hydrothermal synthesis of Zeolite Composite Membranes and Crystals as potential vectors for drug-delivering biomaterials, ITM Seminar Days, University Club and Aula Magna Building of UNICAL, University of Calabria, Rende (CS), September 11 and 12, 2012 (oral presentation)
- **P. Tavoraro** , G. Martino and A. Tavoraro , Preparation of zeolite membranes for cellular adhesion, growth and cultures, NANOTECHITALY, VENICE, NOVEMBER 21-23, 2012
- S. Scinico, P. Tavoraro and A. Tavoraro, Very fast hydrothermal synthesis of mesoporous MEL-type crystals, AIZ Day 2014, Rende, September 6, 2014 (oral presentation)
- D. Coello, C. Vacacela, G. Tubon, **P. Tavoraro**, G. Martino, L. Caputi and A. Tavoraro , Environmental application of graphite oxide in acridine orange adsorption for water remediation, 11th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN14), 8-11 July 2014, Thessaloniki, Greece
- G. Tubon, C. Vacacela, D. Coello, **P. Tavoraro**, G. Martino, L. Caputi and A. Tavoraro , Graphite oxide materials preparation for drug adsorption, 11th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN14), 8-11 July 2014, Thessaloniki, Greece (oral presentation)

