



Fondo Sociale Europeo - FSE
Programma Operativo Nazionale 2000/06
"Ricerca, Sviluppo tecnologico ed Alta Formazione
nelle regioni dell'Obiettivo 1" - Misura 1.1 (F.S.E)



Università della Calabria

Dottorato di Ricerca in Ingegneria Chimica e dei Materiali

Tesi

Biomateriali a base di silice per applicazioni innovative
Settore Scientifico Disciplinare ING-IND/22 – Scienza e Tecnologia dei Materiali

Supervisore

Ch. mo Prof. Rosario AIELLO

Candidato

Ida CARINO

Ciclo XX

Il Coordinatore del Corso di Dottorato

Ch.mo Prof. Rosario AIELLO

A.A. 2006-2007

La scienza senza coscienza è solo la rovina dell'anima!

Rabelais

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	5
2	DRUG DELIVERY SYSTEM	11
2.1	Liposomi, micelle e polimeri organici	12
3	BIOMATERIALI A BASE DI SILICE E DDS.....	14
3.1	Xerogeli di silice.	14
3.2	Molecular Imprinting e sistemi "self-assembled"	16
3.2.1	...in microemulsione	17
3.3	I materiali mesoporosi	19
3.3.1	Materiali mesoporosi ibridi...	28
3.3.2	...miglioramento delle interazioni host-guest nei DDS	31
3.3.3	...e stabilità in ambienti acquosi	32
4	CINETICA DI DRUG RELEASE DA MATRICI A BASE DI SILICE	35
5	BIOCOMPATIBILITÀ DEI MATERIALI A BASE DI SILICE	38
5.1	Biocompatibilità dei materiali mesoporosi	39
6	CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE, CHIMICO-FISICA E BIOLOGICA	41
6.1	Caratterizzazione strutturale e chimico-fisica su polveri	41
6.1.1	Analisi diffrattometrica dei raggi X	41
6.1.2	Analisi calorimetrica differenziale (DSC)	43
6.1.3	Analisi termogravimetrica (TGA)	43
6.1.4	Analisi porosimetrica per adsorbimento/desorbimento di azoto	45
6.2	Modelli utilizzati per le precedenti caratterizzazioni	47
6.2.1	Valutazione dell'area superficiale	47
6.2.2	Valutazione della dimensione dei pori e dello spessore delle pareti	49
6.3	Caratterizzazione chimico-fisica in ambienti acquosi	55
6.3.1	Bagnabilità e misure di angolo di contatto ^{175, 176}	55
6.3.2	Scanning Force Microscopy ¹⁷⁷	59
6.3.3	Light Scattering ¹⁷⁹	63

6.3.4	<i>Misura del potenziale zeta</i> ¹⁸²	64
6.3.5	<i>Test di citotossicità in vitro: MTT e LDH assays</i> ¹⁸³	65
7	ATTIVITÀ SPERIMENTALE	67
7.1	<i>Silice mesoporosa come Drug delivery System</i>	69
7.1.1	<i>Scelta del farmaco</i>	69
7.1.2	<i>Sintesi e caratterizzazione dei materiali mesoporosi MCM-41</i>	71
7.1.3	<i>Impregnazione dei materiali mesoporosi sintetizzati</i>	75
7.1.4	<i>Caratterizzazione dei campioni impregnati</i>	76
7.1.5	<i>Studi di rilascio in vitro</i>	84
7.1.6	<i>Conclusioni</i>	87
7.2	<i>Sintesi di materiali ibridi self-assembled</i>	89
7.2.1	<i>Caratterizzazione dei campioni sintetizzati</i>	91
7.2.2	<i>Studi di rilascio in vitro dai materiali “self-assembled” sintetizzati</i>	100
7.2.3	<i>Conclusioni</i>	104
7.3	<i>Sintesi di materiali mesoporosi ibridi</i>	105
7.3.1	<i>Caratterizzazione strutturale</i>	107
7.3.2	<i>Caratterizzazione in ambienti acquosi</i>	116
7.3.3	<i>Conclusioni</i>	144
8	BIBLIOGRAFIA	145

1 Introduzione

La possibilità di “modificare” la cinetica di rilascio di un agente biologicamente attivo trova utilità in diverse applicazioni biomediche, in particolare in ambito terapeutico. Un sistema a rilascio modificato in grado di cedere il proprio contenuto di agente attivo per tempi lunghi, consente di ridurre il numero di somministrazioni e quindi la tossicità sistemica migliorando la "compliance" da parte del paziente. Tra tutte le vie di somministrazione, la via orale offre sicuramente una più alta compliance e una più facile applicazione.

Sono molte le strategie studiate che consentono il rilascio di un farmaco per tempi prolungati ^{1, 2} e, attualmente, sono studiati numerosi sistemi polimerici da utilizzare nel rilascio controllato per la somministrazione orale.

Essi vengono preparati sotto forma di matrici e l'agente attivo viene in esse inglobato in forma di soluzione o dispersione. I fattori che esercitano l'azione di controllo sul rilascio del principio attivo sono rappresentati dalla velocità di penetrazione del fluido biologico nel sistema, che permette alle catene polimeriche di mutare lo stato da vetroso, imperturbabile ad uno stato solvatato (il cosiddetto “*swelling*” del reticolo polimerico); dalla velocità di diffusione del farmaco nel sistema idratato e dalle resistenze al trasporto che questo oppone.

I polimeri comunemente usati sono caratterizzati da una struttura di natura organica, e possono essere sintetici (acidi polilattici, poliglicolici), semisintetici (derivati del destrano e della cellulosa) o naturali^{3, 4, 5}. Nonostante questi sistemi offrano alcuni vantaggi, e sebbene nell'ultimo ventennio significativi progressi sono stati raggiunti utilizzando tali polimeri, il loro impatto pratico è ridotto da importanti limitazioni legate alle proprie caratteristiche chimico-fisiche, tra cui bassa stabilità chimica e termica, ridotta capacità adsorbente e porosità irregolare, in quanto il reticolo polimerico non forma strutture porose ordinate.

Inoltre, la tossicità dei frammenti, derivanti dalla decomposizione dei polimeri sintetici attraverso l'attacco biochimico dalle lipoproteine ad alta densità, non è stata ancora studiata approfonditamente ⁶.

Questo è solo un esempio dei limiti che caratterizzano gli attuali sistemi utilizzati.

Ciò rende necessaria la ricerca di nuove formulazioni che richiedono anche l'uso di nuovi materiali e di nuovi metodi di direccionamento dei farmaci.

In questo contesto si inserisce l'attività di ricerca qui presentata, ed avente come obiettivo la realizzazione di "sistemi per il rilascio modificato di farmaci" (*Drug Delivery Systems* – DDS) utilizzando matrici di natura inorganica quali ad esempio i derivati della silice. Questi risultano più stabili strutturalmente e più resistenti agli attacchi chimici (p.e. l'ambiente acido dello stomaco) rispetto ai polimeri organici ⁷.

Parte del primo anno di studio è stato rivolto allo studio bibliografico inerente due aspetti fondamentali:

- Verificare lo stato dell'arte dei DDS realizzati con materiali a base di silice. In tal modo sono stati evidenziati i potenziali vantaggi derivanti dall'impiego della silice mesoporosa nanostrutturata caratterizzata da un elevato ordine della struttura porosa con una dimensione controllabile dei pori (20-500 Å), elevata area superficiale, (circa 1000 m²/g⁻¹) possibilità di funzionalizzazione chimica e quindi di realizzazione delle più adatte interazioni host-guest e host-environment.
- Verificare lo stato dell'arte degli studi riguardante la biocompatibilità della silice. La biocompatibilità è il requisito fondamentale affinché un materiale possa essere utilizzato come sistema per il rilascio modificato di farmaci. In particolare, gli studi inerenti a questo aspetto nei riguardi dei materiali mesoporosi sono iniziati appena negli ultimi due anni e non sono ancora esaustivi ^{8, 9, 10, 11}.

L'obiettivo principale di questa indagine non è stato rivolto semplicemente alla formulazione di nuovi materiali da utilizzare come DDS, ma quello di stabilire una più proficua metodologia di ricerca capace di integrare competenze provenienti da settori scientifici diversi. Infatti, uno dei maggiori problemi che si incontra nella valutazione di nuovi materiali da utilizzare in specifiche applicazioni tecnologicamente avanzate, è costituito dalla difficoltà di prevederne le proprietà in vista della loro applicazione pratica. Pertanto, lo sviluppo della ricerca proposta, rivolta alla realizzazione di un drug delivery system con materiali già studiati per l'utilizzo in altri settori tecnologici, ma poco investigati in altri ambiti applicativi, richiede l'intervento di competenze multidisciplinari. Ciò richiede l'integrazione di conoscenze diverse che includono la sintesi e caratterizzazione chimico-fisica dei materiali, una valutazione teorica e

sperimentale sia delle loro interazioni con il principio attivo di cui modificare la cinetica di rilascio, sia delle loro interazioni in vitro ed in vivo con i sistemi biologici. Di norma, una ricerca così sviluppata richiede un tempo valutabile tra i 10 ed i 15 anni¹².

Per il raggiungimento dell'obiettivo precedentemente esposto si è scelto di unire le conoscenze e le competenze tipiche della scienza dei materiali, essenzialmente per la preparazione e la caratterizzazione dei materiali, con quelle tecnico farmaceutiche specifiche per la valutazione dell'applicazione da investigare.

L'attività sperimentale è stata così sviluppata:

- *SINTESI DEI MATERIALI CANDIDATI*: sono stati utilizzati tre approcci sintetici differenti.
 - *Sintesi di materiali mesoporosi a base di silice di tipo MCM-41*, con diverse caratteristiche chimico-fisiche e strutturali. Parametri come il diametro dei pori, la geometria strutturale e le proprietà superficiali sono stati studiati al fine di individuare quelli più importanti nella progettazione di un drug delivery system
 - *Sintesi di materiali a base di silice in self assembling* in presenza della molecola “**guest**”, cioè della molecola della quale si vuole controllare la cinetica di rilascio, e di opportuni agenti funzionalizzanti. Sono state combinate la tecnica dell'imprinting molecolare (tecnica nella quale la molecola stampo per generare i “siti di riconoscimento” e la molecola della quale si vuole controllare la cinetica di assorbimento sono diverse) con le tecniche di sintesi sol-gel in emulsioni acqua/olio -W/O- (al fine di controllare le dimensioni delle particelle ottenute). La dissoluzione del farmaco e le interazioni instaurate con i gruppi funzionali utilizzati sono stati i principali parametri investigati.
 - *Sintesi di materiali mesoporosi ibridi tipo MCM-41*: l'introduzione di opportune funzioni organiche utilizzando la tecnica di co-condensazione, consente di controllare le proprietà di superficie dei materiali a base di silice, che permettono nel caso specifico del drug delivery sia di migliorare le interazioni host-guest che di stabilizzare la matrice negli ambienti acquosi.
- *SCELTA DEI FARMACI*: numerosi sono i farmaci che necessiterebbero di

una formulazione a rilascio modificato per migliorarne la loro attività terapeutica: farmaci a bassa emivita plasmatica, farmaci non solubili in ambienti acquosi, farmaci con ripetute somministrazioni giornaliere e farmaci tossici utilizzati in particolari terapie. Il nostro interesse è stato rivolto verso alcuni farmaci antitumorali.

- *LOADING DEL FARMACO*: differenti solventi in cui solubilizzare il farmaco, differenti tempi di impregnazione e ripetuti cicli di impregnazione sono stati i parametri utilizzati nella procedura di loading, il quale si è rivelato essere un parametro chiave per la realizzazione di un efficace drug delivery system.
- *CARATTERIZZAZIONE DELLE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE E STRUTTURALI DEI MATERIALI PRIMA E DOPO IL PROCESSO DI LOADING CON IL FARMACO*:
 - *tecniche di diffrazione a raggi X* al fine di caratterizzare la mesostruttura ottenuta ed il relativo ordine e verificare lo stato fisico del farmaco impregnato;
 - *tecniche di adsorbimento/desorbimento di azoto*: tali misure sono state effettuate allo scopo di ottenere informazioni riguardanti la superficie specifica e la struttura porosa dei materiali sintetizzati ed in particolare valutare come queste proprietà variano in funzione dell'interazione con il farmaco;
 - *tecniche di analisi termiche (DSC, TGA) e spettrofotometriche (FTIR)* con l'obiettivo di determinare quantitativamente le specie organiche presenti nei campioni quali il tensioattivo, i gruppi funzionali ed i farmaci impregnati;
 - *tecniche spettrofotometriche (UV-VIS) e tecniche cromatografiche (HPLC)* al fine di valutare le quantità di farmaco assorbito e successivamente controllarne la cinetica di rilascio dai sistemi investigati.
- *STUDIO DELLE INTERAZIONI HOST-GUEST*: sono state analizzate le cinetiche di assorbimento per valutare l'efficacia del loading ed il tipo di interazioni farmaco-matrice instaurate; l' influenza del diametro dei pori, le modalità di impregnazione, e le interazioni con gruppi funzionali organici appropriati, sono stati individuati essere dei parametri importanti nell'influenzare sia l'efficacia di assorbimento sia la cinetica di rilascio.

- *STUDIO DELLE CINETICHE DI RILASCIO*: le cinetiche di rilascio dei farmaci utilizzati sono state analizzate in ambienti fisiologici simulanti i fluidi gastrici ed intestinali. I risultati ottenuti hanno dimostrato che:
 - il diametro del poro è un parametro fondamentale per ottenere un controllo sulla cinetica di rilascio del farmaco studiato, solo quando il diametro del poro e la dimensione molecolare del farmaco sono il più simile possibile; infatti un controllo sulla cinetica di rilascio è stato ottenuto per il farmaco metotressato ¹³, mentre non è stato possibile ottenerlo nei confronti del 5-fluorouracile. Ciò è probabilmente dovuto alle minori dimensioni della molecola di farmaco rispetto a quelle dei pori dei materiali sintetizzati. Tale risultato ha suggerito l'utilizzo di altri approcci per la risoluzione del problema;
 - la cinetica di rilascio del 5-fluorouracile è stata infatti meglio controllata e sensibilmente migliorata utilizzando due differenti approcci sintetici:
 - coating dei materiali mesoporosi utilizzando polimeri organici *swellable*, come i derivati dell'acido metacrilico. In questo caso, la silice costituisce un reservoir per il farmaco, ed il network polimerico controlla la cinetica di rilascio. Solo un piccolo effetto di iniziale "first burst" è stato rilevato dal campione rivestito, in confronto alla silice non rivestita, probabilmente dovuto alla presenza di farmaco cristallizzato, non legato e depositato sulla superficie della silice e non completamente rivestita dal polimero ^{14 a, b};
 - materiali ibridi sintetizzati attraverso il processo di "self-assembling" in presenza del farmaco stesso. Inoltre, la diversa reattività chimica dei gruppi funzionali aggiunti nella miscela di sintesi è stato un parametro determinante al fine di modificare le cinetiche di rilascio del farmaco.
- *CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA IN AMBIENTI ACQUOSI E VALUTAZIONE DELLA LORO BIOCAMPATIBILITÀ*: con l'obiettivo di ottenere una completa valutazione delle matrici in esame quali potenziali biomateriali, sono state effettuate una serie di caratterizzazioni in ambienti acquosi. L'indagine è stata sviluppata nel Dipartimento di Biofarmaceutica e Tecnologie Farmaceutiche dell'Università del Saarland. I requisiti legali, morali ed

etici ai quali devono rispondere tutti i biomateriali impongono infatti di comprendere il loro comportamento in ambienti biologici. Ciò permette fra l'altro, di ottenere preziose informazioni sulle loro proprietà in tali ambienti. Il protocollo di caratterizzazione in ambienti biologici, formulato dallo U.S. National Institute Health ed utilizzato in tale contesto, prevede:

- *la caratterizzazione chimico-fisica in ambienti acquosi, valutando:*
 - *parametri morfologici : (carica, bagnabilità, forma e dimensione)*
 - *distribuzione della dimensione delle particelle,*
 - *la stabilità*
- *valutazione della compatibilità biologica (biocompatibilità) attraverso test di citotossicità in vitro:*

tale valutazione ha permesso di riportare, per la prima volta, valori di citotossicità relativi ad alcuni tipi di materiali mesoporosi.

2 *Drug Delivery System*

L'uomo ha sviluppato fin dall'antichità diverse strategie di “drug delivery” (*rilascio di farmaco*), quali la masticazione di radici e foglie e l'inalazione di particelle di vapore provenienti dalla combustione di piante medicinali. Nel corso dei secoli, i meccanismi di rilascio sono stati migliorati attraverso lo sviluppo di forme di dosaggio più attendibili e sicure, come le compresse e le capsule ¹⁵. A partire dal 1980 è stato rivolto, uno sforzo notevole alla progettazione di nuovi sistemi a rilascio modificato, come “patches” transdermici, formulazioni orali ed inalatorie, ed impianti erodibili.

Negli ultimi anni, in particolare, la comparsa di nuovi farmaci di taglia molecolare maggiore, e l'aumento della sensibilità della dose terapeutica stanno rendendo sempre più pressante la richiesta di incapsulazioni efficienti e di sistemi a rilascio controllato versatili ed ad alta prestazione. Allo scopo di migliorare l'efficacia clinica e la *compliance* del paziente non possono essere dimenticate considerazioni di tipo “economico”, legate sia alla frequenza di somministrazione che al costo dei farmaci. Inoltre con l'entrata sul mercato di nuovi farmaci, si è verificata l'inaspettata tossicità verso organi chiave (cuore, fegato, reni) risultante da una comprensione non totale dei meccanismi d'azione che ha portato spesso ad effetti collaterali significativi e talvolta letali ¹⁴. Questo spiega l'interesse delle industrie farmaceutiche verso l'utilizzo dei vecchi farmaci (molto ben conosciuti) con l'obiettivo di migliorarne le proprietà farmacocinetiche.

Tutto ciò fa del “drug delivery” una delle fette del mercato farmaceutico che negli ultimi anni ha registrato la crescita più rapida, con un aumento annuale pari a circa il 10% e con un valore stimato nel 2007 di 82000 milioni di dollari statunitensi solo per il mercato interno ¹⁵

Il rilascio controllato di farmaci implica l'abilità a controllare la distribuzione di agenti terapeutici sia nello spazio che nel tempo. In altre parole, l'efficacia di un DDS consiste nella sua capacità di controllare sia la velocità di rilascio di un farmaco che la sua distribuzione ad uno specifico organo o luogo nell'organismo (*targeting*). Queste proprietà consentono ai sistemi a rilascio controllato di migliorare soprattutto l'efficacia terapeutica dei farmaci, per effetto del mantenimento della concentrazione del principio attivo nell'organismo, all'interno dell'intervallo terapeutico ottimale e sotto la

soglia di tossicità.

2.1 Liposomi, micelle e polimeri organici

Al fine di rispondere a varie e diverse esigenze, fino ad oggi sono stati progettati molteplici sistemi di rilascio particellari^{18,19,20}, basati sull'utilizzo di liposomi, micelle, e polimeri organici. Sebbene ciascuno di tali sistemi abbia i suoi vantaggi, molte significative limitazioni ne influenzano l'applicabilità come "drug delivery system". Per esempio i liposomi^{21,22,23} e le micelle soffrono di un'intrinseca, scarsa stabilità chimica. È anche risaputo che i liposomi e le micelle nel sangue sono suscettibili a disintegrazione attraverso attacco biochimico dalle lipoproteine ad alta densità²⁴. Per quanto riguarda i polimeri organici, la degradazione *in vivo* di polimeri sintetici pone problemi a causa dei frammenti che si generano⁶, mentre a riguardo dei polimeri naturali, come l'agar e il chitosano, la mancanza di controllo sulla purezza del monomero porta a una potenziale insufficienza di riproducibilità nei loro profili di rilascio. I dendrimeri invece sono caratterizzati da una bassa stabilità nel sangue e da una rapida eliminazione attraverso i reni ed il fegato, ed inoltre le loro piccole dimensioni (<10 nm) consentono di attraversare i piccoli interstizi intracellulari e distribuirsi in maniera non specifica nei tessuti sani²⁵.

La bassa stabilità nel sangue rappresenta più in generale il maggior problema di tutti i sistemi di rilascio realizzati con polimeri organici: nel sangue sono infatti presenti delle proteine "markers" (opsonine) che assorbendosi sulla superficie di un qualsiasi sistema di rilascio, forniscono un primo segnale al sistema immunitario (ad esempio il *Sistema Reticolo Endoplasmatico-RES*) per eliminare entità considerate "estrane" dall'organismo.

Ecco perché, al fine di aumentare il tempo di permanenza nel circolo ematico, la superficie dei "delivery systems" necessita di essere funzionalizzata con molecole idrofiliche, come il PoliEtilenGlicole²⁶ o il PoliEtilenOssido che sfuggono al sistema immunitario²⁷. L'idrostabilità nel torrente sanguigno è permessa anche dal mantenimento delle dimensioni delle particelle tra 50 e 300 nm^{28,29,30}.

Si comprende bene come il processo addizionale di funzionalizzazione

complica il processo di produzione: nel caso delle micelle polimeriche^{31, 32, 33, 34, 35}. Esso richiede una totale riformulazione della chimica di preparazione, e per quanto riguarda i liposomi²⁶ il processo può comportare un forte incremento del tempo di produzione.

Al contrario dei sistemi organici, i polimeri a base di silice hanno la superficie caratterizzata dalla presenza di gruppi idrossilici che li rendono intrinsecamente idrofilici. Tale naturale idrofilicità può consentire di aggirare il meccanismo di eliminazione da parte del RES, così da incrementare il tempo di permanenza nel circolo ematico.

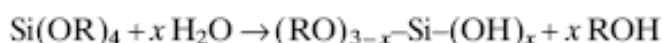
Questo aspetto ha spinto la comunità scientifica ad occuparsi del possibile impiego dei polimeri inorganici ed propriamente idrofilici, come ad esempio i polimeri a base di silice, come materiali per la realizzazione di DDS.

3 Biomateriali a base di silice e DDS

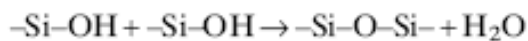
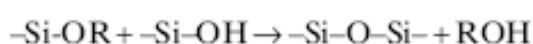
3.1 Xerogeli di silice.

Gli xerogeli a base di silice e ottenuti mediante la tecnica sol-gel ³⁶ sono polimeri inorganici che sono stati suggeriti a partire dai primi anni 80 come matrici per il rilascio modificato di farmaci, peptidi e proteine ^{37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49}. Il processo sol-gel può essere descritto come una policondensazione inorganica, in due step, di precursori alcossidici del silano:

1) step di idrolisi:



2) step di condensazione:



Le reazioni vengono fatte avvenire in condizioni blande e compatibili con la maggior parte dei principi attivi che possono essere incorporati nella matrice silicea sia per assorbimento sulla superficie “temperatura-attivata” ^{35, 50, 51}, sia per addizione durante il processo di sintesi ^{39, 40, 42, 52, 53}.

Questi ultimi vengono uniti ai precursori in fase di polimerizzazione e rimangono così intrappolati nelle maglie porose della matrice polimerica la quale, a seconda delle condizioni adottate, può essere ottenuta in forma di film sottile, di monolita tridimensionale o di microsferi.

L’incorporazione di farmaci in derivati di sol-gel di silice è stata introdotta per la prima volta da Unger ⁵³. Unger ha rilevato che la velocità di rilascio dalle matrici silicee, dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche delle molecole di farmaco, ed in particolare dalla loro natura acida o basica, che ben si accorda con le proprietà ioniche della struttura del derivato siliceo. Infatti, molecole di farmaco con gruppi funzionali reattivi,

gruppi alcolici e fenolici possono essere chimicamente legati alla superficie silicica per mezzo di legami del tipo =Si-O-C=⁵² o legami idrogeno^{25, 48,}. La quantità di gruppi idrossilici e gruppi carbonilici nelle molecole di farmaco influenza sia la capacità di assorbimento, che la velocità di rilascio. Legami ad idrogeno forti sono formati sia con basi deboli d'azoto, come la piridina, che con atomi d'ossigeno di eteri o gruppi chetonici⁵³. Legami ad idrogeno sono formati a valori di pH tra 1.5 e 3.0.

Le molecole di farmaco che contengono gruppi cationici si combinano con la silice a tutti i valori di pH, ed i legami coinvolti possono essere sia ionici che ad idrogeno. Comunque a valori di pH al di sotto di tre/quattro le interazioni coinvolgono solo legami ad idrogeno. Inoltre mezzi altamente idrofobici influenzano l'assorbimento sulla superficie⁵³. In alcuni casi, farmaci idrofobici come il cortisone, potrebbero essere intrappolati permanentemente nel gel di silice^{50, 51, 56}: essi rimangono probabilmente incastrati nel volume intraparticellare. L'elevata porosità del sistema polimerico garantisce oltre alla lenta diffusione della sostanza incorporata, anche una lenta erodibilità della matrice in condizioni fisiologiche. È stato infatti recentemente dimostrato che gli xerogeli così ottenuti possiedono una buona biocompatibilità e vengono lentamente riassorbiti in seguito ad impianto nell'organismo⁴⁹.

Nonostante i sopracitati intrinseci vantaggi, i materiali a base di silice rimangono un'inutilizzata risorsa per la produzione di drug delivery systems. Questo è stato fortemente dovuto alle alte temperature di processo impiegate nei tradizionali metodi di sintesi, che erano chiaramente incompatibili con l'incorporazione di molecole organiche, ed alla relativa difficoltà a manipolare la microstruttura interna; insieme alla porosità altamente eterogenea, questi fattori hanno giocato un ruolo importante nella loro "apparente" mancanza di popolarità come matrici utilizzabili per il rilascio modificato di farmaci.

Comunque gli "apparenti limiti" possono essere facilmente superati:

- usando tecnologie sol-gel a temperatura ambiente
- adeguando la struttura porosa

In questo contesto, molto promettenti si sono rivelati due approcci:

- la "nostra proposta" di combinare la metodologia dell' *imprinting molecolare* con la tecnica sol-gel per la produzione di sistemi self-assembled in microemulsione, in un solo step, in presenza del farmaco e non di una

precedente molecola stampo;

- l'utilizzo della silice mesoporosa nanostrutturata, che oramai possiede differenti protocolli di sintesi a temperatura ambiente e, molto più importante, possiede peculiari caratteristiche di porosità ordinata ed omogenea ed elevata capacità di assorbimento

3.2 *Molecular Imprinting e sistemi "self-assembled"...*

I sistemi prodotti attraverso tecnologia di "*Molecular Imprinting*" e attraverso utilizzo di agenti direzionanti la struttura, coprono un largo range di materiali aventi applicazioni in diversi campi dalla catalisi, alla separazione, e più in generale nel settore dei sistemi *host-guest* (o chimica di inclusione).

La produzione di materiali porosi richiede la presenza di un agente direzionante che viene incapsulato durante la sintesi delle matrici.

Successivamente, al fine di rendere il sistema poroso accessibile, c'è bisogno di rimuovere il template tramite un processo di estrazione o calcinazione.

L'ulteriore interesse nella produzione di materiali porosi riguarda anche la generazione di drug delivery systems. Nonostante i materiali più comuni sono idrogeli o polimeri organici, un approccio alternativo è stato offerto, come illustreremo ampiamente nei paragrafi successivi, dai materiali inorganici come i materiali mesoporosi a base di silice nei quali il farmaco può essere incastrato e alluminosilicati e argille nei quali il farmaco può essere intercalato^{36, 57}.

Nella maggior parte dei casi, la matrice porosa è generata da un agente direzionante la struttura o da una molecola stampo che differisce dal farmaco che deve essere rilasciato; quest'ultimo viene assorbito infatti dal sistema solo in un secondo step.

Un esempio alternativo è stato riportato recentemente, in cui è stato generato un sistema ibrido inorganico-organico "self-assembled", in cui i pori sono pieni del farmaco stesso che si vuole rilasciare⁵⁸.

Le matrici di silice ottenute da questi autori, sono state però sintetizzate tramite tecnica sol-gel (xerogeli). L'impiego di tale tecnica, se da una parte riesce a preservare il controllo sul rilascio, proprietà offerta dal suddetto processo sol-gel, dall'altra pone

il problema di come produrre particelle con dimensione controllabile.

Una risposta nasce dalla “compartimentalizzazione” della soluzione sol-gel in microdroplets, che agiscono come microreattori durante l’evoluzione della struttura della matrice, così da produrre particelle di silice con dimensioni comparabili a quelli dei microreattori. Attualmente tale compartimentalizzazione per soluzioni sol-gel può essere permessa tramite due approcci: spray-drying^{59, 60} e polimerizzazione in emulsione. Recenti studi su particelle di silice sintetizzate con la tecnica dello spray-drying, hanno rivelato diverse limitazioni della tecnica, come un modesto controllo sulla finale velocità di rilascio, segregazione delle particelle, e dimensione delle particelle limitate al range micrometrico⁶¹. Infine, la richiesta intrinseca di temperature relativamente alte durante lo step di drying, preclude l’applicazione di questo metodo all’incapsulazione di molecole biologiche sensibili alla temperatura.

3.2.1 ...in microemulsione

Per superare quindi le limitazioni della tecnica spray-drying, un semplice metodo per la produzione di micro-nanoparticelle può essere la combinazione della tecnologia sol-gel, per ottenere così uno stretto controllo sulle cinetiche di rilascio, con una emulsione acqua/olio (W/O), per produrre così particelle con dimensione controllabile⁶². La miscela di una soluzione di tensioattivo in un solvente organico (sol. A) con una soluzione acquosa sol-gel consistente di una miscela di precursori di silice, alcool, acqua (sol. B), porta alla formazione di una microemulsione. La immiscibilità tra le due fasi porta alla compartimentalizzazione della soluzione sol-gel dentro discrete goccioline polari, stabilizzate dal tensioattivo (fig. 1).

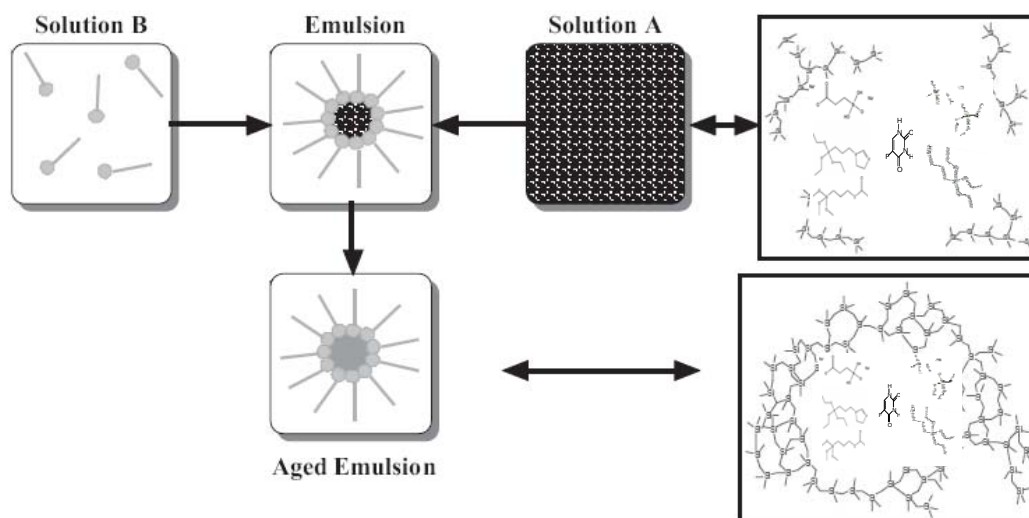


Figura 1. Rappresentazione schematica della combinazione sol-gel/emulsione

Nel tempo, l'idrolisi e la condensazione portano alla gelazione del pools acquoso e alla formazione di particelle porose con la molecola attiva (il farmaco nel nostro caso) omogeneamente distribuita. In altre parole, le goccioline della soluzione sol-gel possono essere viste come micro- nanoreattori in cui vengono condotti una normale transizione sol-gel. Inoltre la dimensione del reattore impone la dimensione delle particelle, mentre la nanostruttura delle microsfele risultanti è interamente controllata dalla chimica della soluzione sol-gel.

L'esteso range dei parametri di sintesi del sol-gel, che includono rapporto acqua/alcolossido, introduzione di alcossisilani, catalisi acida o basica, tempo e temperatura di drying, può essere usato per modificare le cinetiche di rilascio delle particelle^{63, 64}.

Noi presenteremo qui i nostri preliminari studi sperimentali ottenuti, mediante l'approccio di generare un sistema ibrido in presenza del farmaco, ed introducendo la variante della sintesi in una microemulsione per superare i sopracitati limiti.

Lo scopo della nostra indagine è stata quella di:

- investigare l'abilità del farmaco a fungere da agente direzionante, attraverso la scelta di un appropriato solvente e agente funzionalizzante
- studiare l'influenza (interazione chimica, tempo di aggiunta) dei gruppi organici

funzionalizzanti nella modalità di rilascio del farmaco

- caratterizzare le cinetiche di rilascio

3.3 I materiali mesoporosi

La più “antica” e conosciuta classe di materiali porosi è costituita dalle *zeoliti*, alluminosilicati cristallini caratterizzati da un numero molto grande di cavità, interconnesse da pori di dimensioni uniformi (inferiori a 20 Å). Per superare le limitazioni degli impieghi delle zeoliti in contesti applicativi non troppo specifici (limitazioni dovute alla dimensione “piccola” dei pori), vari studi sono stati compiuti allo scopo di sintetizzare materiali dotati della stessa struttura regolare tipica delle zeoliti, ma caratterizzati da un più ampio diametro dei pori (15-100 Å), spostandosi dalla cosiddetta regione “microporosa” a quella “mesoporosa”.

Nel 1992 i ricercatori della *Mobil Corporation* brevettarono una famiglia di nuovi silicati e alluminosilicati mesoporosi, denominata **M41S**, caratterizzata da una struttura porosa in cui i pori risultano eccezionalmente “larghi” e dal diametro uniforme^{65,66}. La peculiarità del processo di sintesi di tali materiali rispetto a quello delle zeoliti è la presenza, nella miscela di sintesi, di micelle di tensioattivo intorno alle quali viene fatta condensare la silice amorfa.

Successivamente il tensioattivo viene rimosso lasciando la struttura porosa della silice in seguito ad un trattamento di calcinazione, o di estrazione con opportune miscele di solventi.

Tali caratteristiche (la struttura regolare e la dimensione dei pori superiore a quella delle zeoliti) hanno consentito di utilizzare i mesoporosi M41S in applicazioni in cui i “tradizionali” materiali porosi non possono trovare impiego, come ad esempio in varie fasi dei processi di raffinazione e nei processi di sintesi dell'industria chimica farmaceutica, nella catalisi, e nella realizzazione di dispositivi per l'adsorbimento-separazione.

La miscela di composizione ha sempre come costituenti principali la silice ed un tensioattivo. Ciò significa che la conoscenza della chimica dei tensioattivi, e delle interazioni tensioattivo-silicato in soluzione, rappresenta lo strumento fondamentale per la comprensione dei meccanismi responsabili della formazione di tali materiali.

In una soluzione di solvente-tensioattivo, le molecole dei tensioattivi manifestano la loro tendenza a dar luogo a strutture di vario tipo (fig. 2)

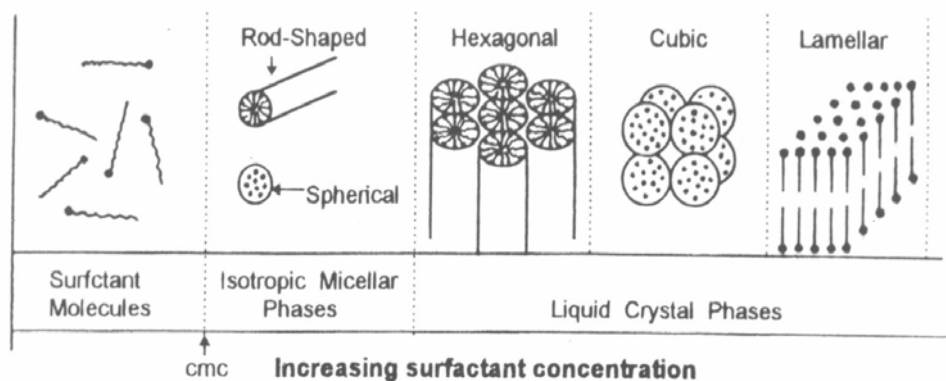


Figura 2. Sequenze di strutture in un sistema acqua-tensioattivo

A bassa concentrazione lo stato energeticamente favorito è quello monomolecolare. All'aumentare della concentrazione le molecole di tensioattivo si solvatano e si aggregano insieme per formare le micelle. La concentrazione limite in corrispondenza della quale si ha la formazione delle micelle è chiamata CMC (*concentrazione critica micellare*).

Il tipo di micella che si origina dipende dalla forza dei due gruppi idrofili ed idrofobi. Molecole con gruppi fortemente idrofili tendono a formare micelle del tipo olio in acqua (fig. 3 a), denominate anche normali; quelle con gruppi fortemente idrofobi danno luogo a micelle del tipo acqua in olio (fig. 3 b) denominate anche inverse.

Le micelle si possono presentare sotto diverse forme: dapprima assumono una geometria sferica, mentre a concentrazione più alta si trasformano in micelle cilindriche. Quindi, piuttosto che definire un'unica concentrazione critica micellare, ci si riferisce solitamente ad una CMC1 corrispondente alla formazione delle micelle sferiche, e ad una CMC2, relativa alla trasformazione delle micelle da sferiche a cilindriche

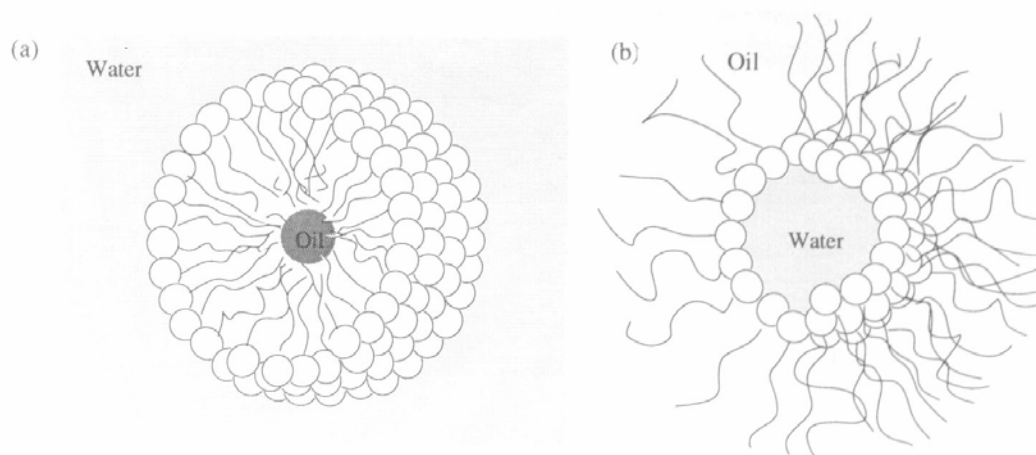


Figura 3. Micella normale (a); micella inversa (b) ⁶⁷

Concentrazioni ancora più alte di tensioattivo determinano l'auto-organizzazione delle micelle in una struttura più grande e complessa: la fase liquido-cristallina.

Un cristallo liquido è una fase in cui molecole o aggregati di molecole sono assemblati in modo che l'orientamento e la posizione relativa delle singole unità costitutive seguano un ordine che persiste su scala macroscopica. In particolare le micelle si dispongono secondo un ordine esagonale quando la concentrazione di tensioattivo è relativamente bassa, mentre a concentrazione più alta si osserva la coalescenza di cilindri adiacenti, mutuamente paralleli, a costituire la fase lamellare. In alcuni casi la fase lamellare è preceduta dalla fase cubica che è costituita da aggregati cilindrici interconnessi secondo una complessa struttura reticolare.

La particolare fase cristallina presente in soluzione dipende, oltre che dalla concentrazione di tensioattivo anche dalla sua natura chimica come la lunghezza della catena idrofoba, le caratteristiche della testa polare e il tipo di controione, nonché da parametri di sintesi come il pH e la temperatura ⁶⁸.

Si osserva una diminuzione della CMC all'aumentare della lunghezza della catena alchilica, della valenza del controione e della forza ionica in soluzione; mentre un aumento del pH e della temperatura determina un aumento della CMC.

Nel caso di sintesi di silicati, è stato osservato che la distribuzione delle strutture molecolari polidentate e policaricate delle specie inorganiche è dipendente dal pH, dalla temperatura e dalla concentrazione di cationi e di silice. Una riduzione della

concentrazione di silice o un aumento della temperatura o del pH favorisce la formazione di monomeri e piccoli oligomeri.

I materiali mesoporosi di tipo M41S sono ottenuti trattando ad una certa temperatura una soluzione acquosa, generalmente basica contenente una fonte di silice ed un tensioattivo. Pertanto lo studio del comportamento delle molecole di tensioattivo in soluzione e della natura delle strutture molecolari di silicato risulta utile nella descrizione di meccanismi che portano alla formazione di materiali mesoporosi tipo M41S. Le ricerche condotte hanno portato all'identificazione di tre differenti mesofasi (fig. 4):

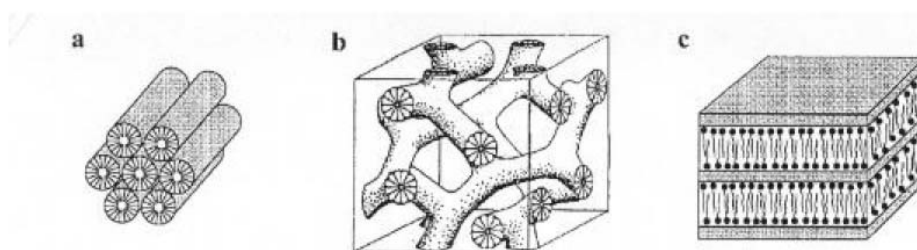


Figura 4. Differenti mesofasi dei materiali mesoporosi MCM-41 ⁶⁹

- la fase cubica, chiamata *MCM-48* ⁷⁰ Essa consiste di particelle con facce simili a cristalli e con canali interconnessi che si sviluppano lungo le tre dimensioni;
- la fase lamellare, chiamata *MCM-50*. Essa è formata da bistrati di molecole di tensioattivo con le estremità idrofile rivolte verso l'interfaccia acqua-organico e l'estremità idrofobe disposte una di fronte all'altra;
- la fase esagonale, chiamata *MCM-41*. Tra i materiali della famiglia dei materiali M41S la MCM-41 è senza dubbio quella maggiormente studiata in virtù della elevata area superficiale e capacità adsorbente; tali caratteristiche sono determinate dalla disposizione regolare delle micelle cilindriche secondo un ordine esagonale. Inoltre la fase MCM-48 risulta difficile da sintetizzare ⁷¹ mentre la fase MCM-50 presenta una struttura disordinata in seguito a calcinazione ⁷⁰

In particolare per la formazione della fase esagonale, è stato teorizzato il

meccanismo di formazione LCT ⁶⁵ (fig. 5).

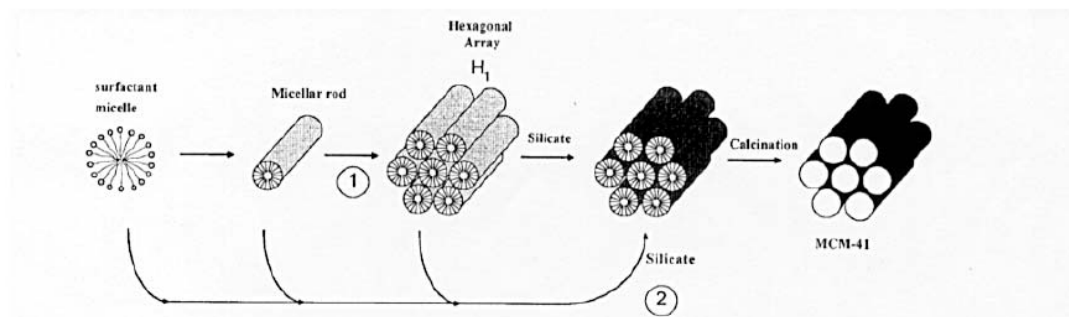


Figura 5 Meccanismo di formazione LCT

Il fattore chiave di tale meccanismo, proposto per la prima volta da Beck ⁶⁵, si basa sulla constatazione che le molecole di tensioattivo in un cristallo liquido si organizzano in modo da servire come template (stampo) per la formazione della struttura del mesoporoso MCM-41. Il primo stadio del “meccanismo” corrisponde alla formazione delle micelle cilindriche di tensioattivo; in uno stadio successivo esse si dispongono secondo un ordine esagonale ed infine si ha l’incorporazione e polimerizzazione delle specie inorganiche (silice, silice-allumina) intorno alla parte idrofila degli aggregati micellari (fig. 5). Si è riscontrato che la sintesi del materiale mesoporoso MCM-41 ha successo solo quando il tensioattivo e le condizioni di reazione permettono la formazione di un cristallo liquido esagonale ben definito. Per esempio, quando sono usati tensioattivi con catena alchilica C₆ e C₈, non si formano i materiali MCM-41, in accordo con l’elevata solubilità dei tensioattivi a catena corta e, conseguentemente, della loro bassa tendenza ad aggregarsi per minimizzare le interazioni idrofobe.

Tuttavia, considerando che la struttura del cristallo liquido è altamente sensibile alle caratteristiche globali della soluzione solvente-tensioattivo-silicato, si è proposta una variante del meccanismo LCT che prevede l’influenza delle specie di silicato nell’organizzazione della mesofase organico-inorganico ⁷². In particolare, secondo questo modello, la fase cristallina liquida non è preesistente alla formazione di MCM-41, e pertanto non è la sua presenza a guidare la sintesi del materiale mesoporoso. Si assume,

invece, che le micelle ordinate in maniera casuale interagiscano con gli anioni di silicato, così da portare alla formazione di due o tre monostrati di silice attorno alla superficie esterna delle micelle. Successivamente queste specie composite si organizzano a formare la caratteristica struttura esagonale dei materiali mesoporosi MCM-41 (fig. 6).

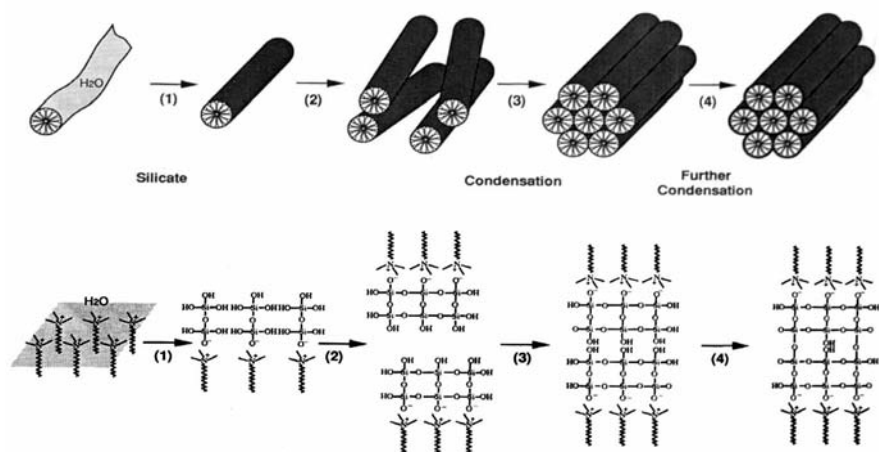


Figura 6. Meccanismo templante cooperativo ⁷²

Numerosi studi dimostrano che questo secondo meccanismo era l'unico capace di spiegare alcune importanti osservazioni sperimentali ^{73, 74, 75, 70}

Secondo tale meccanismo il processo di sintesi avviene secondo tre fasi, nel seguente ordine:

- la fase in cui gli oligomeri di silicato formano legami multidentati con i cationi di tensioattivo;
- la fase in cui avviene la polimerizzazione dei silicati; tale fase ha luogo preferibilmente all'interfaccia, sia in virtù del valore elevato di concentrazione di specie siliciche in questa regione, sia per la parziale schermatura della loro carica negativa da parte della carica positiva dei tensioattivi;
- la fase in cui si raggiunge l'uguaglianza tra le densità di carica delle molecole di tensioattivo e di silicato. Il modello, cioè, prevede che la densità di carica entro la parete di silicato, ρ_s , sia sempre compensata dalla densità di carica delle teste polari di tensioattivo, pari a $1/A$, dove A è l'area delle teste polari.

Nello stadio iniziale della sintesi, la presenza di oligomeri di silice con un'elevata carica determina piccoli valori di A , i quali si realizzano mediante una configurazione lamellare del tensioattivo. Al procedere della polimerizzazione del silicato, la densità di carica degli anioni diminuisce, cosicché A aumenta. La parete di silicato, infatti, è ancora scarsamente condensata durante lo stadio iniziale della sintesi, e ciò consente al sistema di trasformarsi dalla fase lamellare a quella esagonale, in modo che A possa assumere valori crescenti in accordo con il criterio di uguaglianza della densità di carica (fig. 7)

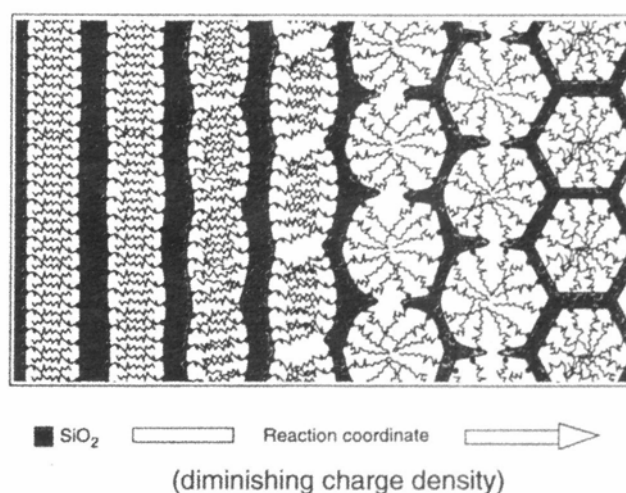


Figura 7. Rappresentazione schematica del meccanismo di trasformazione della fase lamellare a fase esagonale ⁷⁶

A partire dalla realizzazione della prima sintesi della fase MCM-41, si sono susseguiti una serie di brevetti e pubblicazioni. Tre sono le possibili procedure di sintesi attraverso le quali può essere ottenuta la fase mesoporosa MCM-41:

- I. la condensazione diretta tra un tensioattivo cationico (indicato con S^+) ed un silicato in un mezzo di reazione basico, grazie alla quale possiede carica negativa (indicato con Γ^-). Fu la prima procedura ad essere applicata e, rimane ancora oggi la più utilizzata ⁷⁷
- II. la formazione del complesso $S^+X\Gamma^-$ a pH acido attraverso la mediazione di un controione X^- ⁶⁹
- III. utilizzo di un tensioattivo neutro (S^0), avente come testa polare una ammina a

catena lunga ⁷⁵ o ossidi di polietilene ^{77, 79} ed un silicato neutro (I°).

I vari protocolli possibili di sintesi consentono di generare materiali dalle caratteristiche e dalle composizioni più svariate e applicabili in diversi contesti: dall'oramai consolidato utilizzo nella realizzazione di catalizzatori e setacci molecolari, al più nuovo impiego nella realizzazione di strutture porose che ben si adattano ad adsorbire molecole biologiche voluminose ^{80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87}

Tra le mesostrutture ordinate, le SBA-15 sono diventate molto popolari: vengono sintetizzate in condizioni acide ed usano come agente direzionante i copolimeri a blocco del poli(etilenossido)-poli(propilenossido). I materiali posseggono sempre un ordine esagonale di pori cilindrici, ma più grandi, (4-30 nm) ed interconnessi attraverso micropori; esibiscono inoltre valori di spessore della parete porosa di 3.1-6.4 nm ^{88, 89, 90, 91}.

I materiali tipo MCM-41 esibiscono “eccitanti” caratteristiche strutturali che fanno sì che essi si prestino ad un loro utilizzo come drug delivery, come l'elevata area superficiale (>1000 m²/g) e l'elevata capacità adsorbente. Inoltre:

- la disposizione ordinata, nonché stretta distribuzione dei pori ^{67, 68}, consente di superare un grosso limite sia dei polimeri organici, che dei polimeri inorganici, i quali essendo dotati di una porosità casuale, non assicurano una distribuzione omogenea delle molecole da adsorbire,
- inoltre, all'atto della sintesi dei materiali, è possibile scegliere un diametro esatto dei pori, all'interno di un elevato range, così da adattarlo volta per volta alla dimensione della specifica molecola da studiare;
- l'elevata area superficiale, insieme alla possibilità di funzionalizzare le pareti dei pori, possono essere sfruttate per instaurare efficacemente le interazioni “desiderate” verso le molecole ospitate (questo aspetto sarà trattato più dettagliatamente in un paragrafo successivo).

Le prime ricerche volte ad investigare l'attitudine dei materiali mesoporosi MCM-41 ad accogliere e successivamente rilasciare in maniera graduale molecole di interesse farmaceutico sono state condotte da Vallet *et al.* ⁹². In particolare, questa proprietà è stata studiata utilizzando come DDS campioni di materiali mesoporosi MCM-41 differenti per il diametro dei pori e come molecola ospite l'ibuprofene, noto farmaco antinfiammatorio non steroideo. La stessa quantità di ibuprofene è stata impregnata nei campioni

mesoporosi seguendo due diverse procedure. Il comportamento al rilascio di ibuprofene da parte delle matrici è risultato differente soprattutto a causa del metodo utilizzato per effettuare l'impregnazione piuttosto che per il differente diametro dei pori dei materiali mesoporosi.

Da allora molteplici studi riguardanti il possibile utilizzo dei materiali mesoporosi, sia tipo MCM-41 che tipo SBA, sono stati condotti ^{24, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99}

Risultati differenti dal primo lavoro, sono stati ottenuti per esempio dai nostri studi ¹⁰⁰. In un primo lavoro, il possibile impiego di materiali mesoporosi MCM-41 come drug delivery system è stato studiato utilizzando come farmaci da rilasciare diversi antinfiammatori (tra cui lo stesso ibuprofene). Da tali studi è risultato infatti che la dimensione dei pori influenza fortemente la dinamica di rilascio del principio attivo e che per uno dei farmaci usati, il diflunisal, ci sono ottime potenzialità come sistema di rilascio controllato. Inoltre, dal momento che solo il 20% del farmaco viene rilasciato a livello dello stomaco, questo consentirebbe la riduzione degli effetti collaterali relativi alla somministrazione orale di tali agenti, nonché il loro maggiore rilascio a livello dell'intestino. Anche i risultati di Horcajada *et al.* ¹⁰¹ hanno messo in evidenza come la dimensione dei pori di materiali MCM-41 possa essere determinante sul rilascio controllato di farmaci. Precisamente è stata studiata la sintesi di MCM-41 partendo da una miscela di due differenti tensioattivi di alchiltrimetilammonio contenenti catene alchiliche rispettivamente di otto e dieci atomi di carbonio. La matrice così ottenuta è stata impregnata con ibuprofene. Il rilascio del farmaco è stato dettagliatamente analizzato in mezzi acidi e basici oltre che confrontato con il rilascio dello stesso farmaco impregnato in matrici ottenute con tensioattivi formati da catene alchiliche aventi dodici e sedici atomi di carbonio, quindi con pori di dimensioni maggiori.

La scelta dell'ibuprofene, nella maggior parte degli studi sui DDS è giustificata dalla sua bassa solubilità in acqua, dalle sue dimensioni molecolari e dalla buona probabilità di essere ospitato nei materiali MCM-41.

Molti sono i farmaci, la cui efficacia terapeutica troverebbe beneficio dall'uso di formulazioni a rilascio modificato, come farmaci usati in speciali terapie, che esibiscono un'elevata tossicità, e che hanno bisogno di ripetute somministrazioni per ottenere la desiderata risposta farmacologica.

Per la prima volta in un nostro studio, un farmaco antineoplastico, il

metotressato, è stato utilizzato come farmaco modello ^{13 (a, b)}. È stata utilizzata silice mesoporosa del tipo MCM-41, con un differente diametro di pori, ed un diverso rapporto di Si/Al. È stato messo in evidenza come lo step del loading e la dimensione dei pori siano parametri chiave importanti nel determinare le interazioni host-guest ed influenzare le successive cinetiche di rilascio.

Alternativi i metodi proposti da Balkus e Pang ^{93, 102} che sintetizzano mesoporosi utilizzando tensioattivi inusuali come vitamina E e suoi simili ed acidi carbossilici.

3.3.1 Materiali mesoporosi ibridi...

I vantaggi tipici dei polimeri organici sono la flessibilità, la densità bassa, la durezza, e la formabilità, mentre la ceramica inorganica offre proprietà meccaniche ed ottiche eccellenti, come durezza di superficie e di modulo, resistenza, trasparenza e alto indice rifrangente. L'introduzione di funzioni organiche nel framework del silicato può aumentare la flessibilità di film e fibre e ridurre la fragilità dei monoliti.

Se questi materiali possono essere uniti efficacemente, possono essere realizzati una nuova categoria di materiali ibridi organico-inorganici altamente funzionali e dalle alte performance.

Durante l'ultimo decennio, i materiali ibridi organico-inorganici preparati dal metodo sol-gel hanno attratto moltissima attenzione nella scienza dei materiali.

Sanchez e Ribot ^{103, 104}, utilizzando una distinzione strutturale, hanno classificato i materiali ibridi in due categorie: alla I categoria corrispondono i sistemi ibridi i cui componenti sono generati da interazioni deboli, quali forze di Van der Waals, legami ad idrogeno o interazioni elettrostatiche; alla II categoria corrispondono i materiali ibridi, in cui i componenti sono legati attraverso legami chimici covalenti forti.

Materiali ibridi fatti in questo modo sono chiamati creamers (polimeri di ceramica), ormosils (silicati organicamente modificati) o ormocers (ceramica organicamente modificata). Attraverso le combinazioni di differenti componenti inorganici ed organici ed in congiunzione con metodi di appropriati trattamenti, vari tipi di legami primari e secondari possono essere sviluppati portando a materiali con una combinazione unica di proprietà che non possono essere realizzate da altri materiali.

Fin dalla loro scoperta, considerevole attenzione è stata focalizzata sull'adattamento della composizione chimica dei materiali mesoporosi ordinati tipo MCM-41^{105, 106}, non solo per aumentare il loro potenziale applicativo, ma anche per migliorarne la stabilità per esempio in ambienti acquosi. La modificazione dei materiali mesoporosi ordinati può avvenire usando differenti metodi, come:

- i. funzionalizzazione post-sintesi di silice libera dal surfattante,^{77, 108, 109}
- ii. funzionalizzazione post-sintesi di silice contenente il surfattante e che coinvolge reazioni di “spiazzamento” del surfattante^{110, 75, 111, 112};
- iii. sintesi diretta attraverso cocondensazione di organosilani e precursori di silice^{113, 114}
- iv. trasformazione termicamente indotta, di organosilani aventi framework ibridi organici-inorganici, a silice con gruppi pendenti¹¹⁵

Nel metodo di grafting post-sintesi, la superficie del materiale mesoporoso inorganico già presintetizzato è fatto reagire con gli organosilani attraverso i gruppi silanoli di superficie (fig. 4).

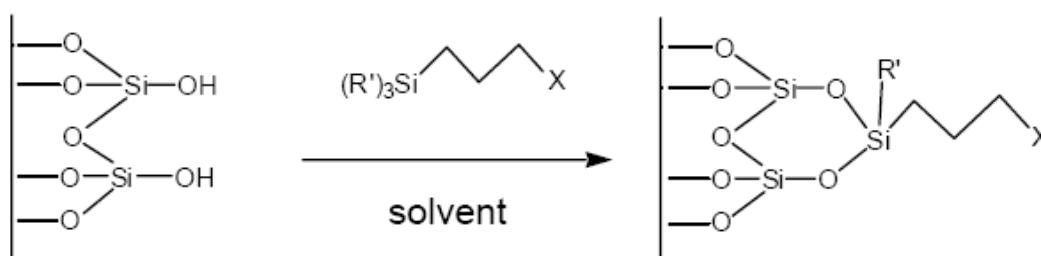


Figura 8. Esempio di meccanismo di post grafting

Nonostante una varietà di approcci sintetici sono stati perseguiti, e alcuni progressi significativi sono stati ottenuti, il metodo di post-grafting ha bisogno di essere migliorato in termini di controllo nella quantità e locazione dei gruppi funzionali sulla superficie dei materiali. Infatti, essi si raccolgono tipicamente all'estremità dei pori, portando ad una disomogenea copertura di superficie¹¹⁶.

Il metodo di diretta co-condensazione, chiamato anche sintesi “*one-pot*”, è

attualmente la più comune e via diretta di sintesi per introdurre gruppi organici nel network siliceo ¹¹⁷. Gli organosilani sono co-idrolizzati e condensati con gli altri reagenti (acqua, tetraalossisilano, templante) durante la preparazione della miscela di sintesi (fig.5).

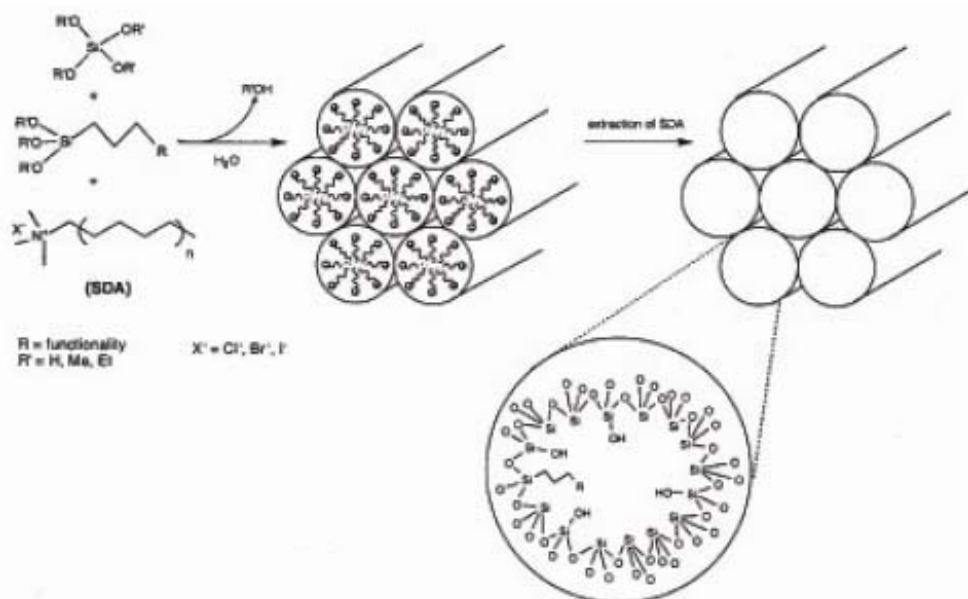


Figura 9. Esempio di cocondensazione di organosilani e tetraalossisilano di materiali mesoporosi

Punti in questione da considerare in questo caso, includono:

- Solubilità e stabilità dell'agente funzionalizzante nelle condizioni di reazione (pH, temperatura)
- stabilità del gruppo funzionale durante il processo di estrazione

Il metodo di sintesi attraverso cocondensazione è particolarmente attrattivo da un punto di vista pratico, perché è semplice, efficiente ¹¹⁸⁻¹²³, e fornisce un controllo migliore sulla quantità di gruppi organici introdotti nella matrice (circa il 60% degli atomi di silicio possono portare gruppi organici pendenti) ed assicura una copertura uniforme della superficie utilizzando condizioni delicate.

L'uso di precursori di alossisilani organici sta aumentando velocemente negli ultimi anni, dovuto anche ad un' ampia varietà di alossidi, disponibili in commercio (vedi

Sigma-Aldrich, Fluka, e Gelest).

Fra tutti gli organosilossani, quelli del tipo $R'Si(OR)_3$ offrono molti vantaggi sia per la ricerca di base che quella applicata in campi svariati come l'ottica, la catalisi, le membrane selettive, il riconoscimento molecolare, i sensori, o l'imprinting molecolare

117.

3.3.2 ...miglioramento delle interazioni host-guest nei DDS

Esempi di silice mesoporosa modificata utilizzata per migliorare le interazioni host-guest nel caso specifico del drug delivery sono di seguito riportati.

Molto interessante il lavoro di Tourné-Peteil *et al.*¹²⁴: l'ibuprofene è stato ancorato alla superficie della matrice dei materiali mesoporosi di tipo MCM-41, mediante apertura dell'anello epossidico di un 3-glicidossipropilsilano preventivamente innestato sulla superficie silicea. La formazione di un legame estereo presenta potenzialmente il vantaggio di proteggere il farmaco in quanto localizzato nel volume poroso, e di avvalersi di un meccanismo di rilascio indotto dalla rottura del legame estereo ad opera delle esterasi in vivo.

L'innovazione apportata da questo tipo di studio consiste nell'aver disegnato un potenziale pro-farmaco da una nuova e ben controllata reazione di accoppiamento tra un acido organico e un alchilsilano funzionale attaccato alla superficie silicica. Lo studio del rilascio dell'ibuprofene è ancora in fase di sviluppo.

Babonneau *et al.*¹²⁵ hanno studiato le possibili interazioni tra ibuprofene e matrici silicee tramite spettroscopia NMR di C^{13} e H^1 su solidi. Gli spettri mostrano una differenza di mobilità delle molecole di ibuprofene se la matrice è funzionalizzata o meno con il gruppo amminico.

Nei lavori di Lay *et al.*^{96,97} è stata studiata una architettura diversa di DDS basata su nanosfere di materiali mesoporosi MCM-41 i cui pori vengono "tappati" con nanocristalli di solfuro di cadmio (CdS) dopo l'intrappolamento della vancomicina, noto antibiotico glicopeptidico, o molecole di AdenosinTriFosfato (ATP). Il rilascio delle molecole biologicamente attive avviene in maniera controllata per apertura dei pori. Questo processo è mediato dalla presenza di agenti riducenti come il DDT (DL-treo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol) e il ME (Mercapto-Etanol), che fungono da attivatori

del rilascio (release trigger) rimuovendo i cristalli di CdS dalle superfici dei pori. Il funzionamento di questo sistema è un pò diverso: non si basa sulle interazioni tra le pareti dei pori e le molecole adsorbite, ma da una apertura-chiusura “meccanica” delle cavità con nanocristalli di dimensioni adatte.

Una dimerizzazione intramolecolare fotocontrollata e reversibile di derivati cumarinici attaccati alle aperture dei pori, è invece lo stimolo che ha guidato il rilascio di molecole organiche dai materiali MCM-41 nel lavoro di Nawal ¹²⁶.

Mentre, un sistema di rilascio controllato sensibile alla variazione di pH (e alla concentrazione di sali), è stato sintetizzato da Zhu ¹²⁷, usando un multistrato di PAH (poly(allylamine hydrochloride)) and PSS (sodium polystyrene sulfonate) (PSS), come rivestimento per “tappare” i mesopori: la capacità di immagazzinamento di questo sistema è risultata tre volte più alta comparata con quella del sistema senza rivestimento.

L’approccio del coating, utilizzando polimeri organici *swellable*, come i derivati dell’acido metacrilico, è stato anche investigato dal nostro gruppo ^{14 a, b}, utilizzando un noto farmaco antitumorale, il 5-fluoruracile.

In questo caso, la silice costituisce un reservoir per il farmaco, ed il network polimerico controlla la cinetica di rilascio. Solo un piccolo effetto di iniziale “first burst” è stato rilevato dal campione rivestito, in confronto alla silice non rivestita, probabilmente dovuto alla presenza di farmaco cristallizzato, non legato e depositato sulla superficie della silice e non completamente rivestita dal polimero.

3.3.3 ...e stabilità in ambienti acquosi.

In generale, la funzionalizzazione organica dei silicati, consentendo un controllo sulle proprietà di superficie, e portando alla modificazione delle proprietà di bulk, è stata trovata stabilizzare i materiali. In particolare, la modificazione organica può includere:

- modificazione delle proprietà idrofile/idrofobe della superficie,
- alterazione della reattività di superficie,
- protezione da attacchi superficiali.

Come già detto, gli organosilossani tipo $R'Si(OR)_3$ sono diventati di comune uso, sia perché il gruppo organico R' , che generalmente agisce come modificatore del network¹¹⁷, può avere differenti funzioni (gruppi alchilici o acrilici), sia perché, i più comuni alchiltriclorosilossani, non reagiscono con la superficie della silice al di sotto dei $300^\circ C$ e in assenza di acqua^{128, 129}. Il metile del $CH_3Si(OR)_3$ è il più piccolo gruppo organico che può essere introdotto sulla superficie dei materiali silicei, usando il metodo della cocondensazione. Sebbene è chimicamente inerte, la loro presenza introduce proprietà idrofobiche e può migliorare la stabilità idrotermale, come bene quella meccanica¹³⁰⁻¹³⁷.

Infatti, dopo idrolisi e condensazione, ogni silicio rimane legato al gruppo metilico e così il network del gel è meno rigido poiché il grado di cross-linking del network dell'ossido diminuisce.

I silossani fenolici, usati anche perché possono fungere da materiali di partenza prestrutturati per ulteriori modificazioni chimiche¹³⁸⁻¹⁴³, sono preferiti ai silossani metilici, al fine di aumentare la stabilità termica, la temperatura di transizione del vetro, l'indice di rifrazione.

La maggior parte degli studi riguardanti le modificazione organica dei materiali mesoporosi hanno focalizzato l'attenzione sulla stabilità idrotermale, valutando la loro struttura prima e dopo il trattamento in acqua alla temperatura di $100^\circ C$, in presenza del tensioattivo e per un periodo relativamente breve^{116, 144}

È importante dal punto di vista dell'applicazione biomedica, valutare che l'integrità della struttura sia ritenuta in ambienti acquosi, fisiologici, dopo un periodo più lungo, ed in generale eseguita a temperatura ambiente e/o a temperatura fisiologica.

Non bisogna dimenticare infatti, che tali applicazioni coinvolgono interazioni con soluzioni acquose, in cui tali materiali dimostrano una limitata stabilità, dipendente dal livello di acqua superficiale sulla silice, fattore che è difficile da controllare.

Infatti recenti studi hanno mostrato che le proprietà dei materiali M41S (famiglia di materiali a cui appartengono i materiali MCM-41) vengono modificate da prolungate esposizioni all'acqua, mostrando una diminuzione nella regolarità strutturale in termini di uniformità della struttura, della dimensione e del volume del poro¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. In realtà, solo piccoli cambiamenti nelle proprietà dei materiali sono stati documentati quando esposti a soluzioni neutre o acide e per un periodo sopra le 48 ore; è l'immersione in soluzioni basiche per un periodo piccolo (poche ore), che causa la maggior perdita di struttura

149, 150

Variatione quindi nei metodi di sintesi, come l'aggiunta di sali o la correzione del pH, o trattamenti post-sintesi e di cocondensazione con vari alcossidi sono stati investigati ^{145, 148, 149, 151, 152}.

4 *Cinetica di drug release da matrici a base di silice*

Il meccanismo di rilascio dei farmaci da matrici di silice non è stato ancora valutato in maniera estesa. La velocità di rilascio può essere controllata utilizzando differenti approcci:

- aggiungendo polimeri solubili in acqua (sorbitolo, PEG) o sostituendo l'alcolossido con alcossidi organo-modificati durante la sintesi ^{41, 42, 43, 53}
- modificando il rapporto acqua/alcolossido ^{38-40, 52} si può intervenire sul grado di deidratazione della matrice, o sulla dimensione delle particelle
- aggiungendo copolimeri di poliesteri nella miscela di sintesi ^{37, 153}.

Il rilascio del farmaco può essere permesso da differenti meccanismi, così come la diffusione attraverso una membrana a velocità “controllante”, da osmosi, da scambio ionico o da degradazione della matrice ¹. I sistemi controllati dalla diffusione possono essere divisi in reservoirs non-degradabili e devices monolitici.

Nei sistemi monolitici di varie forme, l'agente attivo è sia disperso che dissolto nella matrice polimerica. In entrambi i casi la diffusione del farmaco attraverso il polimero è lo step limitante la velocità, e la velocità di rilascio è determinata dalla scelta del polimero, dai suoi conseguenti effetti sulla diffusione e dal coefficiente di partizione del farmaco ¹⁵⁴
a, b

Pochi gli esempi dei farmaci studiati rilasciati da matrici del tipo xerogel: per esempio, il rilascio di nifedipina da particelle di silice avviene attraverso il riempimento capillare del solvente nei canali ed obbedisce ad una cinetica di primo ordine ⁴³; la velocità di rilascio del progesterone dalla silice porosa è governata dalla velocità di dissoluzione e diffusione ed obbedisce alla seconda legge di Fick's ⁵⁰; anche il rilascio di toromifene e di eparina sono controllati dalla diffusione, ma obbediscono ad una cinetica di ordine zero.

Il trattamento matematico della diffusione dipende dalla dispersione o dissoluzione del farmaco nella matrice. Se il farmaco è dissolto, il rilascio segue la prima legge di Fick. La seguente equazione descrive il rilascio di un farmaco da un device a forma di tavoletta:

$$\frac{M_t}{M_0} = 4 \left[\frac{Dt}{\pi h^2} \right]^{1/2}$$

dove M_t/M_0 è la quantità di farmaco rilasciata, D è il coefficiente di diffusione di un farmaco dalla matrice, h è lo spessore del device a tavoletta, e t è il tempo. Questa equazione è valida per il rilascio dei primi 60% di farmaco totale.

Higuchi ha sviluppato un'equazione per il rilascio dei farmaci solidi dispersi in matrici, da cui il farmaco diffonde attraverso polimeri non porosi¹⁵⁴. Il rilascio di farmaco è influenzato anche dalla sua concentrazione, oltre che dalla geometria del device. Il rilascio di farmaco segue la radice quadrata del tempo cinetico fino a che la concentrazione nella matrice arriva sotto il valore di saturazione ($C_0 \gg C_s$).

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{A}{2} \left(\frac{2DC_s C_0}{t} \right)^{1/2}$$

In questa equazione dM/dt è la velocità di rilascio del farmaco, A è l'area della tavoletta, (entrambi i lati), D è il coefficiente di diffusione del farmaco nella matrice, C_s è la solubilità del farmaco nella matrice, C_0 è la totale quantità di farmaco (dissolto più disperso) nell'unità di volume della matrice e t è il tempo. Nei sistemi monolitici, dove l'eccesso del farmaco in eccesso è disperso, la velocità di rilascio del farmaco incrementa con l'incrementare della concentrazione del farmaco.

L'espressione di Higuchi è un buon predittore delle velocità di rilascio dai sistemi contenente dal 5 al 10% in volume dell'agente attivo. A concentrazioni più elevate, le particelle di farmaco sono in contatto con ogni altra particella ed il farmaco è rilasciato per diffusione tramite l'acqua che entra nei pori.

Il modello di diffusione usato per descrivere la cinetica di rilascio di un farmaco da una matrice porosa considera la diffusione del medicamento per opera del fluido che è capace di entrare nella matrice attraverso i pori. Il farmaco è presunto dissolversi lentamente nel fluido e diffondere dal sistema attraverso i canali pieni di solvente.

Tale comportamento può essere descritto da una seconda equazione di Higouchi ¹⁵⁵ che può essere usata per predire la velocità di rilascio:

$$Q = k \cdot t^{1/2}$$

dove Q è la quantità di farmaco rilasciato nel tempo t e k è una costante di rilascio.

Quando il farmaco è disperso nella matrice e avviene la diffusione attraverso i pori pieni di solvente, la costante di rilascio dipende dalla diffusività (D) del farmaco dalla matrice nel fluido, dalla sua solubilità nella matrice (C_s) dalla totale quantità di farmaco (dissolto più disperso) nell'unità di volume della matrice (C_0), dal fattore di porosità (ε) e di tortuosità (τ) della matrice. Per cui la precedente equazione può essere scritta come segue:

$$Q = \left[\frac{D\varepsilon}{\tau} (2C_0 - \varepsilon C_s) C_s t \right]^{1/2}$$

5 *Biocompatibilità dei materiali a base di silice*

Qualsiasi materiale scelto come drug delivery system deve possedere alcune specifiche farmacologiche come immunocompatibilità, non tossicità, non cancerogenità, non teratogenità, protezione del principio attivo da processi di alterazione chimica e/o enzimatica, e mantenimento dell'attività biologica dello stesso.

I polimeri a base di silice amorfa sono non tossici e regolarmente usati come eccipienti nelle formulazioni farmaceutiche orali (azione glidante)¹⁵⁶, come additivi alimentari e come supplementi vitaminici (sospensioni colloidali)¹⁵⁷. È stato valutato il potenziale mutageno della “silice fume” attraverso dei test standard, quali il dosaggio di Ames, l'aberrazione cromosomica nelle cellule ovariche di criceto cinese, e il dosaggio della sintesi di DNA usando epatociti di ratto: in tutti i casi, i test di tossicità sono risultati negativi¹⁵⁸.

Wilson *et al.*^{159, 160} hanno condotto una serie di test in vitro ed in vivo per valutare la tossicità dei derivati della silice amorfa: tutti i test eseguiti hanno mostrato che i composti contenenti silice sono non tossici e biocompatibili. Allo stesso scopo è stata anche studiata la proliferazione di culture cellulari di fibroblasti di topo e l'attivazione di leucociti polimorfonucleati umani^{160, 161} in presenza di derivati silicei: non è stata osservata alcuna inibizione della crescita dei fibroblasti, né è stata riscontrata alcuna risposta infiammatoria significativa dei leucociti polimorfonucleati nelle zone limitrofe al sito di somministrazione. In uno studio di Korteso¹⁶², infine, non è stato osservato nessun cambiamento istologico a carico del fegato, dei reni, dell'utero e dei linfonodi di topo nonostante la quantità di silice applicata fosse piuttosto elevata (1.5g/Kg).

Altra prerogativa fondamentale che deve possedere un DDS è la facile e non tossica eliminazione dall'organismo. In accordo con i dati bibliografici rinvenuti, risulta che la degradazione della matrice silicica è lineare col tempo, e generalmente la velocità con cui si degrada è più bassa rispetto alla velocità di rilascio del farmaco³⁷⁻³⁹. Quando i derivati silicei sono esposti ad un ambiente acquoso, iniziano a degradarsi attraverso l'idrolisi dei legami silossani (Si-O-Si) a silanoli [Si(OH)₄].

Questi ultimi diffondono nel circolo ematico o linfatico, e vengono poi escreti con le urine attraverso il rene o sono attivamente fagocitati dai macrofagi^{95, 96}.

Durante il riassorbimento, la concentrazione di silicio rimane all'interno dell'intervallo fisiologico e non viene accumulato negli organi periferici. In altre parole, viene escreta in una forma solubile ed innocua attraverso il rene.

5.1 Biocompatibilità dei materiali mesoporosi

Mentre nei paragrafi precedenti abbiamo illustrato quanto le potenzialità di questi sistemi siano eccitanti, molte sfide importanti hanno bisogno di essere superate per rispondere a domande chiave per ulteriori progressi soprattutto nelle applicazioni biomediche. Una tra le più incalzanti “Qual è la misura della biologica compatibilità o biocompatibilità di questi materiali in vitro e in vivo?”

Da un'attenta analisi bibliografica nei riguardi degli studi inerenti la biocompatibilità dei materiali mesoporosi, è emerso che poche indagini sono state fatte e non sono neanche chiare. Per esempio in un recente report ⁸ è stato dimostrato l'efficiente internalizzazione di questi materiali da parte di cellule animali e vegetali, tramite microscopia confocale.

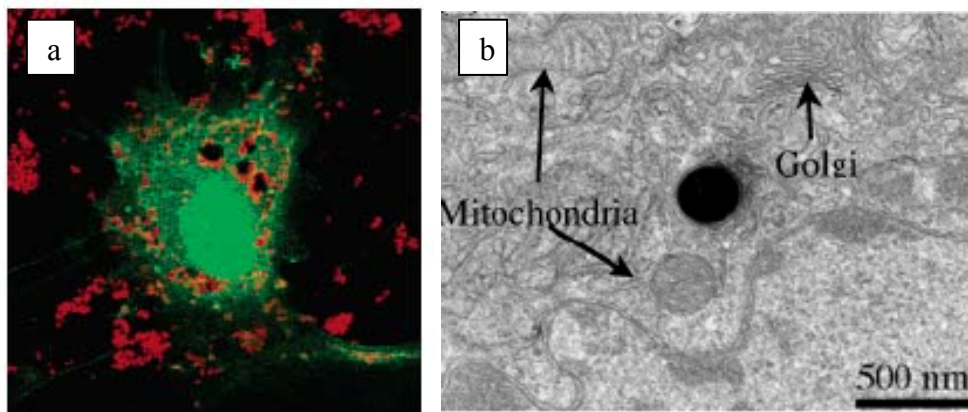


Figura 10. (a) Microfotografia fluorescente confocale di una cellula neuronale (verde) trasfetta con materiale mesoporoso (rosso). (b) Micrografia TEM: si possono notare alcuni organelli vitali intatti.

Come si vede dalla microfotografia l'immagine illustra che i materiali mesoporosi (puntini rossi fluorescenti) sono entrati nel citoplasma di una cellula neurale (verde).

L'unico accenno che si ha in questo report, riguardo la tossicità, è dato da una microfotografia TEM dove sono illustrati alcuni organelli vitali limitrofi, come mitocondri e apparato del golgi e da cui la deduzione della non tossicità.

In un altro report è stato osservato che la funzionalizzazione della superficie esterna dei materiali mesoporosi con gruppi per i quali le cellule esprimono specifici recettori, come l'acido folico, aumenta notevolmente l'efficienza dell'uptake del materiale da parte delle cellule. Inoltre, è stato dimostrato che la funzionalizzazione delle particelle con gruppi che alterano il loro potenziale zeta, influenza l'efficienza della loro internalizzazione. Nello stesso report è stata anche esaminata la biocompatibilità, comparando i profili di crescita cellulare di colture cellulari di "Hela" in presenza ed in assenza dei campioni (0.1mg/ml) per 4 giorni. Questi risultati non hanno mostrato differenza nei due profili di crescita⁹.

C'è un unico report in cui è stata valutata la citotossicità tramite formazione dell'insolubile formazano viola prodotto dai mitocondri delle cellule vive, (test colorimetrico del MTT), ma i valori della citotossicità non sono riportati¹⁰.

6 *Caratterizzazione strutturale, chimico-fisica e biologica*

6.1 *Caratterizzazione strutturale e chimico-fisica su polveri*

La metodologia da seguire per la caratterizzazione dei materiali mesoporosi prevede l'utilizzo di un diffrattometro a raggi X per l'identificazione della fase ottenuta.

Successivamente, si effettuano tecniche di adsorbimento/desorbimento di gas (in genere azoto), di analisi termogravimetrica, di immagini, allo scopo di definire meglio le proprietà chimico-fisiche e morfologiche del materiale sintetizzato. Non esiste per i materiali sintetizzati in self assembling con il farmaco, un protocollo da seguire per la caratterizzazione; per cui, sono state utilizzate, la dove potevano essere utili, le stesse tecniche di indagine utilizzate per la caratterizzazione dei materiali mesoporosi.

6.1.1 *Analisi diffrattometrica dei raggi X*

L'analisi diffrattometrica dei raggi X permette di individuare la distanza relativa tra gli atomi di un materiale cristallino, quando viene sottoposto ad un fascio monocromatico di raggi X.

I raggi X sono generati da un anticatodo di rame sotto vuoto, il quale è alimentato da una corrente di intensità tale da far arroventare il catodo. Da quest'ultimo parte l'emissione di elettroni poi accelerati dalla differenza di potenziale esistente tra anodo e catodo. Quando la distanza tra due piani reticolari del materiale cristallino sottoposto a radiazioni è dello stesso ordine di grandezza della radiazione incidente, i cristalli agiscono da reticoli di diffrazione per i raggi X. Questo principio è quantitativamente espresso dall'equazione di Bragg:

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

nella quale:

θ = angolo di incidenza individuato dalla direzione del raggio e il piano costituito dallo strato di atomi;

λ = lunghezza d'onda della radiazione incidente;

d = distanza tra due piani reticolari successivi.

Il numero n è un intero detto anche “ordine di riflessione”. L'equazione di Bragg consente di valutare la distanza d tra i piani reticolari noti l'angolo di incidenza e la lunghezza d'onda della radiazione.

Gli spettri diffrattografici ottenuti per le tre mesofasi costituenti la famiglia dei materiali M41S sono illustrati nella figura 7

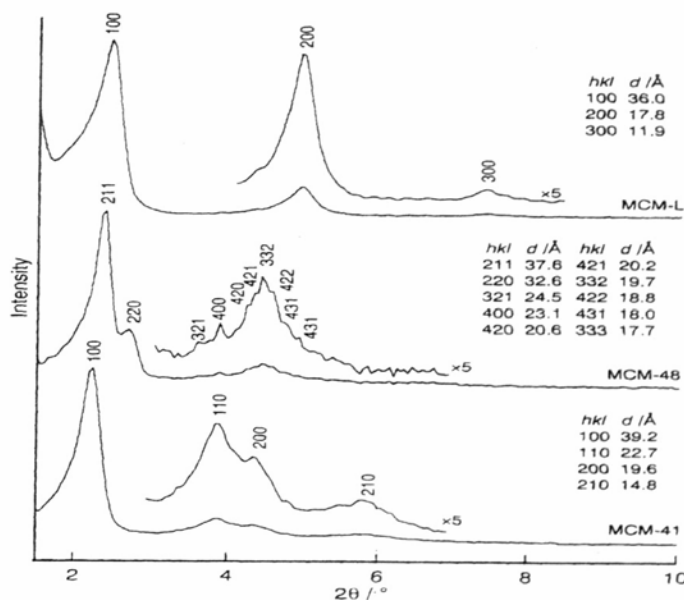


Fig. 7. Diffrattogrammi delle mesofasi MCM41, MCM48 ,MCM50 ¹⁶³

Il diffrattogramma della fase MCM-41 mostra, tipicamente, da tre a quattro riflessioni per valori di 2θ compresi tra 2° e 5° , ma sono stati individuati campioni con un numero ancora più elevato di picchi.

La presenza di riflessioni per bassi valori di 2θ indica l'esistenza di un ordine su grande scala; in particolare, tali picchi sono in relazione alla condensazione della silice intorno ad unità disposte parallelamente tra di loro e secondo un ordine esagonale,

in quanto la loro posizione corrisponde, approssimativamente, alle riflessioni di una cella unitaria esagonale.

Poiché i materiali mesoporosi non sono cristallini a livello atomico, non si osservano riflessioni ad angoli più elevati.

In molti casi, si possono ottenere spettri diffrattografici che presentano un unico picco. Corma¹⁶³ ha attribuito la perdita apparente di queste riflessioni alla formazione di cristalliti più piccoli, ma non meno ordinati.

6.1.2 Analisi calorimetrica differenziale (DSC)

L'analisi calorimetrica differenziale permette di rilevare transizioni di fase o reazioni chimiche che avvengono in un campione di solido tal quale, attraverso l'osservazione del calore assorbito o liberato in seguito ad incrementi lineari della sua temperatura. Essa è particolarmente utile per studiare variazioni strutturali all'interno dei solidi.

L'analisi può essere realizzata sotto un flusso di gas inerte (N₂, argon), aria o H₂. La curva DSC che si ottiene può presentare un punto di minimo, corrispondente a trasformazioni endotermiche, o evidenziare un punto di massimo, determinato da trasformazioni di tipo esotermico.

L'effetto termico viene misurato secondo un procedimento differenziale in base al quale la temperatura di una quantità nota di campione, posta in un apposito crogiolo, è di continuo confrontata con quella di un materiale di riferimento inerte, avente peso equivalente a quello del campione ed inserito in un crogiolo identico al primo.

6.1.3 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica consente di seguire la variazione di peso di un campione che viene riscaldato in modo che la sua temperatura aumenti linearmente; spesso è affiancata dall'*analisi termogravimetrica differenziale (DTG)*. Questa ultima è una tecnica "indiretta" che consiste nel diagrammare i dati relativi alla derivata prima

della perdita di peso del campione rispetto alla temperatura nell'unità di tempo e quindi consente di valutare i punti di flesso della curva TGA.

Nello studio dei materiali mesoporosi, la TGA e la DTG permettono di conoscere la quantità di tensioattivo o di altre specie organiche, presenti nella struttura e la quantità di acqua adsorbita dal campione.

Una tipica curva TGA per una MCM-41 è riportata nella figura 8

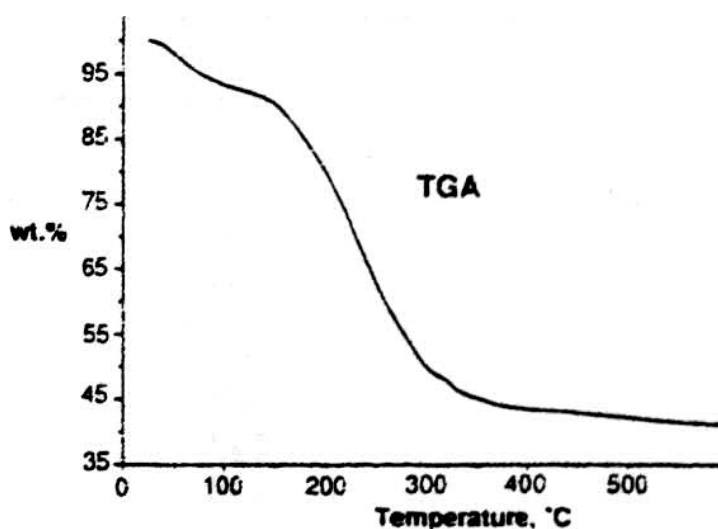


Fig. 8 Analisi termogravimetrica per una MCM-41 condotta in aria ¹⁶⁴.

Questa curva mostra tre tratti distinti: da 25 a 150 °C, da 150 a 400 °C e sopra i 400 °C. La prima perdita di peso è associata al desorbimento fisico di acqua e altri gas. Il secondo tratto è accompagnato da sviluppo di calore e, quindi, è da attribuire alla decomposizione e combustione delle specie organiche.

Infine il terzo stadio è in relazione alla perdita di acqua dovuta alla condensazione dei gruppi silanoli.

Anche l'analisi termogravimetrica è realizzata in presenza di gas diversi e in genere non si rilevano differenze importanti tra le curve TGA ottenute. Si osserva, però, che i campioni riscaldati in ambienti inerti assumono dopo l'analisi una colorazione leggermente scura dovuta alla deposizione di coke.

6.1.4 Analisi porosimetrica per adsorbimento/desorbimento di azoto

Quando un solido viene a contatto con un gas, si verifica la condensazione di molecole gassose in corrispondenza dello strato interfacciale; tale fenomeno prende il nome di *adsorbimento*. E' risaputo che l'area superficiale e la porosità del solido giocano un ruolo fondamentale nell'adsorbimento. Per tale ragione misure di adsorbimento di gas o vapori vengono effettuate allo scopo di ottenere utili informazioni riguardanti la superficie specifica e la struttura porosa dei solidi.

La quantità di gas adsorbita da un campione di solido, ad una temperatura assegnata, è funzione della pressione di equilibrio del sistema. L'equazione che esprime la relazione, a temperatura costante, tra la massa (o il volume) di gas adsorbito e la pressione (o la pressione relativa) è definita *isoterma di adsorbimento*.

Una tipica isoterma di adsorbimento per materiali mesoporosi MCM-41, rappresentata nella figura 9 e consistente di tre tratti distinti, è definita come isoterma di tipo IV.

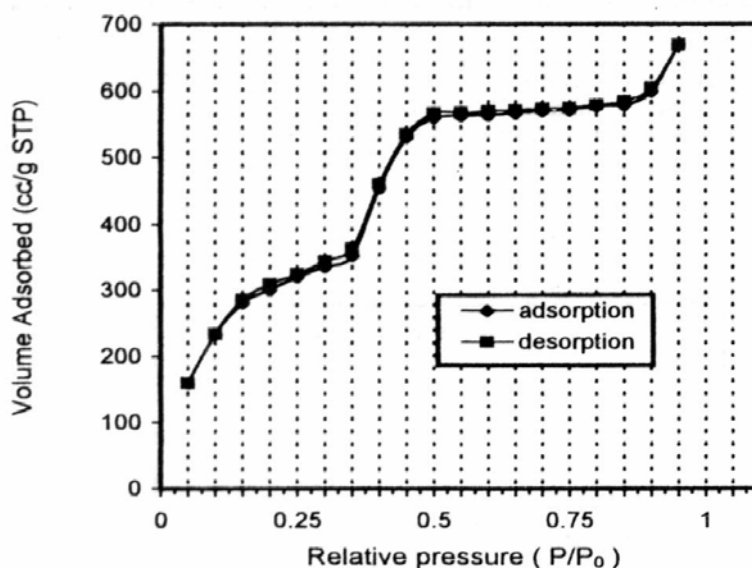


Fig. 9 Isoterma di adsorbimento-desorbimento di azoto per materiali mesoporosi MCM-41¹⁶⁵.

Il primo tratto, relativo a un regime di bassa pressione, corrisponde alla formazione di uno strato di adsorbato sulle pareti del poro in maniera simile a quanto si verifica

nell'adsorbimento su una superficie piana. Ciò è causato dalle forze di attrazione tra le molecole di gas e gli atomi o ioni che costituiscono il solido. All'aumentare della pressione lo strato di gas adsorbito si ispessisce, in quanto le interazioni tra le molecole gassose già condensate e quelle libere tendono ad attrarre ulteriori molecole dalla fase gas a quella adsorbita.

L'ispessimento del film di adsorbato in un poro cilindrico porta, inevitabilmente, a un aumento della curvatura del menisco liquido; tale circostanza riduce il potenziale chimico della fase adsorbita, e conseguentemente, determina la condensazione del vapore nei pori già a una pressione relativa inferiore al valore unitario. Questo fenomeno prende il nome di *condensazione capillare* ¹⁶⁶. Ad esso corrisponde il riempimento spontaneo dei mesopori, a cui si accompagna un repentino aumento della quantità di gas adsorbito, come è evidente dal secondo tratto dell'isoterma di adsorbimento.

Il terzo tratto mostra piccole variazioni in quanto esso si riferisce ad una condizione successiva al raggiungimento della saturazione dei pori.

In genere le isoterme di adsorbimento esibiscono un ciclo di isteresi, per cui l'isoterma di adsorbimento e di desorbimento non sono coincidenti. Per determinare in maniera corretta l'isoterma di adsorbimento/desorbimento, il materiale deve essere preventivamente esposto ad un ambiente sottovuoto (*degasaggio*) in modo da rimuovere le molecole eventualmente adsorbite sulle pareti dei pori per determinare il peso effettivo del campione.

Le condizioni di degasaggio ottimali (temperatura e pressione residua) dipendono dal particolare sistema gas-solido. Generalmente un periodo di degasaggio di 6-10 ore a 300-400 °C è di solito sufficiente a ridurre la pressione residua a $\sim 10^{-4}$ torr. Infine il materiale così preparato viene raffreddato fino a 77 K (temperatura dell'azoto liquido) ed esposto all'adsorbato; in seguito mediante misure volumetriche o gravimetriche, si valuta la quantità di gas adsorbita dal solido per vari livelli di pressione, costruendo in tal modo l'isoterma di adsorbimento.

L'adsorbato più comunemente utilizzato è l'azoto. Per la valutazione della sola area superficiale, può essere utilizzato in alternativa l'argon, ma l'isoterma così ottenuta non consente di stimare la distribuzione della dimensione dei pori.

6.2 Modelli utilizzati per le precedenti caratterizzazioni.

In questi ultimi anni vari modelli sono stati proposti per la valutazione delle principali proprietà strutturali dei materiali mesoporosi tipo MCM-41. Tali metodi combinano i risultati ottenuti dall'applicazione delle tecniche precedentemente descritte, per stimare l'area superficiale, le dimensioni dei pori e lo spessore delle pareti dei solidi porosi ottenuti.

6.2.1 Valutazione dell'area superficiale

La superficie specifica A , cioè l'area superficiale di un 1 g di solido, può essere messa in relazione con la capacità del monostrato n_m . Questa è definita come il numero di moli di adsorbato presenti in un singolo strato di molecole - il monostrato - che ricopre la superficie del solido di massa unitaria. L'equazione che lega A e n_m è la seguente:

$$A = n_m a_m L$$

dove a_m è l'area media occupata da una singola molecola di adsorbato nel monostrato completo e L è il numero di Avogadro. Per l'azoto si assume, solitamente, un valore di a_m pari a 16.2 \AA^2 .

Brunauer, Emmett e Teller hanno avanzato una teoria per la valutazione della capacità del monostrato detta BET. La teoria BET si basa sul modello cinetico proposto da Langmuir che considera lo stato di equilibrio del processo di adsorbimento corrispondente alla condizione di uguaglianza tra la velocità di condensazione delle molecole sui siti liberi e quella di evaporazione dai siti occupati.

Il risultato della teoria BET è espresso dalla equazione:

$$\frac{n}{n_m} = \frac{c(P/P^0)}{(1 - P/P^0)[1 + (c - 1)P/P^0]}$$

dove P^0 è la tensione di vapore dell'adsorbato, n sono le moli di gas adsorbite per unità di massa di adsorbente alla pressione P , c è un parametro che dipende dalla

temperatura e dall'adsorbato considerato.

Per applicare l'equazione BET ai dati sperimentali è conveniente esprimerla nella forma:

$$\frac{P}{n(P^0 - P)} = \frac{1}{n_m c} + \frac{c-1}{n_m c} \frac{P}{P^0}$$

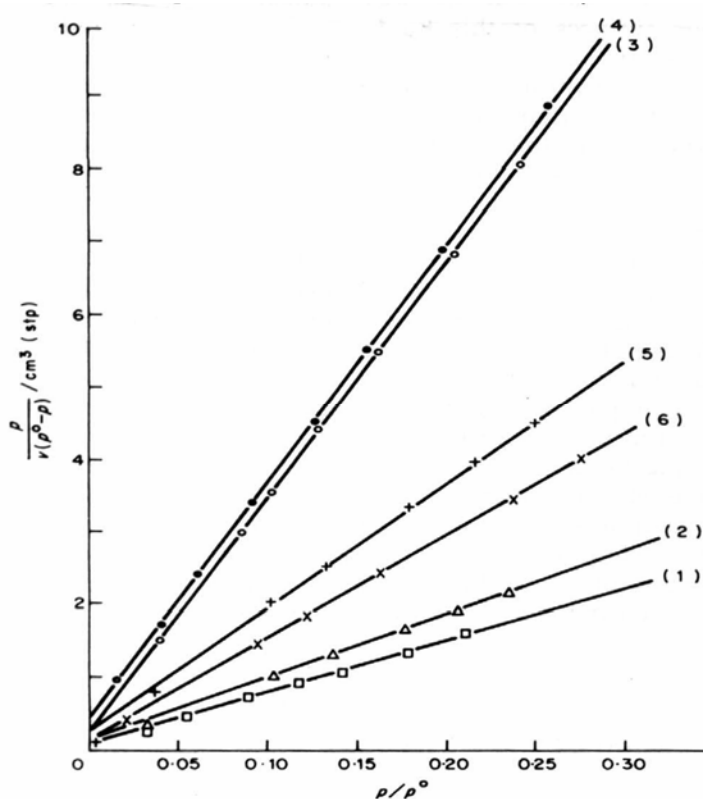


Fig. 10. Diagramma BET ottenuto da prove di adsorbimento di azoto a 90 K su diversi catalizzatori ¹⁶⁶

I dati di $P/n(P^0 - P)$ contro P/P^0 si dispongono, quindi, su una linea retta con pendenza $s = (c-1)/n_m c$ e intercetta $i = 1/n_m c$. La soluzione di queste due equazioni fornisce il valore del parametro c e della capacità del monostato n_m :

$$c = s/i + 1$$

$$n_m = 1/(s+1)$$

Un esempio di diagramma BET è riportato nella figura 10. E' da evidenziare che l'equazione BET è valida solo nell'intervallo di pressione relativa tra 0.05 e 0.30.

6.2.2 Valutazione della dimensione dei pori e dello spessore delle pareti

Tra i metodi di valutazione delle dimensioni dei pori si distinguono quelli che adoperano esclusivamente dati di pressione desumibili dall'isoterma di desorbimento (metodo 4V/S, metodi basati sull'equazione di Kelvin), ed altri che utilizzano considerazioni geometriche riguardanti la struttura delle MCM-41 (metodo geometrico $V_{MES} + XRD$).

6.2.2.1 Metodo 4V/S

Il diametro D di un poro cilindrico è pari a $D = 4V/S$ dove V e S sono rispettivamente il volume e la superficie del poro. Questa formula, nota come equazione di Gurvitsch¹⁶⁶, è di facile uso per la valutazione della dimensione media dei pori di un solido mesoporoso.

Nel caso delle MCM-41, caratterizzate da una distribuzione dei diametri dei pori incentrata attorno ad un unico valore, il diametro medio corrisponde alla dimensione effettiva del poro. In questo caso, il diametro si determina come $D = 4 \frac{V_{MES}}{S_{BET}}$, dove V_{MES} è il volume mesoporoso stimato dall'isoterma di adsorbimento (fig. 11), e S_{BET} è l'area superficiale valutata secondo il metodo BET.

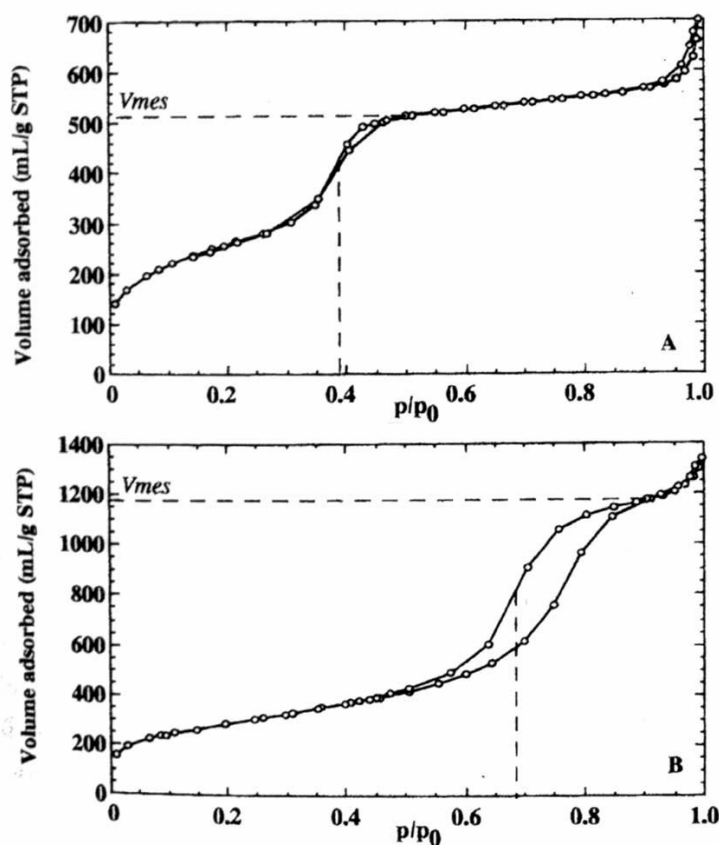


Fig. 11 Isotherme di adsorbimento-desorbimento di azoto di due materiali mesoporosi, sintetizzati rispettivamente con CTABr (grafico sopra) e con una miscela di CTA e TMB (grafico sotto)

167

6.2.2.2 Metodi basati sull'equazione di Kelvin

L'isoterma di adsorbimento/desorbimento di un solido mesoporoso mostra la caratteristica forma a gradino corrispondente al riempimento dei mesopori per condensazione capillare.

Tale fenomeno si verifica ad una pressione relativa P/P_0 (punto di inflessione dell'isoterma in figura 11) determinata dal raggio di curvatura r_K dell'interfaccia gas-fase adsorbita ed è quantitativamente espresso dall'equazione di Kelvin:

$$\ln \frac{P}{P^0} = - \frac{n\gamma V_m}{RT} \frac{1}{r_K}$$

dove γ e V_m sono rispettivamente la tensione superficiale e il volume molare del liquido adsorbito.

Quando ha luogo la condensazione capillare, le pareti dei pori sono già ricoperte da uno strato di gas adsorbito di spessore t , per cui la sola equazione di Kelvin sottostima la dimensione effettiva del poro. t è detto spessore statistico dello strato preadsorbito e per la sua valutazione si adopera comunemente l'equazione di Halsey ¹⁶⁸:

$$t = \sigma \left(- \frac{5}{\ln P / P^0} \right)^{1/3}$$

dove σ è lo spessore del monostrato di gas adsorbito.

Sebbene l'equazione precedente sovrastimi il valore dello spessore statistico di circa 1 Å, essa risulta agevole per suo il calcolo.

Il diametro effettivo del poro, valutato con le equazioni di Kelvin e Halsey, è pari a :

$$D = 2(r_k - t) = 2 \left[- \frac{nV_m \gamma}{RT \ln(P / P^0)} + \sigma \left(- \frac{5}{\ln(P / P^0)} \right)^{1/3} \right]$$

I parametri fisici che compaiono nelle equazioni di Kelvin e Halsey, relativi all'azoto come adsorbito, sono riportati nella tabella 1

Tabella 1 Parametri fisici relativi all'azoto ¹⁶⁷.

n , (desorbimento)	2
V_m , volume molare del liquido adsorbito [cm ³ mol ⁻¹]	34.68
γ , tensione superficiale del liquido adsorbito [N m ⁻¹]	8.72 x 10 ⁻³
T , temperatura [K]	77.4
σ , spessore medio del monostrato di N ₂ [Å]	3.54
R , costante dei gas [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	8.314

Tali parametri sono ricavati da misure effettuate sull'azoto adsorbito su una superficie piana quindi si riferiscono a condizioni ambientali diverse da quelle esistenti nei pori.

Poiché le proprietà del film adsorbito sono fortemente sensibili alla curvatura dell'interfaccia, è necessario correggere i valori dei parametri fisici da inserire nell'equazione di Kelvin. Una proposta per valutare la tensione superficiale in un ambiente ristretto, è stata formulata da Defay^{169, 170}, il quale ha suggerito una relazione che esprime l'aumento della tensione superficiale γ , al diminuire del raggio di curvatura

dell'interfaccia r_K : $\gamma = \frac{\gamma_\infty}{1 - \lambda / r_K}$, dove γ_∞ è la tensione superficiale del liquido adsorbito

misurata su una superficie piana. I dati sperimentali di tensione superficiale dell'azoto sono in buon accordo con l'equazione di Defay quando si assume $\lambda = 2.97\text{\AA}$. I valori di γ così corretti migliorano la stima del diametro dei mesopori mediante l'equazione di Kelvin.

6.2.2.3 Metodo geometrico $V_{MES} + XRD$

Numerosi sono i metodi di valutazione di carattere geometrico^{171, 172}. In particolare la versione proposta da Galarneau et al.¹⁶⁷ tiene conto della forma esagonale dei pori degli MCM-41¹⁷³. Nel caso di una disposizione esagonale di pori esagonali (figura 12), si definisce grado di vuoto del solido poroso la quantità ε data da:

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{PORI}}}{V_{\text{TOTALE}}} = \frac{S}{A} = \frac{4r^2}{a^2}$$

dove S è l'area di un poro esagonale, A è la superficie della cella unitaria, r è il raggio del cerchio inscritto nell'esagono e a è il parametro del reticolo.

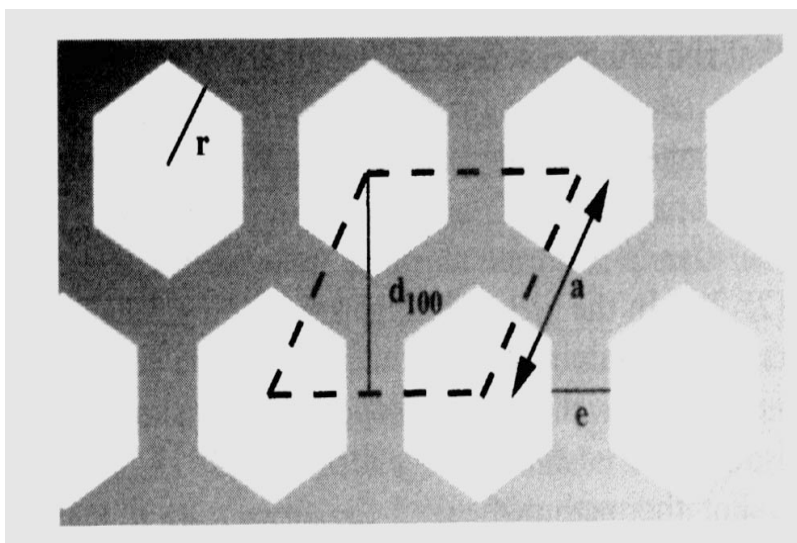


Fig. 12. Rappresentazione schematica della disposizione esagonale dei pori degli MCM-41. La linea tratteggiata rappresenta la cella della struttura esagonale con: a parametro di cella, e spessore della parete, d_{100} distanza tra due piani reticolari successivi, e r apotema della sezione esagonale del poro¹⁶⁷

Per confrontare la dimensione dei pori esagonali con i diametri dei pori cilindrici stimati con i modelli precedentemente descritti, si definisce un diametro equivalente $D = 2.1 \times r$, che corrisponde al diametro di un poro cilindrico la cui sezione ha la stessa area del poro esagonale. Utilizzando la definizione di grado di vuoto si ricava: $D = 1.05 a \sqrt{\varepsilon}$.

Il grado di vuoto può essere calcolato a partire dalla valutazione sperimentale del volume dei pori; esso corrisponde al volume di azoto adsorbito nei mesopori, V_{MES} (espresso in ml), per grammo di solido (figura 3.5).

Assumendo una densità della parete dei pori pari alla densità della silice amorfa (ρ_{SiO_2}), l'espressione di ε diventa:
$$\varepsilon = \frac{V_{MES}}{V_{MES} + 1/\rho_{SiO_2}}$$
.

Sempre da considerazioni geometriche si evince che il parametro di cella a può essere espresso come $a = \frac{2}{\sqrt{3}} d$ dove d , distanza tra i piani reticolari, è desumibile dai dati di diffrazione ai raggi X.

Riassumendo, il valore del diametro dei pori, valutato mediante il metodo geometrico, risulta:

$$D = 1.05a \sqrt{\frac{V_{MES}}{V_{MES} + 1/\rho_{SiO_2}}}$$

Il metodo geometrico può essere applicato anche ai materiali non calcinati per determinare il diametro delle micelle. In questo caso, bisogna valutare il volume occupato dal tensioattivo al posto del volume di azoto adsorbito:

$$D = 1.05a \sqrt{\frac{V_{TENS}}{V_{TENS} + V_{SiO_2}}}$$

E' utile introdurre la costante K definita come rapporto tra la il volume di tensioattivo

e il volume di silice:
$$K = \frac{V_{TENS}}{V_{SiO_2}} = \frac{m_{TENS} / \rho_{TENS}}{m_{SiO_2} / \rho_{SiO_2}} = \frac{\rho_{SiO_2}}{\rho_{TENS}} \frac{m_{TENS}}{m_{SiO_2}}$$

Il rapporto $\frac{m_{TENS}}{m_{SiO_2}}$ si ricava dai dati ottenuti dall'analisi termogravimetrica. Nota K , si

risale al diametro della micella :

$$D = 1.05a \sqrt{\frac{K}{K + 1}}$$

6.2.2.4 Spessore delle pareti

La valutazione dello spessore medio e delle pareti che dividono i pori esagonali delle fasi MCM-41 può essere eseguita facilmente a partire dal modello geometrico; e può essere stimato dalla differenza tra il parametro di cella e il diametro del cerchio inscritto nell'esagono: $e = a - 2r = a - 0.95D$

6.3 Caratterizzazione chimico-fisica in ambienti acquosi

La caratterizzazione chimico-fisica di un materiale in un ambiente acquoso è importante soprattutto quando esso viene proposto per applicazioni biomediche.

La stabilità fisica, come anche l'attività biologica dei materiali sono dipendenti dalla loro dimensione (diametro medio e distribuzione delle dimensioni) e da parametri morfologici intesi come forma, ma anche come misura di parametri superficiali (bagnabilità, carica).

Per esempio, la misura di tali parametri può darci utili informazioni riguardo le proprietà che sono richieste ad un materiale al fine di migliorare le interazioni sistemi biologici-materiale e conoscere quindi la biocompatibilità. La compatibilità biologica è cruciale nel disegnare un efficace biomateriale.

Ci sono definiti requisiti legali, morali ed etici nel selezionare i nuovi *biomateriali*. In particolare l' U.S. National Institute Health ¹⁷⁴, prevede:

- *la caratterizzazione chimico-fisica in ambienti acquosi*, valutando:
 - *parametri morfologici*: (carica, bagnabilità, forma e dimensione)
 - *distribuzione della dimensione delle particole*,
 - *la stabilità*
- *misurazione della compatibilità biologica (biocompatibilità)*, utilizzando test di *citotossicità in vitro*.

Tale protocollo è stato usato nella caratterizzazione dei biomateriali investigati.

6.3.1 Bagnabilità e misure di angolo di contatto ^{175, 176}

L'idrofilicità di una superficie è un fattore importante ai fini della biocompatibilità. Un parametro molto utile nello studio delle interazioni tra la superficie di un solido e l'ambiente biologico è la misura della sua bagnabilità.

La bagnabilità di un solido è direttamente correlata alla sua tensione superficiale. La tensione superficiale (o energia superficiale) è definita come la quantità di energia libera osservata alla superficie di un materiale ed è indicata con la lettera γ . Dal punto di vista termodinamico, la tensione superficiale di un solido è in relazione con l'angolo

formato tra le superficie di una goccia di liquido immobile e quella del solido su cui essa appoggia e che ha come vertice il punto di intersezione di queste due fasi con la fase gassosa. Tale angolo prende il nome di angolo di contatto ed esso definisce la bagnabilità di una superficie.

L'angolo di contatto è specifico per ogni sistema dato ed è determinato dall'interazione attraverso le tre interface. Molto spesso il concetto è illustrato con una piccola goccia di liquido, che resta su una superficie solida orizzontale piana (figura 1).

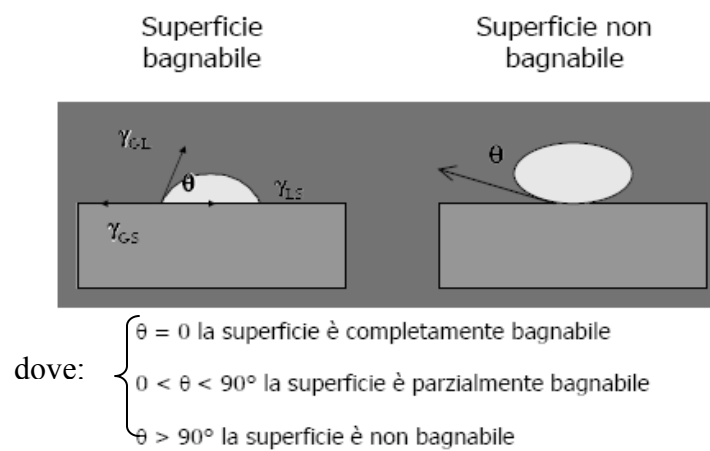


Figura 1. Illustrazione dell'angolo di contatto

L'equazione che descrive la tensione superficiale e che definisce l'angolo di contatto, è nota come equazione di Young. Questo tipo di angolo di contatto è noto anche come angolo di Young (θ_Y) è più precisamente come angolo di contatto statico.

In questa situazione, il liquido forma una goccia simmetrica sulla superficie del solido, con un angolo di contatto costante in ogni punto di intersezione tra le tre fasi. In molte situazioni reali (p. es., superfici ruvide) l'angolo di contatto sperimentalmente osservato differisce da θ_Y , cioè non risponde alla equazione di Young.

Si parla di angolo di contatto dinamico nel caso di una goccia di liquido in moto sulla superficie di un solido. In questo caso, l'angolo di contatto varia a seconda del punto d'intersezione tra le fasi considerato rispetto alla direzione del moto, in particolare:

➤ è possibile individuare un angolo di contatto d'avanzamento (θ_A), di valore

maggiore

➤ un angolo di contatto d'arretramento), di valore minore.

La differenza tra questi due angoli ($\theta_A - \theta_R$) è chiamata isteresi d'angolo di contatto. è mostrata nella figura 2.

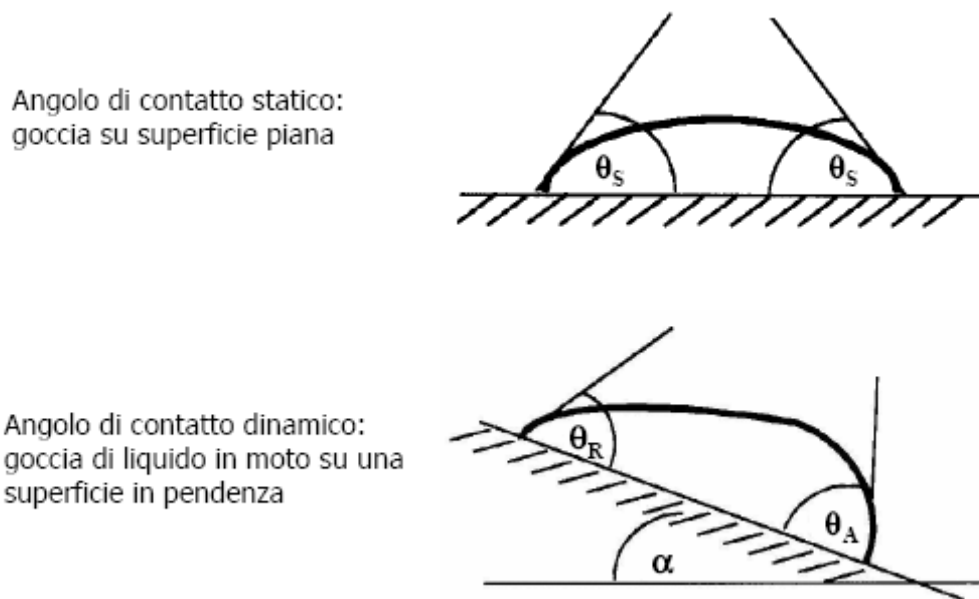


Figura 2. Angolo di contatto statico e dinamico

Per una superficie solida ideale, morfologicamente e chimicamente omogenea, l'isteresi d'angolo di contatto è uguale a zero e il valore di θ sperimentalmente osservato è uguale a θ_Y . Per una superficie liscia ma chimicamente eterogenea, il valore di θ sperimentalmente osservato non è più uguale a θ_Y , ma può essere considerato una buona approssimazione di θ_Y . Per una superficie ruvida, i valori di θ sperimentalmente osservati sono generalmente privi di significato nei termini della equazione di Young.

In particolare, questi valori di θ sono maggiori di quelli misurati su superfici chimicamente equivalenti, ma lisce. Essi non riflettono dunque le proprietà chimiche della superficie, ma le sole proprietà morfologiche. In conclusione, la determinazione della isteresi di angolo di contatto è utile nell'indicare le eterogeneità presenti sulla

superficie di un materiale.

L'angolo di contatto può essere misurato utilizzando diversi metodi (figura 3).

- Il metodo goniometrico consiste nell'osservazione di una goccia di un liquido sulla superficie (metodo della goccia sessile) del materiale d'analizzare. In alternativa, l'osservazione può interessare una bolla d'aria prigioniera.

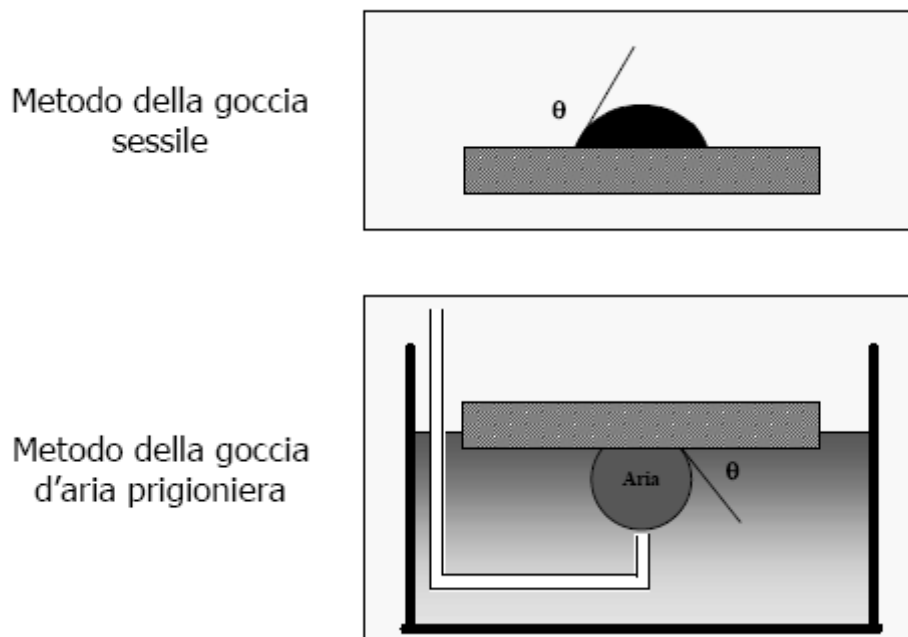


Figura 3. Metodi di misura dell'angolo di contatto

- Il metodo tensiometrico consiste nella misura della forza che agisce su un campione solido quando è portato a contatto con un liquido, che è legata a θ tramite la seguente equazione:

$$F = \lambda_{LV} P \cos \theta + W - F_A$$

dove P è il perimetro del campione, W il suo peso, F_A la spinta di Archimede che subisce.

Il metodo della goccia sessile è un metodo di angolo di contatto ottico in cui è misurato l'angolo tra la linea di base della goccia e la tangente al confine della goccia (figura

4).

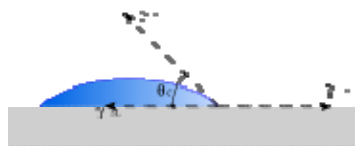


Figura 4. Rappresentazione del metodo goniometrico della goccia sessile

In realtà, la corretta interpretazione della misura dell'angolo di contatto su una superficie reale, è molto più complessa a causa della rugosità e della eterogeneità che fanno decadere l'ipotesi di superficie ideale. Pertanto il metodo è valido per stimare le proprietà di bagnabilità di una localizzata regione di una superficie solida modificata. Per convenzione si definiscono idrofobiche (e non idrofobe) le superfici aventi un angolo di contatto con l'acqua maggiore di 90 gradi, idrofiliche (e non idrofile) le superfici con angoli minori di 90 gradi.

L'analisi comporta il semplice confronto tra i valori di angolo di contatto statico determinati prima e dopo la modifica. Misure di angolo statico effettuate nel tempo, dopo la modifica della superficie, possono fornire una indicazione della loro stabilità.

6.3.2 *Scanning Force Microscopy*¹⁷⁷

La Scanning Force Microscopy (SFM) nota anche come Atomic Force Microscopy (AFM), appartiene alla famiglia delle Scanning Probe Microscopes -SPMs-.

In tali microscopie una sonda appuntita (tip) esamina una superficie in maniera tale che le interazioni tra il campione e la sonda sono monitorate e vengono studiate le proprietà di superficie dei materiali dal livello atomico a quello micrometrico. L'AFM, come tutte le SPMs contiene i componenti illustrati in figura 5:

Atomic Force Microscopy (AFM) : General Components and Their Functions

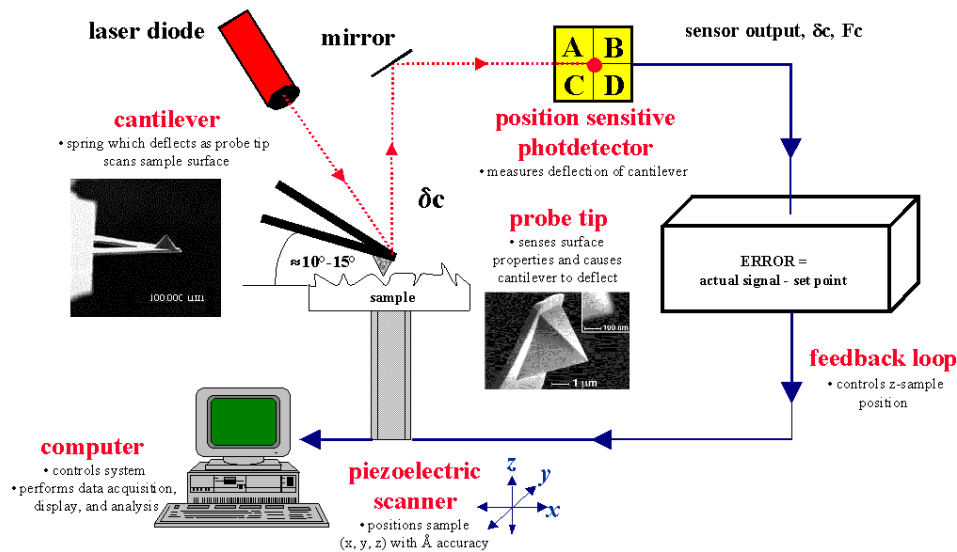


Figura 5. Schema dei componenti di un AFM ¹⁷⁸

L'atomic force microscopy investiga la superficie attraverso un tip molto appuntito, lungo un paio di micron e spesso circa 100 Å. Il tip è locato nello spazio finale libero del cantilever (figura 5) che può essere lungo da 100 a 200 micron.

Tip e cantilever sono 2 critici componenti dell'AFM, perchè essi determinano la forza applicata al campione e la definitiva risoluzione del sistema. Possono essere ottenuti già assemblati da silicio o nitruro di silicio, usando tecniche fotolitografiche. Per il cantilever la forma a V è la più popolare, offrendo basse resistenze meccaniche alla deflessione verticale, e alte resistenze alla torsione laterale. Tipicamente lunghi da 100 a 200 micron, larghi da 10 e 40 micron e spessi da 0.3 a 2 micron.

Nell'AFM una luce laser, puntata sul retro del cantilever, viene riflessa in un fotodiodo, che monitora qualsiasi deflessione o piegamento del cantilever causato dalle forze, e quindi dalle interazioni, tip-campione. Le deflessioni (o piegamenti) misurate dal cantilever, permettono ad un computer di generare, dalla mappa di interazioni registrate, una mappa topografica.

Le interazioni più comuni che possono contribuire alla deflessione del cantilever di un AFM sono le forze di Van der Waals. La dipendenza di tali forze dalla distanza tip-

campione è illustrata nella figura 6.

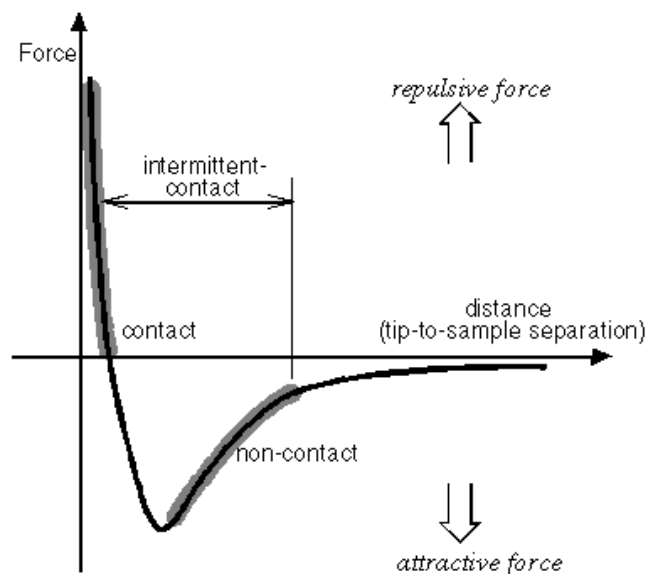


Figura 6. Forza interatomica contro curva di distanza ¹⁷⁷

Due regimi di distanza sono mostrati in figura 6 : il regime di contatto ed il regime di non contatto. Nel regime di contatto, la forza interatomica tra il cantilever, che è mantenuto a meno di pochi angstroms dalla superficie del campione, e quest'ultima, è di tipo repulsivo. Nel regime di non contatto, dove il cantilever è tenuto nell'ordine di una decina di una centinaia di angstrom dalla superficie del campione, la forza tra il tip ed il campione è di tipo attrattivo.

L'esistenza dei due regimi ha generato la definizione delle tecniche di contatto e di non contatto. Nella tecnica di contatto o repulsiva, il tip tocca fisicamente il campione esercitando una forza che può variare da 10^{-8} N a 10^{-6} N.

La tecnica del non contatto è invece una delle molteplici tecniche di vibrazione del cantilever, nella quale quest'ultimo vibra vicino la superficie del campione. La forza totale applicata è molto bassa, generalmente intorno a 10^{-12} N. Questa tecnica è desiderabile perché, fornendo una misura della topografia del campione senza contatto, evita i problemi di contaminazione, e di deterioramento che possono accadere con la tecnica del contatto.

Devono essere usati cantilever più rigidi rispetto a quelli usati nella tecnica del contatto, perché cantilever più leggeri possono essere attratti in contatto con la superficie del campione.

I bassi valori di forza impiegati nel regime del non contatto e la più grande rigidità dei cantilever usati, sono fattori che rendono segnali piccoli e spesso difficili da misurare.

Per cui spesso è addizionato un sistema di rilevamento che fa vibrare il cantilever vicino alle sue frequenze di risonanze, (da 100 a 400 kHz) e con una ampiezza di poche decine di 100 di angstrom. Quando il tip si avvicina alla superficie del campione, il sistema rileva o i cambiamenti nella frequenza di risonanza o i cambiamenti nell'ampiezza della vibrazione. La sensibilità di questo rilevamento fornisce una risoluzione verticale sub-angstrom dell'immagine, come per la tecnica del contatto.

La relazione tra la frequenza di risonanza ed il cantilever e le variazioni nella topografia del campione può essere spiegata come segue.

La frequenza di risonanza di un cantilever varia con la radice quadrata della sua costante di rimbalzo, la quale a sua volta varia con il gradiente di forza del cantilever. Il gradiente di forza del cantilever, che è la derivata della forza contro la curva di distanza mostrata sopra, cambia con la separazione tip-campione.

Questi cambiamenti nella frequenza di risonanza del cantilever possono essere usati come misura dei cambiamenti nel gradiente di forza, i quali riflettono i cambiamenti tra lo spazio tip-campione e quindi la topografia del campione.

Una AFM a contatto intermittente, meglio conosciuto come *tapping-mode*, è stato usato nei nostri studi. Questa tecnica è simile alle tecnica di non contatto, eccetto per la distanza del cantilever, la quale è più vicina alla superficie del campione, cosicché il tip per piccole frazioni del suo periodo di oscillazione, dà appena dei colpetti (tap) alla superficie del campione.

L'ampiezza delle oscillazioni del cantilever, come per la tecnica del non contatto cambia in risposta allo spazio tip-campione. Questa tecnica è diventata un'importante tecnica AFM perché, come possiamo comprendere, ha superato gli svantaggi delle due tecniche illustrate prima, utilizzando i vantaggi di entrambe. Infatti la tecnica ha consentito di ottenere una migliore qualità delle immagini con pochi effetti deleteri sul campione.

6.3.3 Light Scattering ¹⁷⁹

La tecnica del *light scattering* è basata sul principio che particole che passano attraverso un raggio laser, disperderanno la luce ad un angolo che è direttamente correlata alla loro dimensione. Al diminuire della dimensione delle particelle, l'angolo di dispersione osservato aumenterà logaritmicamente. L'intensità della dispersione osservata dipende anche dalla dimensione delle particelle e diminuisce, con una buona approssimazione, in relazione alla sezione della particella. Particole grandi quindi disperderanno la luce ad angoli stretti, ma con un'alta intensità, mentre particole piccole disperderanno la luce ad angoli più ampi, ma con una bassa intensità.

La prima misura che deve essere effettuata in un sistema di diffrazione laser, è la cattura dei dati dello scattering della luce da parte delle particole oggetto di studio.

Un tipico sistema è costituito, come mostrato in figura 7, da:

- un laser che fornisce una fonte di luce coerente ed intensa di lunghezza d'onda fissata
- un sistema di “*presentazione*” del campione al fine di garantire che il materiale in esame passi attraverso il raggio laser come un flusso di particelle omogenee ed in uno stato di dispersione noto e riproducibile
- una serie di sensori che vengono utilizzati per misurare il pattern della luce prodotta ad un largo range di angoli.

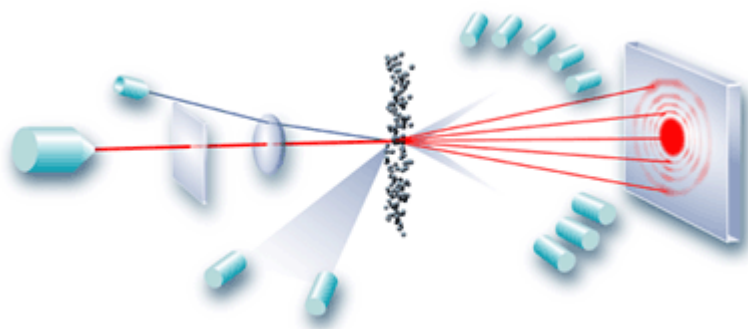


Figura 7. Rappresentazione schematica di un sistema di light scattering

Il range di dimensioni accessibili durante la misura è direttamente correlata al range angolare della misura della dispersione, con strumenti che misurano oramai da circa

0,02 gradi a oltre 170 gradi. Una serie di rilevatori logaritmici, dove i detector sono vicini tra di loro per angoli piccoli, che diventano più distanziati per angoli più larghi, rende una sensibilità ottimale. Infatti tale sistema di detector segue i cambiamenti osservati nell'angolo di dispersione man mano che la dimensione delle particelle diminuisce.

Inoltre, la serie di sensori è generalmente regolata in maniera tale che volumi uguali di particelle di dimensioni diverse producono un segnale misurato simile. Ciò richiede che la dimensione dei rilevatori aumenti man mano che la dispersione dell'angolo misurato aumenta. Due diverse metodologie di light scattering possono essere utilizzate per la determinazione della dimensione delle particelle: la tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS) conosciuta anche come Photon Correlation Spettroscopi, che misura la dimensione delle particelle tipicamente in una regione submicrometrica ¹⁸⁰ e la tecnica dello Static Light Scattering ¹⁸¹ che misura particelle fino ad una regione millimetrica.

6.3.4 Misura del potenziale zeta ¹⁸²

La carica superficiale è stata valutata misurando il potenziale zeta. La misura del potenziale zeta è usata per valutare la stabilità della carica di un sistema disperso e nell'assestamento della formulazione di un prodotto stabile. È il potenziale zeta la principale forza che media le interazioni interparticellari e non la carica superficiale.

Particelle con un alto potenziale zeta dello stesso segno di carica, sia positivo, sia negativo, si respingeranno l'un l'altro. Convenzionalmente un alto potenziale zeta può essere alto sia in un senso negativo che positivo. Un alto valore di potenziale zeta può conferire stabilità a molecole o particelle abbastanza piccole e aventi una bassa densità da rimanere in sospensione, per esempio impedendo l'aggregazione.

Non ci sono attualmente tecniche che misurano direttamente il potenziale zeta delle particole. Una valutazione quantitativa è fornita dalla misura della dispersione della luce elettroforetica, applicando un campo elettrico alla sospensione contenente le particole.

Particole con un certo valore di potenziale zeta migreranno verso l'elettrodo di carica opposta e con una velocità proporzionale alla grandezza di tale valore.

La velocità viene misurata mediante anemometria laser Doppler, dove il cambiamento della frequenza o della fase della luce di un laser incidente, causato

dalle particole in movimento, viene misurato come mobilità elettroforetica delle particole (μ). Tale valore di mobilità viene convertito nel valore di potenziale zeta introducendo, nel calcolare tale valore, la viscosità (η) e la costante dielettrica (ϵ) del disperdente e l'applicazione della teoria di Smoluchowski e di Huckel. Queste teorie sono approssimazioni utili per molte applicazioni. Sono ora disponibili molti modelli che possono darci una più esatta conversione, ma richiedono una più ampia conoscenza della chimica delle dispersioni.

6.3.5 Test di citotossicità in vitro: MTT e LDH assays ¹⁸³

La *valutazione della biocompatibilità* viene effettuata esponendo i materiali da testare a linee cellulari, utilizzando alcuni saggi colorimetrici che valutano alcuni parametri inerenti la citotossicità. La citotossicità è la capacità di un sostanza di provocare tossicità cellulare.

La maggiorparte dei test attualmente in uso per misurare la citotossicità sono basati sulla stima dell'alterazione della membrana plasmatica valutando o il conseguente rilascio di componenti nel mezzo cellulare o l'uptake di coloranti normalmente esclusi alle cellule viventi. I metodi attualmente in uso esibiscono differenti svantaggi tra cui:

- l'uso di isotopi radioattivi,
- necessità di "pre-labeling" delle cellule target
- addizionali steps di lavaggio.

Inoltre essi non permettono la valutazione simultanea di un numero ampio di campioni. I test di formazione del formazano insolubile (blu porpora) dal corrispondente MTT ((3-(4,5-dimetiltiazolo-2-illil)-2,5- difenil tetrazolio bromuro), prodotto solubile e di colore giallo, e del rilascio dell'enzima citosolico LDH (Lattato deidrogenasi) sono due dosaggi colorimetrici non radioattivi sicuri, accurati, sensibili, veloci (l'uso di lettori spettrofotometrici multi-well permette di processare un largo numero di campioni simultaneamente) e facili (non sono necessari steps di pre-labeling o di lavaggio).

Uno dei modi di investigare la tossicità cellulare, è la quantificazione del danno alla membrana. Il lattato deidrogenasi (LDH) è un enzima stabile nel citosol espresso in tutte le cellule mammifere. La membrana plasmatica integra è impermeabile al LDH, ma

il danno alla membrana cellulare risulta in un cambio della permeabilità ed in un successivo rilascio di LDH nel fluido extracellulare ¹⁸⁴

Il rilascio in vitro del LDH dalle cellule fornisce un accurata misura dell'integrità della membrana cellulare e della citotossicità cellulare. La quantità di LDH rilasciato, misurato tramite una reazione colorimetrica, è direttamente proporzionale al grado di danneggiamento della membrana e quindi della citotossicità del materiale testato.

Il rilascio del lattato deidrogenasi si è dimostrato essere un popolare e affidabile test sia per la citotossicità ^{185, 186} che per studi immunologici, dove nel saggio di citotossicità cellulare ha superato il test di rilascio del cromo radioattivo e negli studi di biocompatibilità, è diventato un importante test di screening *in vitro* ^{187, 188}.

Il dosaggio della formazione del sale di formazano, test sviluppato da Mosmann ¹⁸⁹, è un ulteriore test colorimetrico sensibile, quantitativo e affidabile, il cui principio è il monitoraggio dell'attività enzimatica degli enzimi deidrogenasi mitocondriali nelle cellule viventi, che ci da un indicazione dell'attività respiratoria cellulare.

Il substrato (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-illil)-2,5- difenil tetrazolio bromuro))-MTT-, giallo, solubile in acqua è convertito dagli enzimi mitocondriali, attivi solo se la cellula è viva, in un insolubile cristallo di formazano blu. La quantità del prodotto insolubile del sale di formazano è direttamente proporzionale al numero di cellule viventi.

6.3.5.1 *Caco (Carcinoma colon) cell-2* ¹⁹⁰

La linea cellulare di Caco-2 (clone C2BBE1) è derivata dall'adenocarcinoma colonrettale umano. Quando le cellule crescono sotto condizioni di culture standard, possono spontaneamente sottostare a differenziazione dopo il raggiungimento della confluenza. Esse formano un monostrato di cellule altamente polarizzate, unite da tipiche giunzioni strette (tight junction), dopo due o tre settimane di incubazione. Le loro proprietà elettriche, la conduttività ionica e la permeabilità somigliano molto alle cellule del piccolo intestino, che è risaputo essere la parte dell'apparato digerente dove avviene la maggior parte del processo di assorbimento delle sostanze. Per cui risulta essere un attendibile modello in vitro per studiare il comportamento dei sistemi che vengono progettati per somministrazione orale.

7 Attività sperimentale

L'attività sperimentale è stata suddivisa in tre differenti parti:

- Nella prima parte sperimentale, la silice mesoporosa tipo MCM-41 con diversa dimensione dei pori, è stata sintetizzata e caratterizzata. Successivamente i materiali privi del tensioattivo, sono stati testati come drug delivery system di un farmaco antitumorale, il 5-fluoruracile. In particolare si è voluto investigare quanto il diametro dei pori possa essere considerato un parametro fondamentale nel controllare il rilascio di tale farmaco.
- Nella seconda parte sperimentale, è stato utilizzato un altro approccio sintetico per la realizzazione di drug delivery system utilizzando biomateriali a base di silice: sono stati sintetizzati materiali ibridi in self-assembling in presenza del farmaco stesso (5-fluoruracile). Sono state studiate le cinetiche di rilascio con cui il farmaco abbandona il sistema in fluido fisiologici, simulanti l'ambiente gastrico ed intestinale.
- Nella terza parte sperimentale, silice mesoporosa ibrida, tipo MCM-41, è stata sintetizzata e caratterizzata sia da un punto di vista strutturale, con le classiche analisi su polveri, sia in ambienti acquosi al fine di valutare le proprietà chimico-fisiche negli ambienti nei quali è prevista la loro applicazione. Inoltre la loro citotossicità è stata misurata.

Parte sperimentale

7.1 Silice mesoporosa come Drug delivery System

L'obiettivo del programma di sperimentazione condotto è stato quello di valutare le potenzialità dei materiali mesoporosi MCM-41 ad ospitare, all'interno della loro struttura porosa, molecole di interesse farmaceutico, e successivamente di controllarne il rilascio nelle condizioni più idonee a migliorarne l'efficacia terapeutica.

In particolare, si è voluto investigare quanto il diametro dei pori possa essere considerato un parametro fondamentale nel controllare il rilascio di tale farmaco. Per tale motivo materiali con differenti dimensioni dei pori sono stati sintetizzati.

Il possibile utilizzo dei materiali MCM-41 come DDS è stato dunque sperimentato seguendo le fasi sotto elencate:

- 1) scelta del farmaco per il quale progettare un DDS e studio delle sue proprietà chimico/fisiche;
- 2) sintesi e caratterizzazione di materiali MCM-41 con diversa dimensione dei pori adatti ad essere impregnati del farmaco prescelto;
- 3) impregnazione del materiale MCM-41 valutando differenti protocolli;
- 4) valutazione qualitativa e quantitativa del farmaco adsorbito dal materiale mesoporoso;
- 5) studio della cinetica di rilascio del farmaco dal materiale impregnato, simulando gli ambienti fisiologici in cui il DDS dovrebbe operare a seguito della somministrazione.

7.1.1 Scelta del farmaco

Il farmaco va scelto tra quelli per cui esiste un'effettiva esigenza di realizzare un DDS: ad esempio, un farmaco molto tossico, che non può essere somministrato più volte al giorno, o un farmaco con una breve emivita plasmatica. L'emivita plasmatica misura la durata dell'efficacia terapeutica della singola somministrazione, ed è definita come il tempo di dimezzamento della concentrazione del principio attivo nel sangue a partire dal momento della somministrazione. Ovviamente, un principio attivo con emivita breve avrebbe bisogno di ripetute e frequenti somministrazioni; provocando gli accumuli nell'organismo con relativi problemi di tossicità. La disponibilità di un DDS

consentirebbe di allungarne l'emivita evitando di ricorrere a frequenti somministrazioni ravvicinate nel tempo.

Una volta scelto il farmaco, se ne valutano le dimensioni (queste devono essere paragonabili al diametro dei pori del materiale MCM-41) e se ne studiano le proprietà chimico-fisiche. In particolare, viene verificata la solubilità in diversi solventi (aspetto che risulta importante nella fase di impregnazione del materiale) e si valuta che tipo di interazioni possono instaurarsi tra i gruppi funzionali presenti nella molecola e la superficie interna ed esterna del materiale. La superficie del materiale, sulla quale sono presenti i gruppi silanoli (-SiOH), è ulteriormente modificabile consentendo di indurre delle interazioni specifiche tra il principio attivo e la matrice.

Il farmaco scelto è stato il 5-Fluorouracile, noto farmaco antitumorale, indicato per il trattamento palliativo dei tumori maligni epiteliali, e, più specificatamente, del carcinoma della mammella, del colon, del retto, del pancreas. Attualmente la somministrazione endovenosa è quella più utilizzata, visti gli effetti tossici che mostra il farmaco se somministrato per via orale; ma in caso di somministrazione endovenosa, l'emivita risulta molto bassa ¹⁹¹, tanto da rendere necessarie somministrazioni ripetute ed in quantità che raggiungono facilmente la concentrazione minima tossica. Tale scelta è stata effettuata in maniera da poter confrontare i risultati ottenuti con quelli riportati in diversi studi e che, fra l'altro, sono ancora in corso per riuscire a migliorare l'efficacia terapeutica del sistema ²⁷.

Da un punto di vista chimico il 5-fluorouracile è una pirimidina fluorurata: sia i gruppi carbonilici che i gruppi amminici secondari si prestano molto bene alla formazione di legami ad idrogeno con i gruppi ossidrilici presenti sulla superficie interna ed esterna delle matrici mesoporose a base di silice. L'acqua alla temperatura di 40°C è uno dei pochi solventi in cui il farmaco ha una discreta solubilità ¹⁹² ed è stato scelto come solvente di impregnazione. Le dimensioni molecolari (5,3Å x 4,5Å) permettono al 5-fluorouracile di essere ospitato nei pori di qualsiasi materiale mesoporoso.

7.1.2 Sintesi e caratterizzazione dei materiali mesoporosi MCM-41

È stato utilizzato un protocollo di sintesi che prevede l'utilizzo di tensioattivi cationici e una fonte di silice in soluzione acquosa basica. Sono stati utilizzati tensioattivi con una differente lunghezza della catena alchilica, al fine di ottenere materiali con differente dimensione dei pori (vedi paragrafo 3.3).

I campioni preparati sono stati identificati come MCM-41₁₆, MCM-41₁₂, MCM-41₁₀ ed MCM-41₈ dove i numeri 16, 12, 10, e 8 indicano il numero di atomi di carbonio presenti nella catena alchilica del tensioattivo utilizzato. Di seguito sono riportati i rapporti molari dei reattivi e le procedure di sintesi utilizzate per la preparazione dei materiali mesoporosi:

MCM-41₁₆: SiO₂-0.2CTABr-0.2NaOH-0.04Al(OH)₃-40H₂O

MCM-41₁₂: SiO₂-0.2DoABr-0.2NaOH-0.04Al(OH)₃-40H₂O

I tensioattivi cationici Cetiltrimetilammoniobromuro [C₁₆H₃₃N(CH₃)₃Br] –CTABr- e Dodeciltrimetilammoniobromuro [C₁₂H₂₅N(CH₃)₃Br] DoABr sono stati disciolti in H₂O distillata. Sotto continua agitazione magnetica, sono stati aggiunti alla soluzione nell'ordine l'idrossido di sodio, l'idrossido di alluminio, e dopo completa dissoluzione, è stata aggiunta la silice fumed. Dopo aver ottenuto la completa omogeneizzazione della miscela i geli ottenuti sono stati posti in un'autoclave di tipo Morey e quindi in forno termostato a 150 °C per 24 ore. I prodotti sintetizzati sono stati quindi sfornati, recuperati dalla soluzione madre mediante filtrazione, e sottoposti a lavaggio con acqua distillata. I materiali così ottenuti sono stati essiccati in forno a 75 °C per 2 ore, lasciati a temperatura ambiente per ulteriori 24 ore e finemente macinati. Le polveri ottenute sono state calcinate in muffola a 550 °C per 12 ore circa in modo da ottenere la combustione delle micelle di tensioattivo e rendere disponibile la porosità dei materiali.

MCM-41₈: SiO₂-0.5OtABr-0.77NaOH-0.66H₂SO₄-52.83H₂O

MCM-41₁₀: SiO₂-0.5DeABr-0.77NaOH-0.66H₂SO₄-52.83H₂O

I tensioattivi cationici Deciltrimetilammoniobromuro [$C_{10}H_{21}N(CH_3)_3Br$] –DeTABr- e Ottiltrimetilammoniobromuro [$C_8H_{17}N(CH_3)_3Br$] –OtABr- ed il silicato di sodio sono stati solubilizzati in H_2O distillata sotto continua agitazione magnetica. Dopo circa mezz'ora il pH è stato corretto ad un valore pari a 9 mediante aggiunta di H_2SO_4 . I geli così ottenuti sono stati posti in contenitori di polipropilene e lasciati, in condizioni statiche, per 30 ore in una stufa alla temperatura di $100^\circ C$. I campioni sono stati quindi sottoposti alla stessa procedura utilizzata precedentemente.

Per identificare la fase ottenuta, i campioni sono stati sottoposti ad analisi diffrattometrica dei raggi X utilizzando un diffrattometro Philips modello 1730/10 fornito di un goniometro verticale PW 1050/70 per la misura dell'angolo di diffrazione. I dati di diffrazione sono stati acquisiti ed elaborati da un PC Olivetti con microprocessore 80/286, contenente software applicativo per diffrattometria a raggi X su polveri della Ital Structures di Riva del Garda. I raggi X sono stati generati alimentando l'anticatodo di Cu con una corrente di 20 mA ed assicurando una differenza di potenziale di 40 KV tra anodo e catodo. L'analisi è stata condotta nell'intervallo $1^\circ \leq 2\theta \leq 15^\circ$ con una velocità di scansione di $0.005^\circ/s$.

I campioni sintetizzati appartengono tutti alla famiglia dei materiali MCM-41. Essi presentano infatti la caratteristica riflessione a 2° circa (espressa in 2θ) mostrata in figura 1 per il campione MCM-41₁₆ come esempio. In Tab. 1 sono riportati i valori della riflessione d_{100} in 2θ ed Å (vedi par.6.1.1).

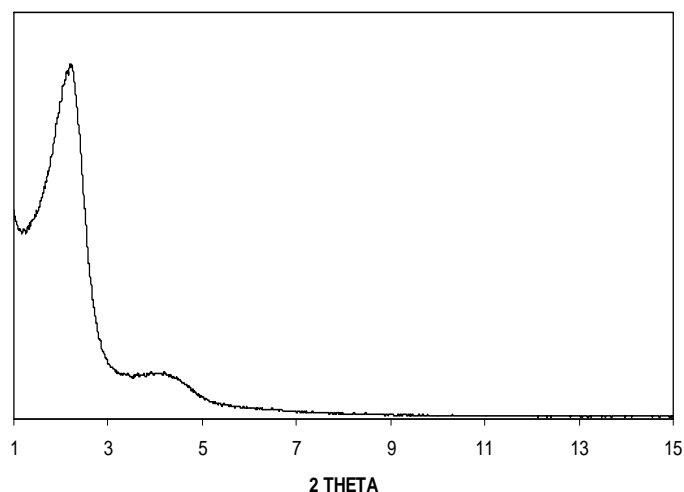


Fig. 1. Diffratogramma del campione MCM-41₁₆ calcinato

Tabella 1

Campione	$d_{1,00}$ (Å)
MCM-41 ₁₆	40.50
MCM-41 ₁₂	33.00
MCM-41 ₁₀	29.50
MCM-41 ₈	26.00

Le caratteristiche chimico-fisiche (area superficiale, volume e diametro dei pori, spessore delle pareti) sono state determinate tramite tecnica di adsorbimento-desorbimento di azoto, la cui isoterma è stata ottenuta a 77 K utilizzando come strumento di analisi il Micromeritics ASAP 2010. La procedura di degasaggio è stata effettuata alla temperatura di 300 °C ed è durata circa 10 ore.

Le isoterme di adsorbimento-desorbimento ottenute sono caratterizzate dallo *stepped pore filling*, relativo al fenomeno della condensazione capillare, caratteristico dei materiali mesoporosi MCM-41), nell'intervallo di P/P_0 0.3÷0.8 (in fig.2 è mostrata l'isoterma relativa al campione MCM-41₁₆ come esempio).

L'analisi porosimetrica consente di valutare diverse caratteristiche strutturali dei materiali porosi, quali l'area superficiale specifica (S_{BET}), il diametro dei pori e lo

spessore delle pareti. I valori di queste proprietà, relativi ai campioni MCM-41 sono riportati in Tab. 2. Sono stati inoltre calcolati lo spessore delle pareti ed il relativo diametro dei pori utilizzando il metodo geometrico proposto da Galarnau et al¹⁶⁷.

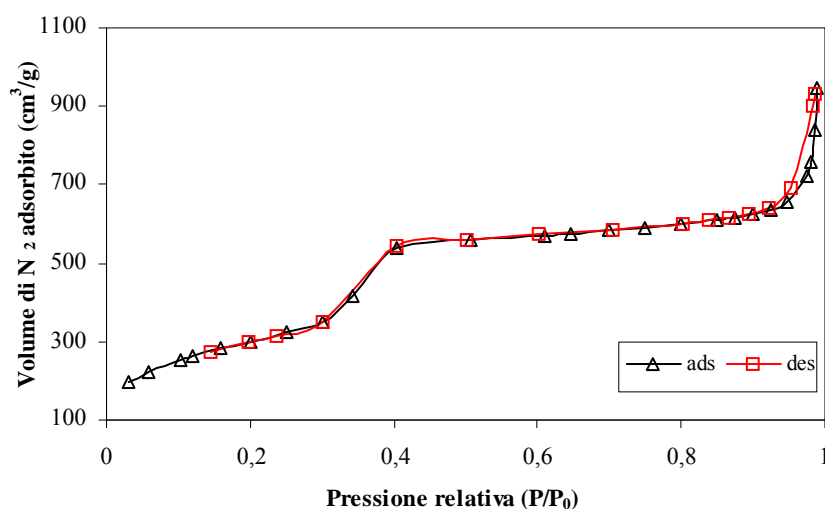


Fig. 2. Curve di adsorbimento-desorbimento di N₂ per il campione MCM-41₁₆

Tabella 2

Campioni Calcinati	S _{BET} (m ² /g)	Volume dei pori P/P ₀ =0.8 (cm ³ /g)	Diametro Pori (Å)	Spessore Pareti (Å)
MCM-41 ₁₆	1100,5	0,95	39,2	16,8
MCM-41 ₁₂	1085,5	0,58	30,0	14,4
MCM-41 ₁₀	820,5	0,38	24,3	10,0
MCM-41 ₈	300,0	0,20	17,0	15,0

Le dimensioni dei pori (Tab. 2) diminuiscono al diminuire del numero degli atomi di carbonio nella catena alchilica dei tensioattivi utilizzati e come previsto, ben si adattano alle dimensioni della molecola del 5-Fluorouracile. Tutti i campioni possono accogliere il farmaco sfruttando le proprietà di adsorbimento e soprattutto i campioni MCM-41₁₆ e MCM-41₁₂ che evidenziano valori di superficie specifica più elevati.

7.1.3 Impregnazione dei materiali mesoporosi sintetizzati

Dopo aver effettuato la sintesi e la completa caratterizzazione dei materiali mesoporosi MCM-41, è stata effettuata l'impregnazione con il 5-Fluorouracile (5-FU).

Come precedentemente detto, l'acqua è stata scelta come solvente per il processo di impregnazione del 5-fluorouracile. Tale solvente possiede alcune prerogative essenziali per un'efficace impregnazione:

- è affine verso il farmaco;
- non compromette la mesoporosità della matrice;
- è facile da allontanare.

Gli esperimenti sono stati effettuati alla temperatura di 40 °C al fine di favorire il processo di solubilizzazione del farmaco.

Al fine di ottenere le migliori condizioni di loading su tutti i campioni, sono state effettuate tre differenti procedure di impregnazione

• Metodo 1: Impregnazione con rapporto farmaco/matrice 1/1

La soluzione di farmaco è stata preparata dissolvendo 300 mg di 5-FU in 20 ml di acqua distillata. Tale soluzione è stata mantenuta sotto leggera agitazione per 24 ore alla temperatura di 40°C al fine di favorire la completa solubilizzazione del farmaco. In seguito 300 mg di ogni campione mesoporoso, attivati precedentemente in stufa alla temperatura di 100°C per 2 ore, sono stati dispersi nella soluzione e mantenuti sotto leggera agitazione per ulteriori 24 ore.

La dispersione così ottenuta è stata, quindi, sottoposta all'azione di una pompa da vuoto meccanica, al fine di rimuovere completamente il solvente. Tale processo è durato fino ad ottenere un peso della matrice costante. E' stato quindi utilizzato un rapporto farmaco/matrice 1/1. I campioni impregnati attraverso tale metodo sono stati identificati come: MCM-41₁₆₋₁, MCM-41₁₂₋₁, MCM-41₁₀₋₁, MCM-41₈₋₁.

• Metodo 2: Impregnazione con rapporto farmaco/matrice 1/2

La procedura di impregnazione descritta è analoga a quella riportata nel metodo 1. In questo caso il rapporto farmaco/matrice utilizzato è 1/2. I campioni impregnati con tale metodo sono stati identificati come: MCM-41₁₆₋₂, MCM-41₁₂₋₂, MCM-41₁₀₋₂, MCM-41₈₋₂

• Metodo 3: Reimpregnazione

300 mg di matrice, impregnata utilizzando il metodo 2, sono stati sottoposti ad un secondo processo di impregnazione⁹⁴ utilizzando una soluzione ottenuta solubilizzando 300 mg di 5-FU in 20 ml di acqua distillata. I campioni impregnati con tale metodo sono stati identificati come: MCM-41₁₆₋₃, MCM-41₁₂₋₃, MCM-41₁₀₋₃, MCM-41₈₋₃.

7.1.4 Caratterizzazione dei campioni impregnati

L'efficacia del processo di impregnazione su ciascuno dei campioni esaminati è stata valutata in termini di:

- verifica dell'integrità della struttura del materiale mesoporoso a seguito dei diversi trattamenti di impregnazione;
- determinazione della quantità di 5-FU impregnato nella matrice mesoporosa.

Tale valutazione è stata effettuata eseguendo sulle matrici impregnate le stesse analisi condotte sui campioni prima dell'impregnazione. In particolare, sono state eseguite:

- l'analisi diffrattometrica dei raggi X oltre che nell'intervallo $1^\circ \leq 2\theta \leq 15^\circ$ (intervallo di verifica dell'ordine della mesofase esagonale dei materiali dopo l'impregnazione), anche nell'intervallo di scansione $5^\circ \leq 2\theta \leq 40^\circ$, in modo da rilevare la eventuale presenza dei cristalli di 5-FU (diffattogramma mostrato in fig. 4);
- l'analisi termogravimetrica -TG- al fine di determinare le perdite di peso in

corrispondenza della temperatura di decomposizione (rilevabile con l'analisi calorimetrica differenziale-*DSC*) relative all' eventuale presenza di 5-FU nelle matrici mesoporose impregnate;

- l'analisi di adsorbimento di N_2 al fine di valutare la dimensione dei pori e la superficie specifica dei materiali mesoporosi a seguito del processo di impregnazione;
- analisi spettrofotometrica UV-VIS, attraverso la quale è stato possibile determinare la quantità di farmaco incorporata.

Uno dei campioni è stato, inoltre, sottoposto a spettrofotometria IR per verificare l'integrità del farmaco all'interno della matrice mesoporosa.

Analisi diffrattometrica: i campioni **MCM-41₁₆** e **MCM-41₁₂**, anche dopo i diversi metodi di impregnazione, hanno evidenziato la riflessione d_{100} (mostrata in fig. 3 a per il campione MCM-41₁₆₋₂) confermando la persistenza dell'ordine a seguito dei trattamenti di loading. Attraverso il metodo 2 di loading non è stata evidenziata la presenza dei picchi relativi al 5-FU cristallino (diffrattogramma riportato in fig. 3 b)

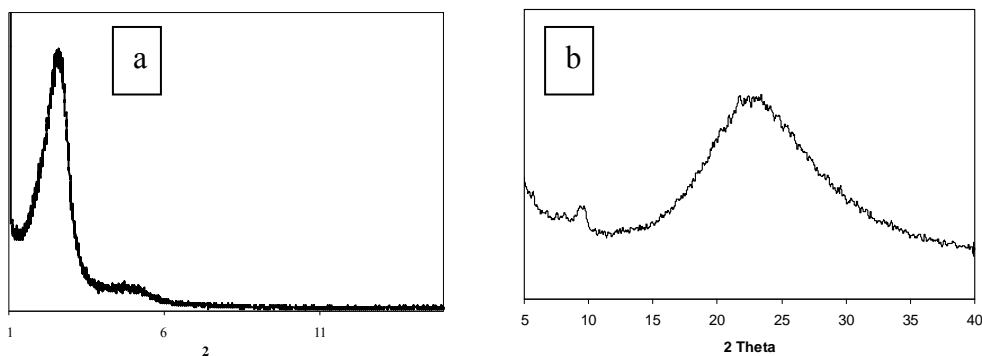


Fig. 3. Diffrattogramma del campione MCM-41₁₆₋₂: (a): nell'intervallo compreso tra 1 e 15 2θ ; nell'intervallo compreso tra 5 e 40 2θ

I picchi dovuti al farmaco, il cui diffrattogramma è mostrato in fig. 4, sono stati riscontrati invece nei campioni impregnati sia col metodo 1 (fig.5 a) che col metodo 3 (fig. 5 b) a dimostrazione della presenza del farmaco sotto forma di cristalli.

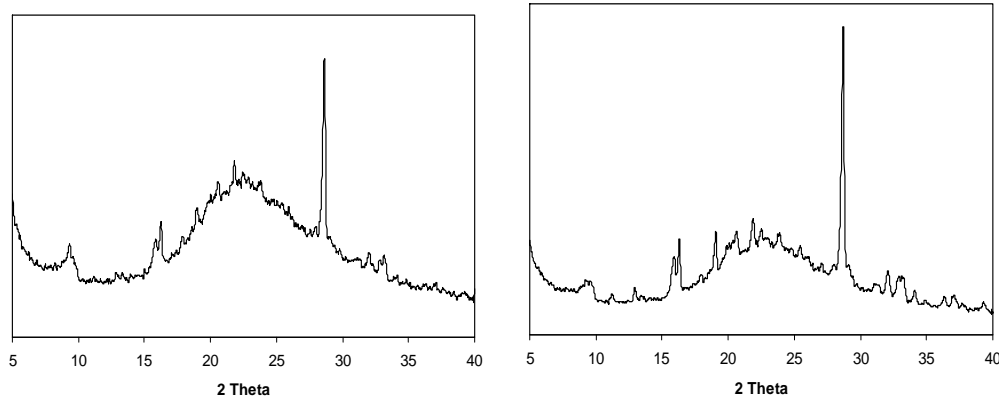


Fig. 5. Diffattogramma del campione MCM-41₁₆₋₁ Fig. 6. Diffattogramma del campione MCM-41₁₆₋₃

Inoltre, a seguito di tali trattamenti di impregnazione, i materiali hanno mostrato una diminuzione dell'intensità della riflessione a basso angolo, soprattutto per i campioni che hanno subito il trattamento di loading 1 (diffattogrammi non mostrati). La presenza di una maggiore quantità di farmaco nei pori ha reso il sistema più eterogeneo abbassando il grado di ordine del sistema poroso.

Per quanto riguarda i campioni **MCM-41₁₀**, sono stati ottenuti risultati differenti dai campioni precedenti. Tutti i campioni hanno mostrato degli spettri di diffrazione dei raggi X caratterizzati da riflessioni a 2° di 2θ tipiche di un materiale solo parzialmente ordinato. In tutti i campioni sono stati riscontrati i picchi di diffrazione del 5-FU, indipendentemente dal metodo di impregnazione utilizzato.

Per quanto riguarda i campioni **MCM-41₈**, sono stati riscontrati i picchi di diffrazione del 5-fluorouracile, indipendentemente dal metodo di impregnazione utilizzato (come per il campione **MCM-41₁₀**); il campione impregnato attraverso il metodo 1 ha mostrato uno spettro di diffrazione dei raggi X caratterizzato da riflessioni a 2° di 2θ tipiche di un materiale solo parzialmente ordinato; i campioni impregnati con i metodi 2 e 3 hanno mantenuto la riflessione d_{100} .

Dai risultati di questa prima indagine, effettuata per verificare lo stato della struttura dei materiali mesoporosi dopo l'impregnazione, è emerso quanto segue: il metodo 1 di impregnazione (rapporto farmaco/matrice pari a 1/1, quindi con concentrazione di farmaco elevata), tende ad indebolire la struttura dei campioni e ne diminuisce l'ordine più di quanto non succeda ai campioni impregnati attraverso i metodi 2 e 3. Per cui

un metodo di impregnazione blando e ripetuto è utile al fine di mantenere e preservare la struttura ordinata dei materiali sintetizzati.

L'ordine mesoporoso diminuisce nel campione **MCM-41₁₀** anche con i metodi 2 e 3 di impregnazione; ciò può essere spiegato osservando che il valore dello spessore delle pareti di questo campione è risultato inferiore rispetto agli altri campioni (Tabella 2), indice quindi di una struttura meno stabile rispetto agli altri campioni e che risente del trattamento di impregnazione in maggiore peso rispetto agli altri campioni.

Inoltre, la presenza di 5-FU cristallino nei campioni a pori più piccoli mostrata da tutti i metodi di impregnazione, e l'assenza di questi picchi nei campioni con i pori più grandi impregnati attraverso il metodo 2, suggerisce una relazione tra il diametro dei pori e il processo di impregnazione.

Analisi termogravimetrica e calorimetrica differenziale: l'analisi DSC del 5-FU cristallino ha rilevato una temperatura di decomposizione del farmaco alla temperatura di 282°C. Questo valore è stato confrontato con i dati riportati in letteratura¹⁹².

In quasi tutte le curve DSC dei campioni impregnati di farmaco, eccetto quelle relative ai campioni impregnati con il metodo 2, è stato rilevato il picco endotermico relativo al processo di decomposizione del farmaco.

L'intensità del picco è risultata aumentare in maniera inversamente proporzionale al diametro dei pori dei campioni, per raggiungere la massima intensità nel campione con il diametro più piccolo (MCM-41₈) impregnato con il metodo 3.

Le curve TG di tutti i campioni impregnati hanno evidenziato una perdita di peso nell'intervallo di temperatura compresa tra 200 e 600°C. Anche in questo caso si è riscontrata una perdita in peso modesta nei campioni impregnati con il metodo 2 e massima nei campioni impregnati con il metodo 3, soprattutto nel campione con il diametro più piccolo.

È stata calcolata per tutti i campioni la perdita in peso nell'intervallo di decomposizione del 5-FU. Tali quantità sono state poi determinate con accuratezza successivamente, mediante la tecnica della spettrofotometria UV-VIS.

Analisi porosimetrica: sono state condotte le analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto su tutti i campioni. In Tab. 3 sono riportati i valori dei volumi di azoto adsorbito per tutti i campioni prima e dopo le diverse procedure di impregnazioni.

Tabella 3

<i>Metodo di impregnazione e rapporto matrice/farmaco</i>	MCM-41 ₁₆ V. poroso (cm ³ /g)	MCM-41 ₁₂ V. poroso (cm ³ /g)	MCM-41 ₁₀ V. poroso (cm ³ /g)	MCM-41 ₈ V. poroso (cm ³ /g)
Campione calcinato	0,95	0,58	0,38	0,20
METODO 1 (1/1)	0,08	0,11	0,07	0,08
METODO 2 (1/2)	0,29	0,34	0,21	0,14
METODO 3 (1/2) (reimpregnazione)	0,23	0,27	0,12	0,06

Come si vede dai dati riportati in Tab. 3, tutti i campioni impregnati con il metodo 3 hanno esibito un volume poroso minore rispetto ai campioni impregnati con il metodo 1 di impregnazione. Ciò dimostra che attraverso l'impregnazione con il metodo 3 entra nei pori una minore quantità di farmaco, nonostante la quantità di farmaco messa a contatto è maggiore. È da notare che la differenza dei volumi porosi in relazione al metodo di impregnazione usato, è maggiore nei campioni a diametro più grande (**MCM-41₁₆** e **MCM-41₁₂**) rispetto ai campioni che hanno un diametro più piccolo, dove la differenza tra i volumi porosi è risultata trascurabile, indipendentemente dal metodo di impregnazione usato. I risultati ottenuti dalle analisi porosimetriche sono in contrasto con le informazioni dedotte dalle precedenti indagini, dalle quali risultava evidente che era il metodo 3 a garantire un migliore loading.

È da ipotizzare che in tutti i campioni parte del farmaco sia stato adsorbito anche sulla superficie esterna della matrice oltre che nei pori, il che può essere valutato attraverso un'analisi quantitativa di tutto il farmaco presente nei campioni.

Spettrofotometria UV-VIS: Le misure di spettrofotometria UV-VIS sui diversi campioni impregnati sono state eseguite al fine di valutare la quantità di farmaco in essi presenti (assorbita e impregnata nei pori). Per determinare tale quantità, le matrici impregnate sono state poste in contatto con un solvente che abbia un'ottima affinità per il farmaco. È lecito così assumere che, una volta dispersa la matrice impregnata nel mezzo disperdente, tutto il farmaco sia passato in soluzione ed essere così determinato

quantitativamente.

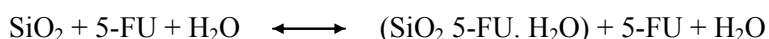
I valori del rapporto *mg di 5-FU/g di matrice* ricavati per le diverse matrici esaminate sono riportate in Tab. 4:

Tabella 4

<i>Modalità di impregnazione</i>	<i>CAMPIONI</i>			
	<i>C-16</i> (<i>mg_{farmaco}/g_{matrice}</i>)	<i>C-12</i> (<i>mg_{farmaco}/g_{matrice}</i>)	<i>C-10</i> (<i>mg_{farmaco}/g_{matrice}</i>)	<i>C-8</i> (<i>mg_{farmaco}/g_{matrice}</i>)
Metodo 1 (F/M=1/1)	238,0	200,4	350,0	326,6
Metodo 2 (F/M=1/2)	33,3	27,7	65	156,0
Metodo 3 Reimpregnazione (F/M=1/2)	420,0	270,8	340,5	740

I valori ottenuti sono in buon accordo con quelli ottenuti attraverso le valutazioni termogravimetriche. È risultato infatti che i campioni reimpregnati hanno adsorbito la maggiore quantità di farmaco. Ciò può trovare giustificazione ammettendo che il primo processo di impregnazione vada a formare, all'interno dei pori, un sottile strato di farmaco che funge da germe di cristallizzazione nella seconda impregnazione. La quantità di farmaco adsorbita inoltre, aumenta con il diminuire del diametro dei pori.

I pori di dimensione minore meglio si adattano alle piccole dimensioni del farmaco. Per quanto riguarda i campioni impregnati con il metodo 1 (F/M = 1/1), probabilmente la quantità di farmaco adsorbita non raggiunge gli alti valori ottenuti attraverso il processo di reimpregnazione (nella maggior parte dei casi) in quanto viene raggiunto subito l'equilibrio chimico:



Il campione MCM-41₁₆₋₃ è stato sottoposto a spettrofotometria FT-IR prima (Fig. 7) e dopo (Fig. 8) il processo di impregnazione secondo il metodo 3. I due diffrattogrammi ottenuti sono stati confrontati con quello del 5-FU riportato in Fig. 6. Mediante queste analisi si è inteso verificare l'integrità del farmaco all'interno della matrice in

seguito al trattamento di impregnazione. Le analisi sono state condotte con uno spettrofotometro FT-IR Bruker IFS-28 con una risoluzione di 2 cm^{-1} e su una pastiglia preparata con KBr anidro.

Nello spettro FT-IR del campione MCM-41₁₆₋₃ (Fig. 8) sono evidenti le due bande alle frequenze pari a 1680 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} relative ai moti di stretching C=O del 5-FU. Tali bande, ovviamente, non sono presenti nel campione calcinato (Fig. 7).

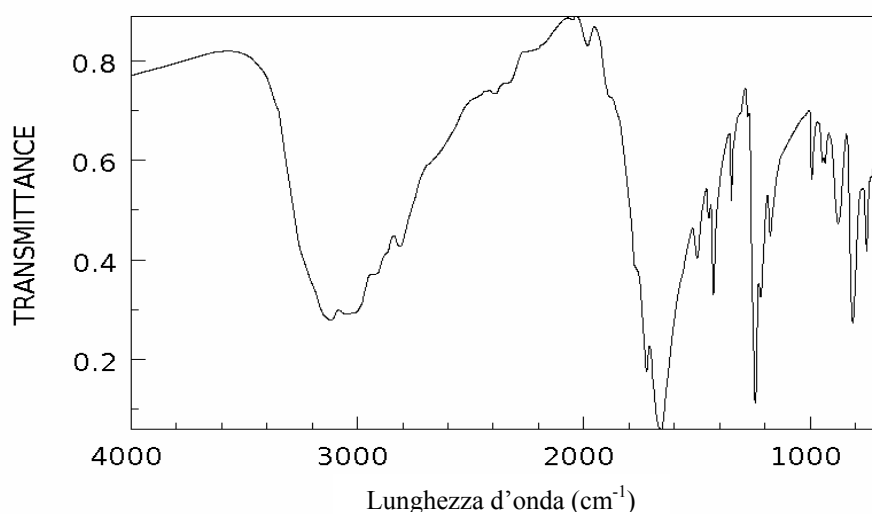


Fig. 6. Spettro IR del 5-Fluoruracile

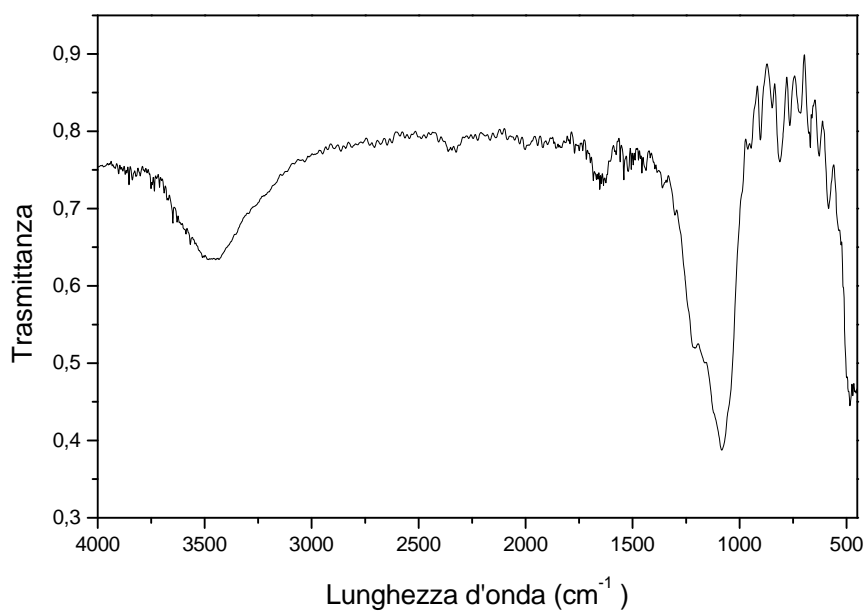


Fig. 7. Spettro IR del campione MCM-41₁₆ calcinato

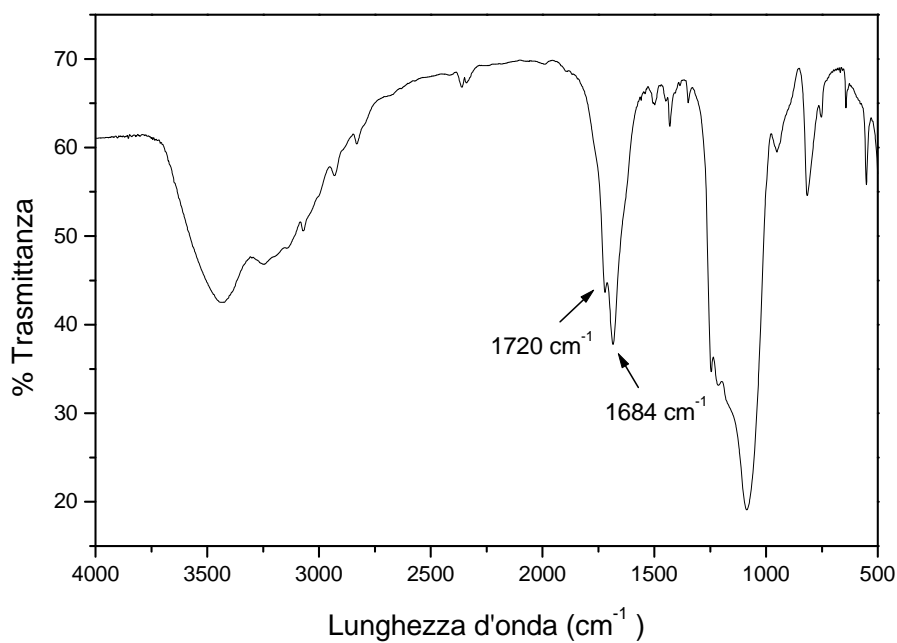


Fig. 8. Spettro IR del campione MCM-41₁₆₋₃

7.1.5 Studi di rilascio *in vitro*

Determinata l'effettiva quantità del farmaco nei materiali mesoporosi si è proceduto a simulare il percorso compiuto dal sistema supporto-farmaco nell'organismo attraverso la via di somministrazione orale riproducendo "*in vitro*" i fluidi fisiologici attraversati dal DDS dopo tale somministrazione.

In via preliminare è stato valutato il profilo di rilascio del principio attivo dalla matrice riproducendo "*in vitro*" il fluido fisiologico dello stomaco.

Le matrici impregnate sono state così disperse in una soluzione di HCl (0,1 N, pH=1) in agitazione magnetica e alla temperatura di 37°C (USP XXII-United States Pharmacopea-; drug-release test). Al fine di valutare i profili di rilascio nel sistema simulante il fluido gastrico, sono stati effettuati prelievi in intervalli di tempo entro le due ore (è lecito assumere che un DDS assunto per via orale non permanga nello stomaco per periodi superiori alle due ore). Ciascun prelievo è stato analizzato al fine di quantificare la concentrazione di farmaco rilasciato dal DDS al momento del prelievo.

Tale valutazione è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica UV/VIS, previa costruzione di rette di taratura. Tutte le matrici impregnate, sono state sottoposte agli studi di rilascio.

Di seguito sono riportate le tabelle (Tab. 5-8) con i valori percentuali di 5-FU rilasciati da ogni campione e nei diversi intervalli di tempo.

Tabella 5. Percentuali di 5-FU rilasciati in HCl dai materiali impregnati MCM-41₁₆

<i>Tempo</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₆₋₁</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₆₋₂</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₆₋₃</i>
15 minuti	92	83	91
1 ora	94	87	95
2 ore	95	90	96

Tabella 6. Percentuali di 5-FU rilasciati in HCl dai materiali impregnati MCM-41₁₂

<i>Tempo</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₂₋₁</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₂₋₂</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₂₋₃</i>
15 minuti	90	73	75
1 ora	95	74	76
2 ore	96	77	83

Tabella 7. Percentuali di 5-FU rilasciati in HCl dai materiali impregnati MCM-41₁₀

<i>Tempo</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₀₋₁</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₀₋₂</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₁₀₋₃</i>
15 minuti	70	57	68
1 ora	82	63	79
2 ore	85	81	82

Tabella 8. Percentuali di 5-FU rilasciati in HCl dai materiali impregnati MCM-41₈

<i>Tempo</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₈₋₁</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₈₋₂</i>	<i>% di 5-FU rilasciato dal campione MCM-41₈₋₃</i>
15 minuti	79	57	69
1 ora	84	64	76
2 ore	91	70	82

Dai valori riportati nelle tabelle, emerge che il farmaco è stato ceduto entro le due ore facilmente a pH acido e quasi completamente per la maggiorparte dei campioni analizzati. Inoltre, i campioni MCM-41₁₆ ed MCM-41₁₀ indipendentemente dal tipo di impregnazione, hanno rilasciato dopo 2 ore la stessa quantità di farmaco. Nei campioni MCM-41₁₂ ed MCM-41₈, la quantità di farmaco rilasciata è risultata invece dipendente dal tipo di impregnazione; per tali campioni si è proseguito lo studio delle cinetiche

di rilascio nel sistema simulante il fluido intestinale.

Le matrici impregnate sono state così disperse in una soluzione di HCl (0,1 N, pH=1) in agitazione magnetica e alla temperatura di 37°C per due ore (è lecito assumere che il DDS assunto per via orale non permanga nello stomaco per periodi superiori alle due ore); dopo due ore il pH è stato variato (USP XXII-United States Pharmacopea; drug-release test pH change method;) e, al fine di valutare i profili di rilascio nel sistema simulante il fluido intestinale, sono stati effettuati prelievi fino a quando il valore della concentrazione di farmaco non si è mantenuto costante. Nelle figure 9 a, b, sono mostrate le cinetiche di rilascio cumulative per i campioni MCM-41₁₂ e MCM-41₈ e confrontate tra di loro attraverso il metodo di impregnazione utilizzato.

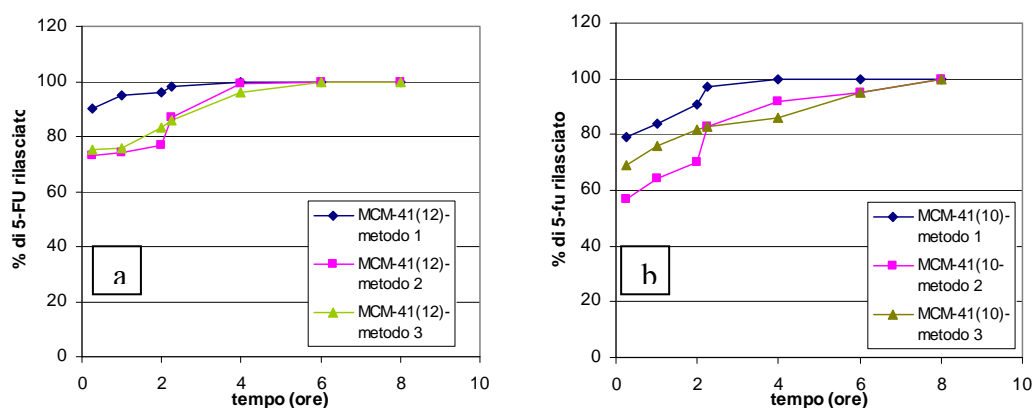


Figura 9. Profili di rilascio cumulativi (ambienti fisiologici simulanti il fluido gastrico ed intestinale) del 5-FU (a): dai campioni MCM-41₁₂ e (b) MCM-41₁₀ impregnati con i diversi metodi di impregnazione.

In entrambi i casi, le matrici impregnate con il metodo 2 (F/M=1/2) e con il metodo 3 (doppia reimpregnazione e rapporto farmaco/matrice -F/M=1/2) hanno mostrato una cinetica di rilascio più lenta rispetto ai campioni impregnati con il metodo 1. A parità di metodo di impregnazione utilizzato, i campioni aventi un diametro di pori più piccolo MCM-41₁₀ hanno mostrato un controllo migliore sulla cinetica di rilascio del 5-FU.

7.1.6 Conclusioni

L'utilizzo dei differenti processi di impregnazione utilizzati suggerisce, in particolare, di eseguire studi più approfonditi volti a determinare con maggiore accuratezza quanto il processo di *loading* dei materiali esaminati possa essere migliorato intervenendo sui seguenti parametri:

- *dimensione del poro dei materiali*: dai risultati ottenuti è emerso che il diametro del poro è stato un parametro essenziale nel rendere più efficace il processo di impregnazione; in particolare è emerso che il processo è più efficace al diminuire delle dimensioni dei pori della matrice e più vicino alle dimensioni molecolari del farmaco;
- *tecnica di impregnazione*: è risultato che un processo di impregnazione blando e ripetuto, in cui il materiale mesoporoso è messo a contatto con piccole quantità di farmaco in più passaggi, garantisce un trattamento di impregnazione più efficace rispetto all'impregnazione ottenuta esponendo il materiale mesoporoso ad elevate quantità di farmaco disciolte in un'unica soluzione. Occorre dunque stabilire un protocollo di impregnazione in cui siano determinate le quantità di farmaco e il numero di iterazioni che forniscono la migliore impregnazione.

Non è stato ottenuto un controllo ottimale sulla cinetica di rilascio del farmaco, anche se è stato mostrato un miglioramento man mano che diminuisce il diametro del poro ed in relazione al tipo di metodo di impregnazione utilizzato.

Al fine di potenziare il controllo sulla cinetica di rilascio da parte di tali materiali verso il 5-Fluoruracile, sono state eseguite altre strategie:

- *coating dei materiali mesoporosi*: materiali mesoporosi sono stati rivestiti utilizzando polimeri organici *swellable*, come i derivati dell'acido metacrilico. In questo caso, la silice ha costituito un reservoir per il farmaco, ed il network polimerico ha la funzione di controllare la cinetica di rilascio. Solo un piccolo effetto di iniziale "first burst" è stato rilevato dal campione rivestito, in confronto alla silice non rivestita, probabilmente dovuto alla presenza di farmaco cristallizzato, non legato e depositato sulla superficie della silice e non completamente rivestita dal polimero^{14 a, b}

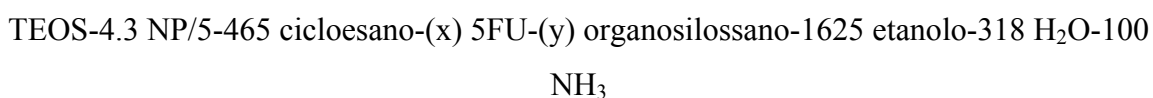
- *dalla tecnologia di imprint molecolare ai sistemi in self-assembled in presenza del farmaco stesso*: la tecnologia di imprinting molecolare offre una tecnica per preparare materiali le cui cavità sono capaci di riconoscere determinate molecole in termini di forma, dimensione e funzionalità chimica. Allo scopo di ottenere un riconoscimento altamente selettivo nei riguardi della molecola, questa stessa è incorporata durante la sintesi del materiale facendola agire da template. Al termine della sintesi la molecola è estratta e lascia così la sua impronta. A questo punto il materiale è capace di riconoscere ed intrappolare selettivamente un template di forma e dimensione simile. I materiali sol-gel di silice hanno una combinazione di proprietà che difficilmente può essere ottenuta da altri materiali come il controllo sullo spessore, sulla porosità, e sull'area superficiale. Inoltre le modeste temperature di sintesi, la facilità di preparazione e la rimozione del template attraverso tecniche di attivazione termica, rappresentano ulteriori vantaggi nel superare i limiti dei MIP (Molecular Imprint Polymer) organici. Sebbene la tecnica dell'imprint molecolare è ancora ad uno stadio incipiente nei riguardi dell'applicazione nel campo dei "drug delivery", la tecnologia ha un enorme potenziale per creare "sistemi" soddisfacenti. Un primo esempio di questo tipo di DDS è stato riportato ¹⁹³ in parallelo ai nostri preliminari risultati. In particolare, abbiamo proposto un approccio alternativo in cui il sistema di drug delivery, costituito dal network di silice e funzionalizzato con gruppi organici, è generato in un processo di self-assembling in presenza del farmaco stesso. Inoltre abbiamo introdotto la variante della sintesi in microemulsione per superare i limiti del controllo della dimensione della particelle che non si riesce ad ottenere semplicemente usando il processo sol-gel.

Lo scopo della nostra indagine è stata dunque quella di:

- investigare l'abilità del farmaco a fungere da agente direzionante, attraverso la scelta di appropriate condizioni di sintesi e agente funzionalizzante;
- studiare l'influenza (interazione chimica, tempo di aggiunta) dei gruppi organici funzionalizzanti nella modalità di rilascio del farmaco;
- caratterizzare le cinetiche di rilascio.

7.2 Sintesi di materiali ibridi self-assembled

Le particelle di silice sono state preparate miscelando, sotto continua agitazione e a temperatura ambiente, una soluzione contenente 0.5 g (0.07 moli) di Nonilfenileteterepoliossietilene(5) -NP/5- (tensioattivo neutro appartenente alla famiglia dei poliossietileni) in 13.5 ml (7.45 moli) di cicloesano, con una soluzione contenente il 5-fluorouracile-5/FU-, l'eventuale funzionalizzante, 25ml (26 moli) di etanolo, 1.5 ml (5.1) di acqua e 37 ml di soluzione ammoniacale 2M (1.6 moli di ammoniaca in etanolo). Dopo circa trenta minuti è stata aggiunta come fonte di silice il tetraetossisilano-TEOS (3.6 ml). La composizione molare del gel di sintesi è la seguente:



La miscela è stata lasciata in agitazione per circa 12 ore a temperatura ambiente. La risultante dispersione è stata separata mediante centrifugazione ed infine asciugata a temperatura ambiente per circa 24 ore. Con questa procedura di sintesi è stato ottenuto circa 1 grammo di materiale. Nei primi campioni sintetizzati l'aggiunta dell'organosilossano è avvenuta contemporaneamente al TEOS. Come verificato successivamente, promuovere l'interazione funzionalizzante-farmaco prima della trasformazione sol-gel, si è rivelato fondamentale per ottenere materiali con le caratteristiche desiderate. In tabella 9 sono riportate le percentuali di *imprintante* (5-FU) e di organosilossano per tutti i campioni sintetizzati. Sono espresse come percentuali molari rispetto al TEOS aggiunto (5-20%). Sono stati sintetizzati anche campioni in assenza di molecola funzionalizzante al fine di studiare l'efficacia dell'interazione tra il farmaco ed i vari gruppi funzionali.

Sono stati utilizzati organosilossani aventi i seguenti gruppi funzionali terminali: trietossipropildiidroimidazolo (IPTES), l'acetossipropiltrimetossisilano (ATS), il carbossietilsilanetriolo (CTES), l'amminopropiltrirossilano (APTES), il trimetossipropiltrimetilammoniocloruro (TMACPTES).

Il 5-fluorouracile è una pirimidina fluorurata nella quale sia i gruppi carbonilici che i gruppi amminici secondari si prestano molto bene alla formazione di legami ad

idrogeno multipli ¹⁹⁴. In figura 9 sono riportate le strutture del 5-FU e dei vari organosilossani utilizzati.

Tabella 9. Composizione molare dei campioni sintetizzati

<i>SAMPLE</i>	<i>5-FU (X)</i>	<i>ORGANOSILOSSANI (Y)</i>				
		<i>TMACPTES</i>	<i>APTES</i>	<i>IPTES</i>	<i>ATS</i>	<i>CTES</i>
1	0.2					
2		0.05				
3			0.05			
4				0.05		
5	0.1		0.05			
6	0.05 +		0.05			
7	0.05		0.1			
8	0.05		0.05			
9	0.1	0.05				
10	0.1 +	0.05				
11	0.05	0.05				
12	0.05	0.1				
13¹	0.1 +	0.05				
14	0.1			0.2		
15	0.1			0.2		
16	0.1				0.2	
17	0.1				0.2	
18	0.05					0.05

¹ Il campione 13, uguale al campione 10, subisce un processo di lavaggio, per allontanare l'eventuale farmaco in eccesso

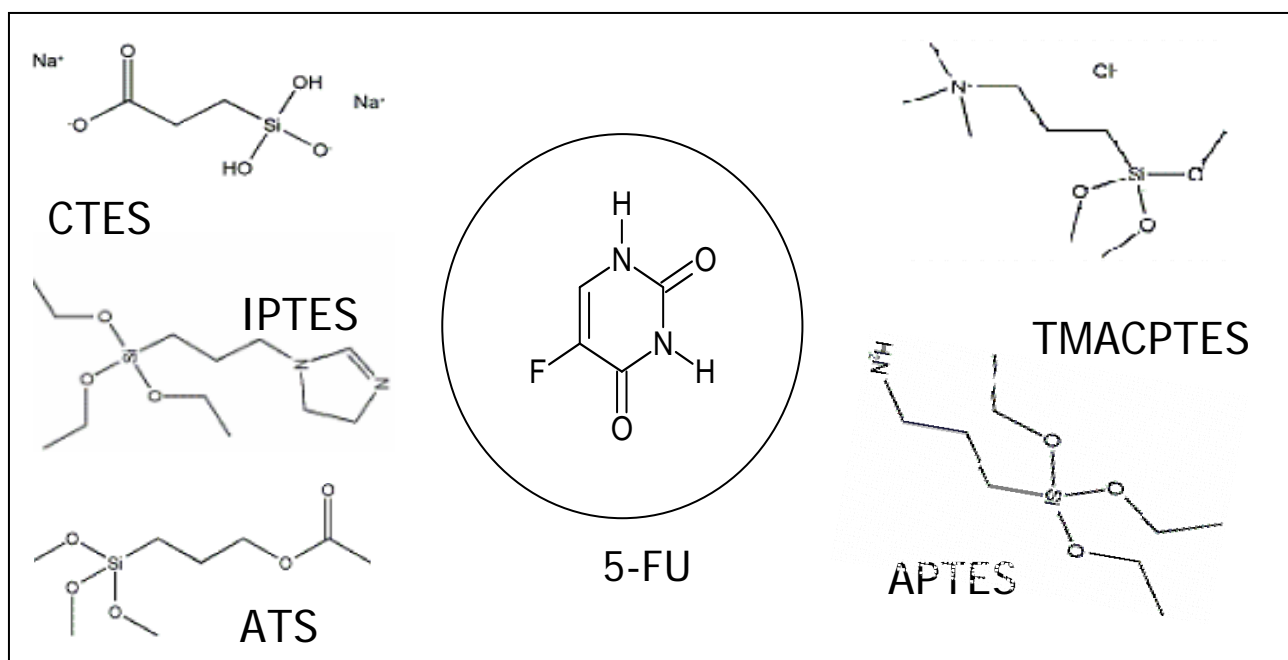


Fig. 9. Struttura degli organosilani utilizzati e del 5-FU

7.2.1 Caratterizzazione dei campioni sintetizzati

Le caratteristiche chimico-fisiche e strutturali dei campioni sintetizzati, quali area superficiale e volume poroso, sono state determinate misurando le isoterme di adsorbimento-desorbimento di azoto (vedi pag. 73 per le informazioni relative allo strumento utilizzato). La procedura di degasaggio è durata circa 10 ore. L'area superficiale BET è stata calcolata nell'intervallo di P/P_0 0.06÷0.2 e la dimensione del diametro dei pori è stata calcolata tramite il metodo BJH. I valori di tali proprietà sono riportati in tabella 10.

Tabella 10

Campione	S_{BET} (m^2/g^{-1})	Volume dei pori $P/P_0=0.06-0.2$ (cm^3/g)
TMACPTES	105	0.5
IPTES	13	0.02
APTES	25	0.04
CTES	-	-
ATS	-	-

Nella figura 10 sono mostrate alcune delle isoterme di adsorbimento ottenute: i campioni sintetizzati con i funzionalizzanti APTES CTES ed IPTES hanno mostrato un'isoterma di Tipo II, caratteristica di particelle ad alta densità e basso volume poroso.

Il campione sintetizzato in presenza del funzionalizzante TMACPTES ha mostrato invece un'isoterma simile a quelle tipiche dei G-xerogels¹⁸⁷.

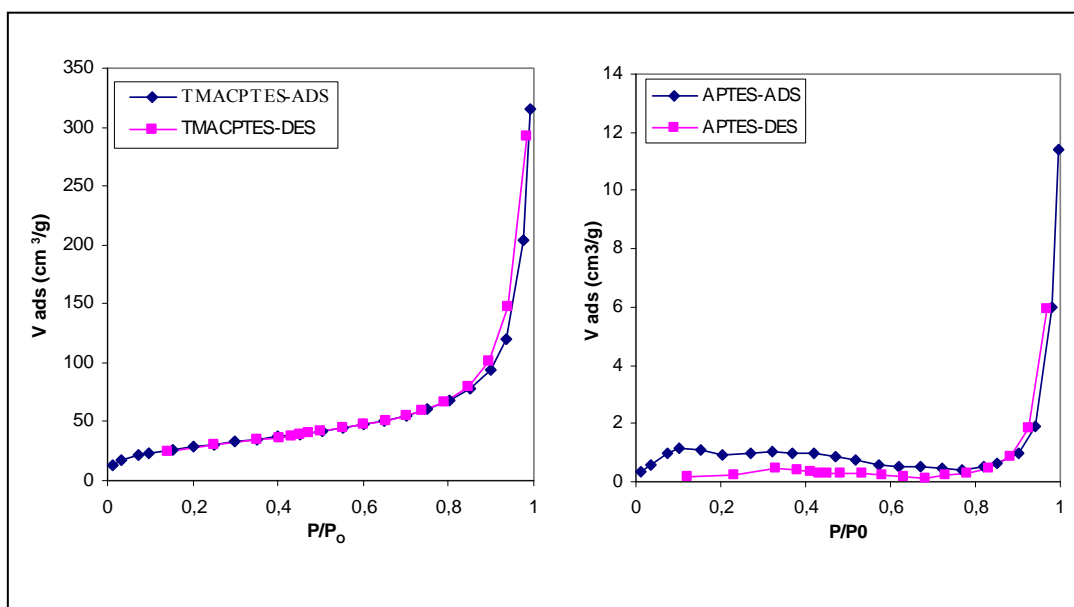


Fig. 10. Isotherme di adsorbimento-desorbimento di azoto

Come previsto, gli organosilossani aggiunti alla miscela di sintesi hanno influenzato le caratteristiche superficiali e strutturali dei campioni ottenuti.

L'efficacia del processo di *self-assembly* in presenza del 5-FU su ciascuno dei campioni esaminati è stata valutata al fine di comprendere l'abilità del farmaco a fungere come agente direzionante in funzione dell'interazione con i gruppi organici funzionalizzanti utilizzati. Tale valutazione è stata effettuata seguendo:

- l'analisi diffrattometrica dei raggi X nell'intervallo di scansione $5^\circ \leq 2\theta \leq 40^\circ$, in modo da rilevare la eventuale presenza dei cristalli di 5-FU;
- l'analisi termogravimetrica *-TG-* per determinare sia la percentuale di organico presente nel campione, sia le perdite di peso in corrispondenza della temperatura di decomposizione (rilevabile con l'analisi calorimetrica differenziale *-DSC-*) relativa all'eventuale presenza di 5-FU;
- cromatografia HPLC: l'analisi è stata effettuata su aliquote di campioni poste in contatto con soluzioni acquose a diversi valori di pH al fine di valutare una sua possibile influenza sulla cinetica di rilascio. E' stato già evidenziato, infatti, che il 5-FU è un farmaco capace di instaurare legami ad idrogeno multipli, per cui è interessante valutare l'influenza del pH sulle interazioni farmaco-funzionalizzante.

Analisi diffrattometrica

In alcuni campioni esaminati sono stati riscontrati i picchi di diffrazione del 5-FU (in figura 11 è mostrato come esempio il campione 5). E' conosciuta in letteratura la facilità con cui questo farmaco precipita negli ambienti di reazione. Il problema è stato risolto modificando i rapporti molari e aumentando il tempo di solubilizzazione del 5-FU nella soluzione ammoniacale prima di aggiungere gli altri componenti della sintesi.

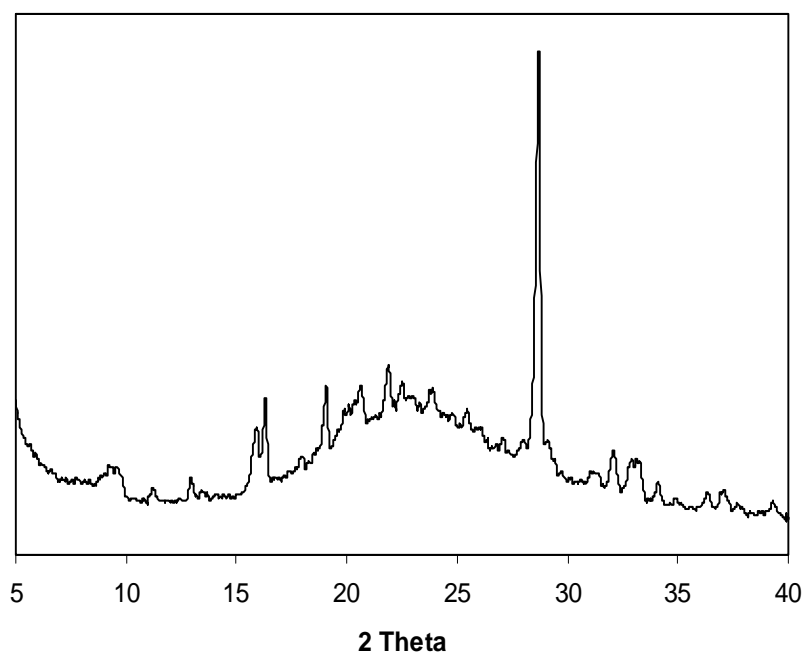


Fig. 11. Diffrattogramma del campione 5

Analisi termogravimetrica e calorimetria differenziale: l'analisi DSC del 5-FU ha rilevato una temperatura di decomposizione pari a 282°C. In quasi tutte le curve DSC dei campioni sintetizzati è stato rilevato il picco endotermico relativo al processo di decomposizione del farmaco. Le curve TG di tutti i campioni hanno evidenziato una perdita di peso nell'intervallo di temperatura compresa tra 200÷600°C. In questo intervallo di temperatura si ha la decomposizione del 5-FU, ma anche delle sostanze organiche funzionalizzanti. I valori di perdita in peso sono riportate in tabella 11.

Tabella 11

Sample	% peso perso (150÷400 °C)
3	6
5=3+5-FU	15
2	11
9=2+5-FU	21

In figura 12 viene riportata come esempio l'analisi TGA di un campione in assenza (2) ed in presenza (9) di 5-FU.

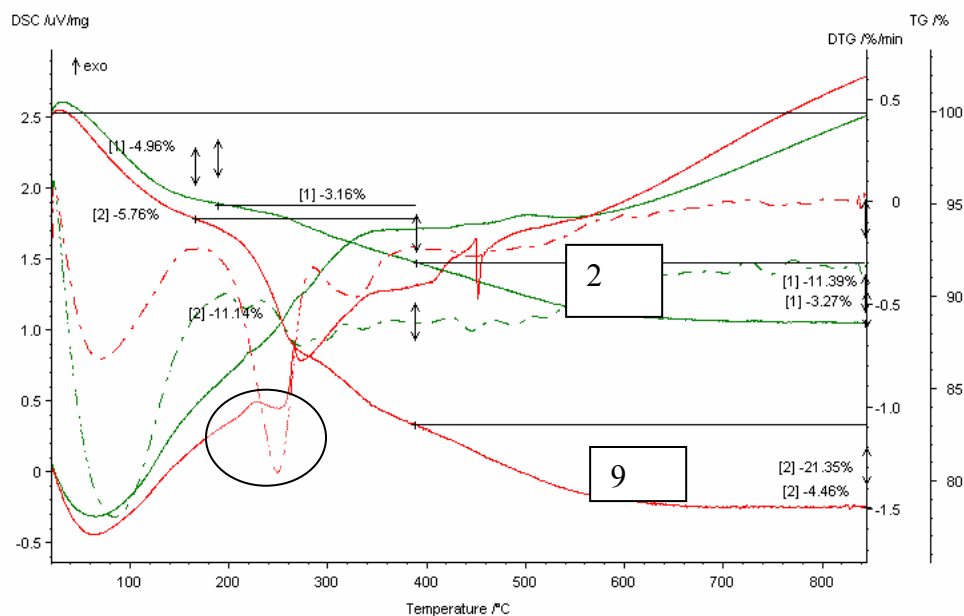


Figura 12. Analisi TGA-DSC dei campioni 2-9

Cromatografia HPLC: misure di HPLC sui diversi campioni sono state eseguite al fine di valutare la quantità di farmaco in essi impregnata. Per determinare tale quantità, le matrici cariche di farmaco sono state poste in contatto, come precedentemente descritto, con soluzioni acquose a diversi pH (1, 8) al fine di verificare un eventuale dipendenza tra l'ambiente acquoso ed il sistema farmaco-matrice. È lecito assumere che, una volta dispersa la matrice impregnata nel mezzo acquoso, tutto il farmaco possa passare in soluzione ed essere così determinato quantitativamente.

Le matrici impregnate sono state disperse nelle soluzioni acquose sotto agitazione magnetica alla temperatura di 40°C (temperatura alla quale aumenta la solubilità del 5-FU). Da tali dispersioni sono stati effettuati prelievi a diversi intervalli di tempo fino ad ottenere concentrazioni costanti del farmaco nelle soluzioni. Ciascun prelievo è stato analizzato per stabilire la concentrazione di farmaco "libero" nella dispersione, ossia la

quantità di farmaco rilasciato dal DDS al momento del prelievo. I valori del rapporto *mg di 5-FU/g di matrice* ricavati per i diversi campioni esaminati sono riportate in Tabella 12:

Tabella 12. mg di 5-FU/g di matrice rilasciati a differenti valori di pH

<i>CAMPIONE</i>	<i>5-FU loaded (mg)</i>	<i>pH 1 5-FU rilasciato (mg /g matrice)</i>	<i>pH 8 5-FU rilasciato (mg /g matrice)</i>
1	210	190 (4 ore)	190 (4 ore)
5	210	136 (24 ore)	126 (24 ore)
6	105	12 (24 ore)	14 (24 ore)
7	105	8 (24 ore)	11 (24 ore)
8	105	14 (24 ore)	15 (24 ore)
9	210	190 (8 ore)	201 (24 ore)
10	210	40 (8 ore)	54 (96ore)
11	105	18 (7 ore)	23 (96 ore)
12	105	13 (10 ore)	20 (24 ore)
13	210	31 (7 ore)	29 (12 ore)
14	210	65 (12 ore)	
15	210	70 (12 ore)	
16	210	80 (12 ore)	
17	210	130 (12 ore)	
18	100	30 (24 ore)	

Quando la matrice contenente il farmaco viene a contatto con il mezzo acquoso la molecola attiva diffonde. Come si può notare, il campione non funzioanlizzato (campione 1) rilascia la quantità di farmaco in un tempo più breve rispetto ad ogni altro campione funzionalizzato. Per quanto riguarda i campioni funzionalizzati, essi rilasciano la stessa quantità di farmaco, indipendentemente dall'ambiente acquoso in cui è investigato. I campioni sintetizzati in presenza dell'APTES hanno mostrato una

cinetica di rilascio più veloce nell ambiente acido probabilmente dovuto alla capacità di protonazione migliore del sistema farmaco-funzionalizzante in tali valori di pH.

Allo scopo di dimostrare che il comportamento di rilascio del 5-FU dal campione avviene per diffusione, questi risultati sono stati verificati tramite il modello di Higuchi (vedi paragrafo 4.1). In accordo al modello, ci si aspetta che, se il rilascio del farmaco dai campioni è basato su un meccanismo di diffusione, si ottenga un andamento di tipo lineare. I profili delle quantità di farmaco rilasciato nell'ambiente a pH 1, contro la radice quadrata del tempo nelle figure 13-16, suggeriscono che il rilascio di 5-FU dalla maggior parte dei campioni impregnati, è consistente con un meccanismo di diffusione che segue la I legge di Fick.

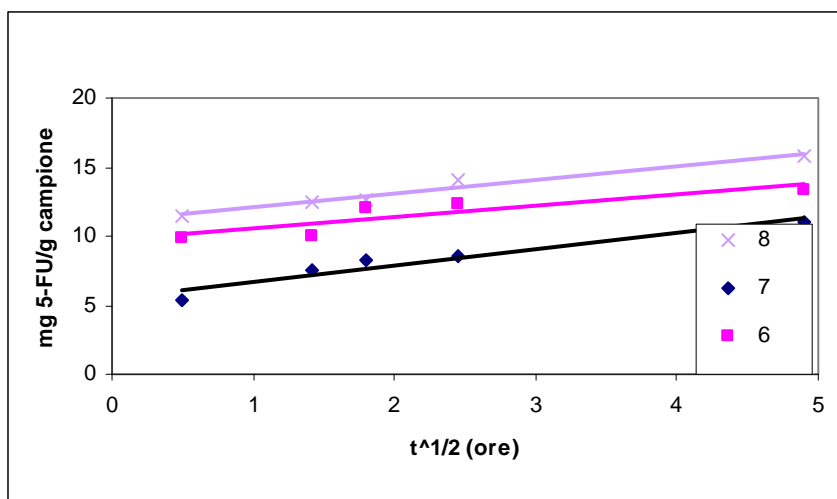


Figura 13. Rilascio cumulativo di 5-FU in funzione di differenti moli di APTES (vedi Tabella 9);

In particolare, i profili riportati in figura 13 evidenziano come il rilascio dei differenti campioni siano sempre consistenti con un meccanismo di diffusione fickiano, ma fortemente dipendente dalle quantità molarie di APTES utilizzato: maggiore è la quantità di APTES presente nella miscela, più lenta risulta essere la diffusione. Un altro aspetto fondamentale emerso dall'analisi delle matrici sintetizzate è costituito dall'ordine di aggiunta del funzionalizzante. A parità di moli di funzionalizzante aggiunte, sono

state ottenute cinetiche di diffusione più lente facendo interagire il farmaco e la molecola di organosilossano contenente il gruppo funzionalizzante prima di aggiungere gli altri componenti della miscela di sintesi (campione 6 in figura 13).

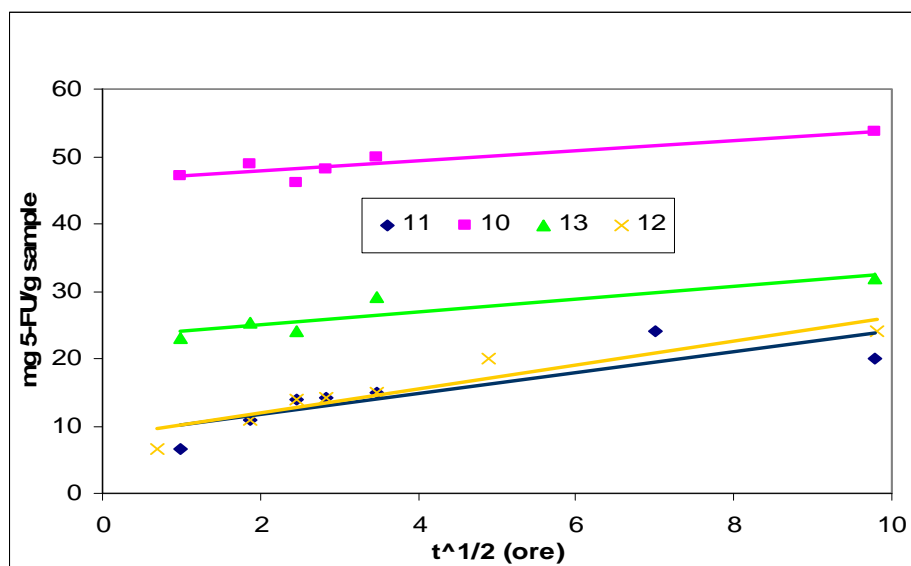


Figura 14. Rilascio cumulativo di 5-FU in funzione di differenti moli di TMACPTES (vedi Tabella 9)

Risultati differenti sono stati ottenuti dai campioni preparati con il funzionalizzante TMACPTES. I profili riportati in figura 14, dimostrano come il rilascio dei differenti campioni siano sempre consistente con un meccanismo di diffusione fickiano, ma indipendente questa volta dalle quantità molari del funzionalizzante utilizzato. Probabilmente non ci sono interazioni efficaci tra la velocità di diffusione maggiore per il campione 10 è esclusivamente legata alla quantità maggiore di 5-FU in esso presente. Si noti che il campione 12 (figura 14) mostra una pendenza differente dagli altri campioni. In tale campione il funzionalizzante è stato fatto interagire con il farmaco prima degli altri componenti della miscela di sintesi.

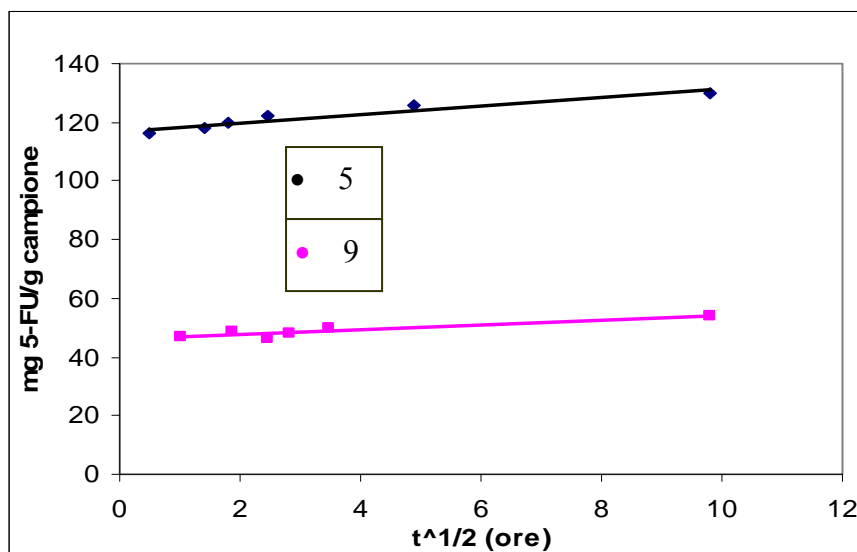


Figura 15. Confronti di capacità di loading di 5-FU dal campione 5 e dal campione 9

Dall'analisi della figura 15 si evince che l'APTES è un funzionalizzante capace di instaurare, durante la sintesi, migliori interazioni con il 5-FU rispetto ai campioni sintetizzati in presenza del funzionalizzante TMAPTES.

Per quanto riguarda i funzionalizzanti IPTES e AT, sono stati ottenuti differenti risultati. I profili riportati in figura 16 dimostra che il rilascio del campione 16 è sempre consistente con un meccanismo di diffusione fickiano, ma non per il campione 15. In tale campione le probabili interazioni del 5-FU con il funzionalizzante sembrano essere di natura differenti, tali da consentire una modalità di rilascio diversa..

Per questi campioni è stato indagato il solo parametro relativo alla modalità di aggiunta del funzionalizzante. Come si evince dalla figura 16, i campioni per i quali questo effetto è più marcato sono quelli sintetizzati in presenza del funzionalizzante AT, mentre minore influenza è riscontrata nei campioni sintetizzati con l'IPTES. Ulteriori analisi devono essere effettuate per comprendere che tipo di interazioni si instaura tra il farmaco ed il gruppo funzionalizzante.

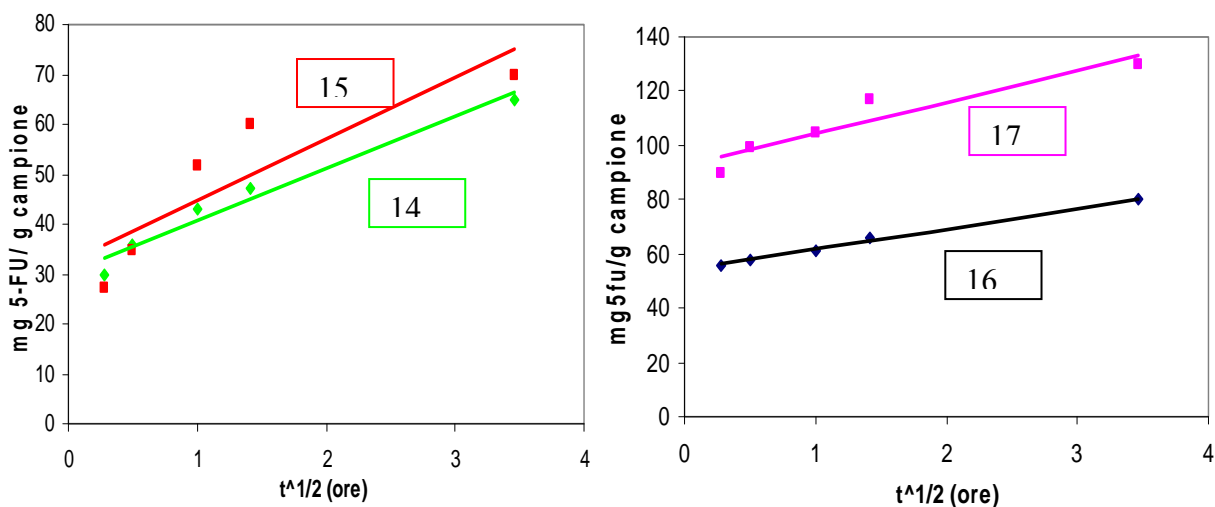


Figura 16. Rilascio di 5-FU da campioni sintetizzati con uguali rapporti molari di IPTES e AT (vedi Tabella 9)

7.2.2 Studi di rilascio *in vitro* dai materiali “self-assembled” sintetizzati

Determinata l'effettiva incorporazione del farmaco nei campioni sintetizzati si è proceduti a simulare il percorso compiuto dal sistema supporto-farmaco nell'organismo attraverso la via di somministrazione orale. Pertanto il profilo di rilascio del principio attivo dalla matrice è stato valutato riproducendo “*in vitro*” gli ambienti fisiologici dello stomaco e dell'intestino. In particolare, il comportamento della matrice nello stomaco è stato mimato disperdendola in una soluzione di HCl 0.1N (pH=1; 100 r.p.m.; 37° T) - metodo riportato nella USP XXII (United States, Pharmacopea; drug-release test)-, mentre è stata utilizzata una soluzione tampone a pH 6.8 per simulare l'ambiente intestinale.

Sono state preparate differenti aliquote, ognuna di 25 mg, dello stesso campione, e ciascuna di esse è stata dispersa in 10 ml di HCl 0.1N. Le tre dispersioni sono state utilizzate per determinare la quantità di 5-FU rilasciato dalla matrice a diversi intervalli di tempo dalla loro preparazione. In particolare, sono stati effettuati prelievi da 15 minuti a 2 ore. Non sono stati eseguiti prelievi per tempi superiori alle due ore in quanto si è ritenuto lecito assumere che, la matrice impregnata assunta per via orale, non possa

permanere per più di tale tempo nel tratto gastrico. Poiché nessuno dei campioni impregnati ha rilasciato tutto il farmaco dopo due ore di contatto con la soluzione a pH 1 si è ritenuto significativo studiare il rilascio di 5-FU dalle matrici impregnate in un ambiente che riproduce quello intestinale.

Si è proceduto quindi a valutare il rilascio dei campioni impregnati in una soluzione a pH 1. Sono state preparate varie aliquote, ognuna di 25 mg, dello stesso campione, e ciascuna di esse è stata dispersa in 10 ml di HCl 0.1N. Dopo le 2 ore si è provveduto a variare il pH al valore di 6,8. Sono stati effettuati prelievi dopo 15 minuti dalla sua preparazione, fino a circa dodici ore. Tali prelievi così eseguiti sono stati sufficienti a valutare il rilascio nell'intestino assumendo che una matrice impregnata, assunta per via orale, non permanga per più di 12 ore nel tratto intestinale. Ciascun prelievo è stato analizzato per stabilire la concentrazione di farmaco "libero" nella dispersione, ossia la quantità di farmaco rilasciato dal DDS al momento del prelievo. Tale valutazione viene effettuata mediante analisi cromatografica HPLC, previa costruzione di rette di taratura.

Nei grafici seguenti è riportata la percentuale di 5-FU rilasciata da alcuni campioni in funzione del tempo.

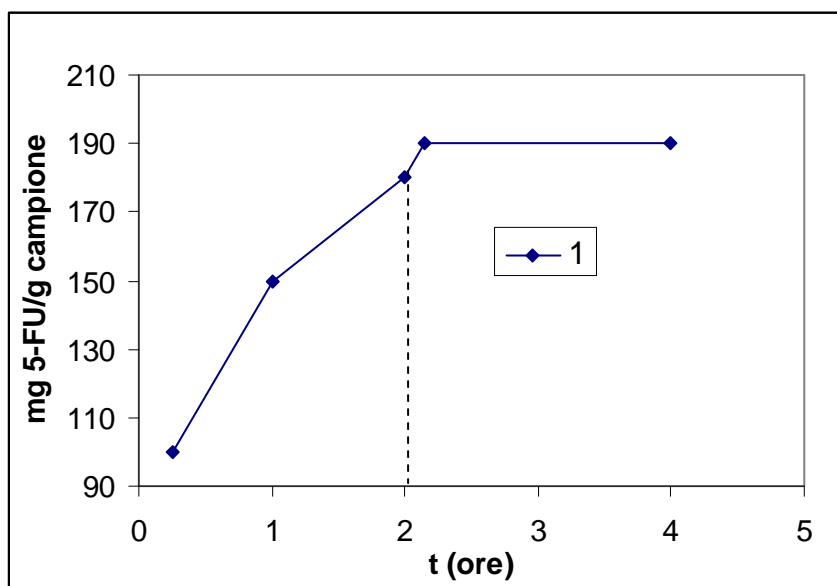


Figura 11. Rilascio di 5-FU dal campione non funzionalizzato

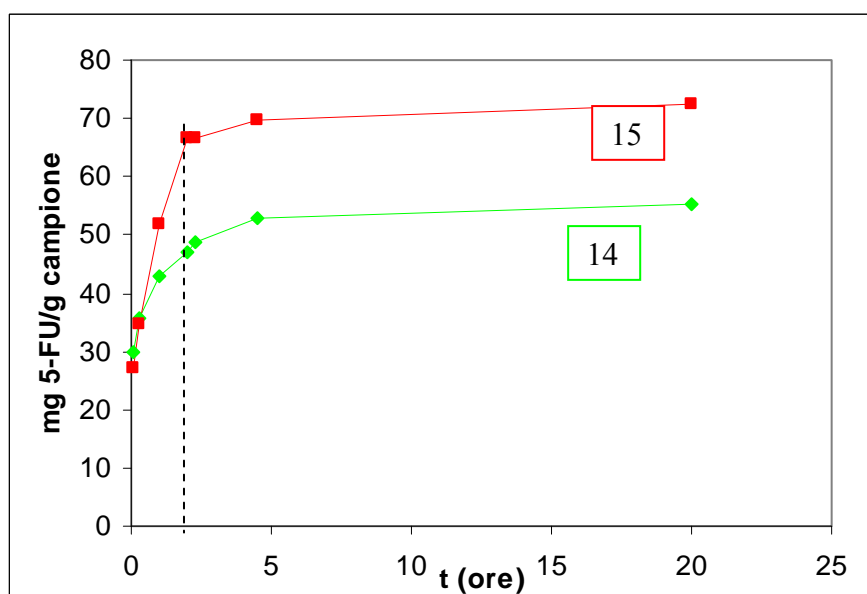


Figura 17. Rilascio di 5-FU dai campioni funzionalizzati con IPTES

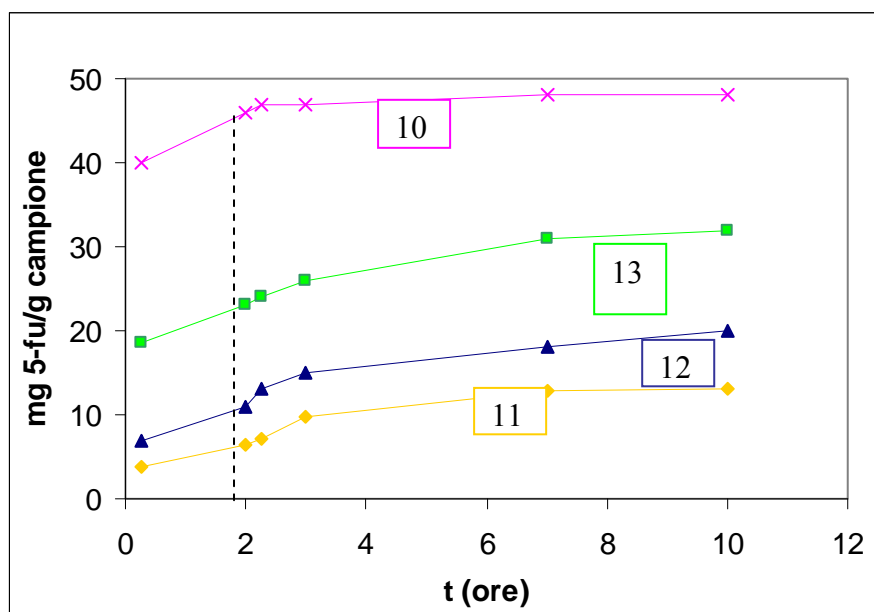


Figura 18. Rilascio di 5-FU dai campioni funzionalizzati con TMACPTES

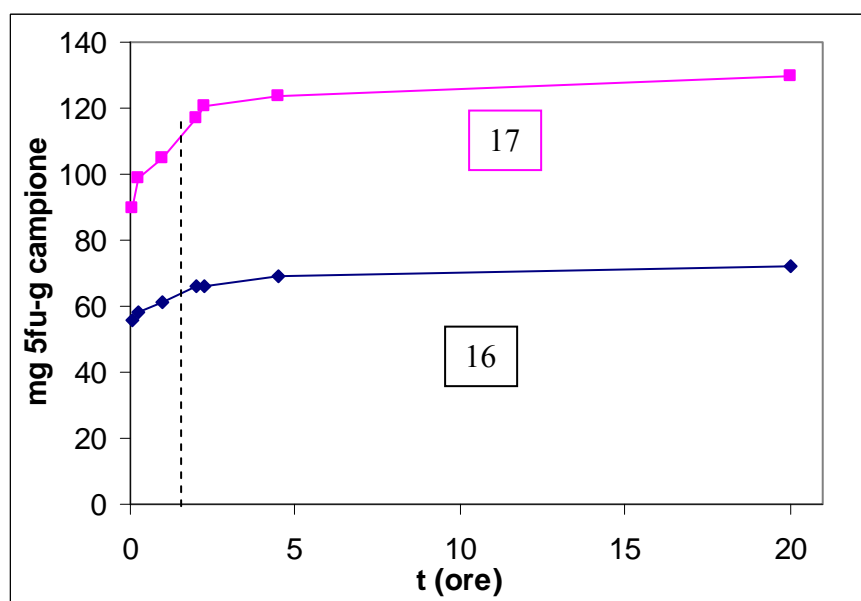


Figura 19. Rilascio di 5-FU dai campioni funzionalizzati con IPTES

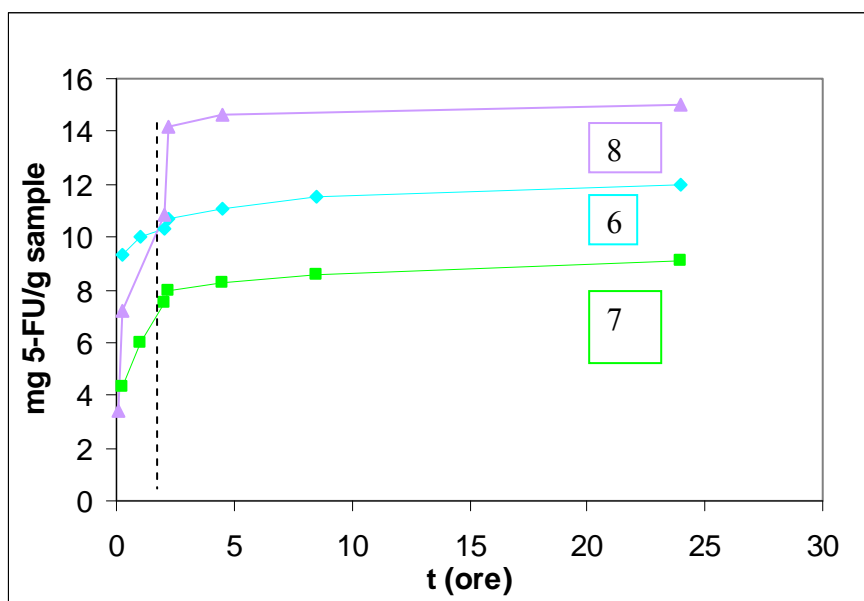


Figura 20. Rilascio di 5-FU dai campioni funzionalizzati con APTES

7.2.3 Conclusioni

Dai preliminari risultati ottenuti, è emerso che la tecnologia di sintesi in “self-assembled” in presenza del farmaco ed in microemulsione potrebbe offrire una valida alternativa nella produzione di materiali versatili per la realizzazione di un drug-delivery efficiente. Numerosi sono i parametri che si possono variare per ottenere i sistemi desiderati.

L’analisi delle indagini eseguite suggerisce di eseguire una più approfondita valutazione dei dati ottenuti volta a determinare con esattezza quanto la capacità di loading e di modalità di rilascio del farmaco dai materiali esaminati possa dipendere dai parametri di sintesi della microemulsione (pH, tipo e quantità di agente funzionalizzante) e da che tipo di materiale si è ottenuto (per esempio investigando la rigidità del sistema).

A tal fine, bisognerebbe approfondire le tecnologie di indagine sulle proprietà dei materiali sintetizzati.

L'attività sperimentale del 3° anno di dottorato ha riguardato due attività principali. Nella prima è stata effettuata la sintesi di materiali mesoporosi ibridi con differenti proprietà idrofobe/idrofiliche. Questa particolare esigenza è scaturita dalla possibilità di partecipare, nell'ultimo anno del corso di dottorato, al GALENOS Euro-PhD in "Advanced Drug Delivery" con l'obiettivo di effettuare una caratterizzazione chimico-fisica e biologica presso il Dipartimento di Biofarmaceutica e Tecnologie Farmaceutiche nell'Università del Saarland con sede a Saarbrücken (Germania).

Un'applicazione della silice mesoporosa come costituente di una formulazione farmaceutica richiede una attenta caratterizzazione per ciò che riguarda il comportamento del materiale in ambienti cellulari e quindi in soluzioni acquose.

Allo scopo di raggiungere questo obiettivo sono stati quindi sintetizzati materiali opportunamente funzionalizzati per conferire loro proprietà idrofile diverse da quelle tipiche della silice tal quale. È stata effettuata dunque una caratterizzazione chimico-fisica del tutto analoga a quella effettuata sui campioni preparati nei primi due anni di dottorato e, successivamente, una caratterizzazione in ambienti acquosi misurando parametri superficiali e morfologici quali idrofobicità, carica superficiale, dimensione e distribuzione delle dimensioni e forma delle particelle. Tutto ciò ha comportato nuove conoscenze sulle proprietà di alcuni materiali mesoporosi a base di silice modificati chimicamente in ambienti acquosi.

7.3 Sintesi di materiali mesoporosi modificati

I materiali funzionalizzati sono stati sintetizzati utilizzando il metodo di cocondensazione diretta mediante organoalcoossilani in condizioni basiche (pH 12), ed in presenza di tensioattivi cationici. È stata utilizzata la seguente composizione molare del gel di sintesi:

$(100-x/100)\text{TEOS}$ $(x/100)\text{organosilossano}$ 16.1 NH_4OH 0.24tensioattivo 128.7 H_2O

dove il TEOS indica il *tetraetilortosilicato*, il cetiltrimetilammonio (C16) bromuro

o il dodeciltrimetilammonio (C12) bromuro sono stati i tensioattivi utilizzati; il trimetossimetilsilano o il trietossipropilsilano o il trietossifenilsilano gli organosilossani utilizzati. Le strutture sono mostrate in figura 20

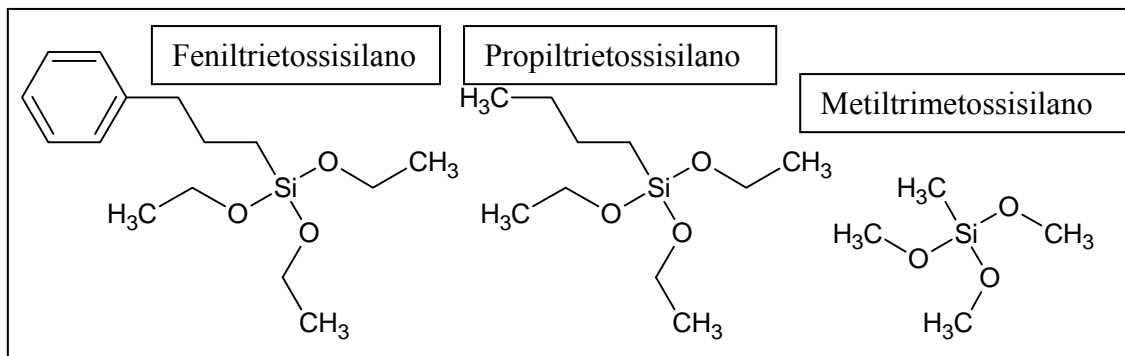


Figura 20. Strutture degli organosilossani utilizzati

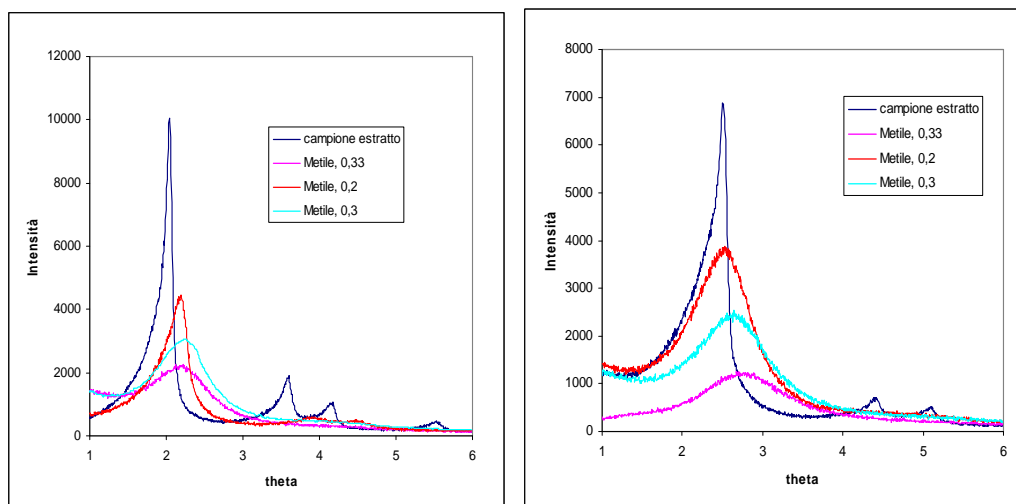
La quantità di organosilano (x) è stata fatta variare tra il 10 e il 33 % (la percentuale è espressa come percentuale di moli di TEOS). Inoltre sono stati sintetizzati i campioni privi di organosilossano come campioni di riferimento. La tipica procedura di sintesi è stata la seguente: una soluzione di tensioattivo (3.24 g, 8.88 mmoli) NH₄OH (10.26 g, 30 wt.%, 0.60 mol) e acqua distillata (87.6 g, 4.87 mol) sono stati miscelati a temperatura ambiente in un contenitore di PP chiuso ermeticamente. 37.5 mmol (7.7g) del precursore di silice, ottenuto da una miscela di TEOS e organosilossano sono stati addizionati a questa soluzione. La miscela è stata mantenuta in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente posta a reagire alla temperatura di 80 °C per 4 giorni (sintesi idrotermale). Il prodotto infine è stato filtrato, lavato ed asciugato a temperatura ambiente. Il tensioattivo è stato estratto dai materiali così sintetizzati miscelando 1.5 g di campione in una soluzione acida di HCl conc. (40g) in metanolo (800 g) e mantenendolo sotto leggera agitazione a 60 °C per 6 ore. Infine il prodotto è stato filtrato con un imbuto Buchner, lavato con metanolo ed asciugato a temperatura ambiente.

7.3.1 Caratterizzazione strutturale

Al fine di identificare la fase ottenuta, i campioni calcinati sono stati sottoposti ad **analisi diffrattometrica dei raggi X** utilizzando un diffrattometro Philips modello 1730/10 fornito di un goniometro verticale PW 1050/70 per la misura dell'angolo di diffrazione. I dati di diffrazione sono stati acquisiti ed elaborati da un PC Olivetti con microprocessore 80/286, contenente software applicativo per diffrattometria a raggi X su polveri della Ital Structures di Riva del Garda. I raggi X sono stati generati alimentando l'anticatodo di Cu con una corrente di 20 mA ed assicurando una differenza di potenziale di 40 KV tra anodo e catodo. L'analisi è stata condotta nell'intervallo $1^\circ \leq 2\theta \leq 6^\circ$ con una velocità di scansione di 0.005 °/s

Tutti i campioni sintetizzati appartengono alla famiglia dei materiali MCM-41. Presentano infatti la caratteristica riflessione a 2° circa (espressa in nm nella tabella 13).

Per molti di loro il diffrattogramma mostra le altre tipiche riflessioni per valori di 2θ compresi tra 2° e 5° (figure 21, 22). La presenza di più riflessioni ad alti valori di 2θ indica l'esistenza di un ordine a lungo raggio.



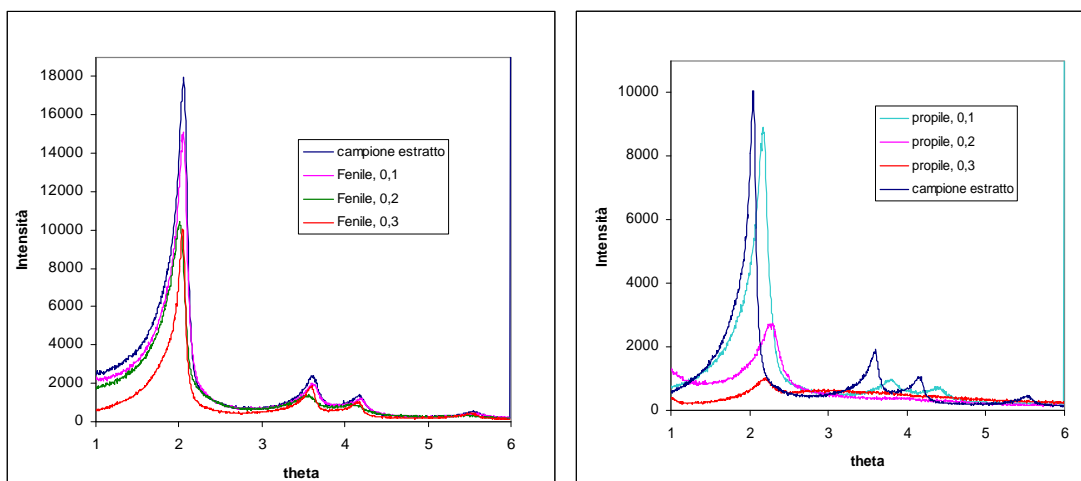


Figura 22. Diffratogrammi dei campioni ibridi sintetizzati. Ogni diffratogramma presenta il campione non modificato come riferimento (campione as made)

Tabella 13.

<i>Campione</i>	<i>Gruppo Funzionale, (X)</i>	<i>Distanza Inter-reticolare d_{100} (nm)</i>	<i>Distanza Inter-reticolare d_{200}(nm)</i>
C16	-	4.3	2.1
C16 – M20	Metile, 0,2	3.98	1.98
C16 – M30	Metile, 0,3	3.8	
C16 – M33	Metile, 0,33	3.8	
C16 – Ph10	Fenile, 0,1	4.	2.1
C16 – Ph20	Fenile, 0,2	4.1	
C16 – Ph30	Fenile, 0,3	4.4	2.1
C16 – P10	Propile, 0,1	4.0	2.0
C16 – P20	Propile, 0,2	3.84	
C16 – P30	Propile, 0,3	3.98	
C12	-	3.5	1.7
C12 – M20	Metile, 0,2	3.5	
C12 – M30	Metile, 0,3	3.4	
C12 – M33	Metile, 033	3.2	

I diffratogrammi mostrati in figura 21, così come i valori di d riportati in tabella 13,

danno prova che la presenza dell' organosilossano influenza fortemente il grado di ordine della struttura dei campioni sintetizzati. Infatti, solo i diffrattogrammi dei campioni metilderivati (Metile, 0,2) e propilderivati (Propile 0,1) evidenziano una ritenzione del loro grado di ordine mesoscopico dopo estrazione del tensioattivo, con una già evidente contrazione degli spazi interplanari rispetto ai campioni non funzionalizzati (campioni C16 e C12 in tabella 13).

Il valore dello spazio interplanare (d_{100}) ed il grado di ordine diminuiscono all'aumentare del contenuto di agente funzionalizzante aggiunto nella miscela di sintesi.

I campioni più ordinati sono stati ottenuti con il derivato fenilico, anche in presenza di alto contenuto di gruppo funzionalizzante; è presente infatti sia il picco (100) sia quelli relativi ai piani (110) e (200) a riflessioni più basse. Questo alto grado di ordine, simile a quello del materiale ottenuto in presenza del solo TEOS, potrebbe essere indotto da specifiche interazioni tra il gruppo fenilico e la catena idrofoba del tensioattivo, come già riportato in precedenti lavori ¹⁹⁵.

Tutti i campioni sintetizzati sono stati sottoposti ad **analisi termogravimetrica TGA e calorimetrica differenziale DSC** al fine di :

- verificare la presenza del gruppo funzionalizzante dopo il processo di estrazione;
- valutare l'efficacia del processo di estrazione del tensioattivo;
- determinare la quantità del gruppo funzionalizzante.

Lo strumento utilizzato per l'analisi termica dei campioni è l'analizzatore NETZSCH 409, il quale permette la registrazione simultanea delle curve TGA e DSC.

Le condizioni operative adottate sono state:

- *gas*: aria dinamica;
- *flusso d'aria*: 5 cc/min;
- *intervallo di temperatura*: 20-850 °C;
- *velocità di riscaldamento*: 10 °C min;
- *materiale del crogiolo*: platino;
- *peso dei campioni analizzati*: 7 ÷ 10 mg

Il confronto tra le curve TGA e DSC dei campioni funzionalizzati (fig. 23, 25, 26, 27) e non funzionalizzati (fig. 22, 24) prima e dopo il processo di estrazione ha evidenziato, nei primi, la presenza di picchi esotermici in intervalli di temperatura diversi dalla

temperatura di combustione del tensioattivo.

I diversi intervalli di temperatura sono in accordo con le differenti temperature di combustione alle quali avvengono le decomposizioni dei diversi gruppi funzionalizzanti utilizzati, mentre le differenti perdite in peso (tabella 14) sono in accordo con le diverse percentuali di organico incorporato nella silice.

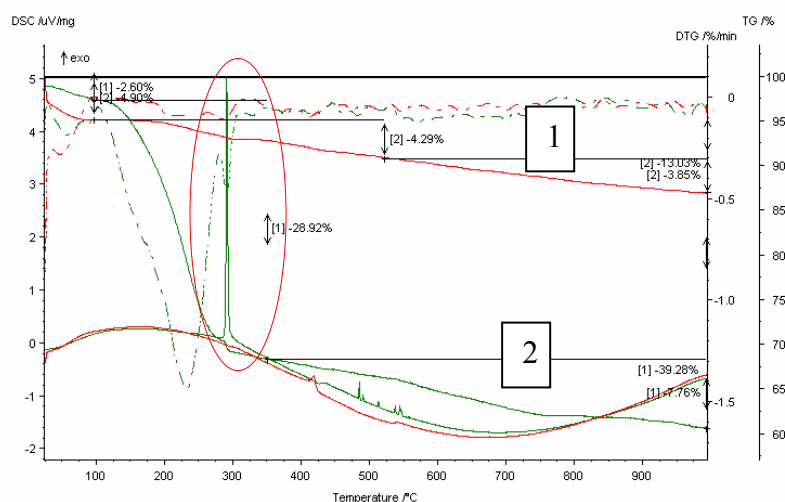


Figura 22. Curve TGA e DSC dei campione C12 non funzionalizzato prima (curva 1) e dopo (curva 2) il processo di estrazione

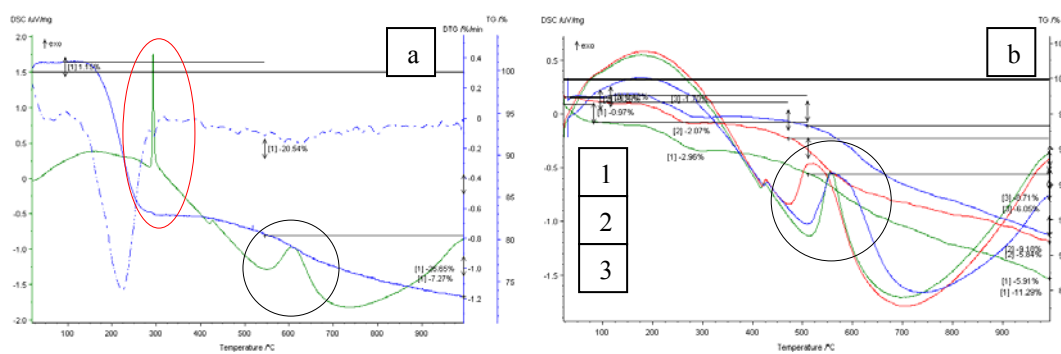


Figura 23. (a) TGA e DSC del campione C12 M30 prima del processo di estrazione; (b) TGA e DSC del campione C12 con differenti percentuali di metile: campione 1 (20%); 2 (30%), 3 (33%);

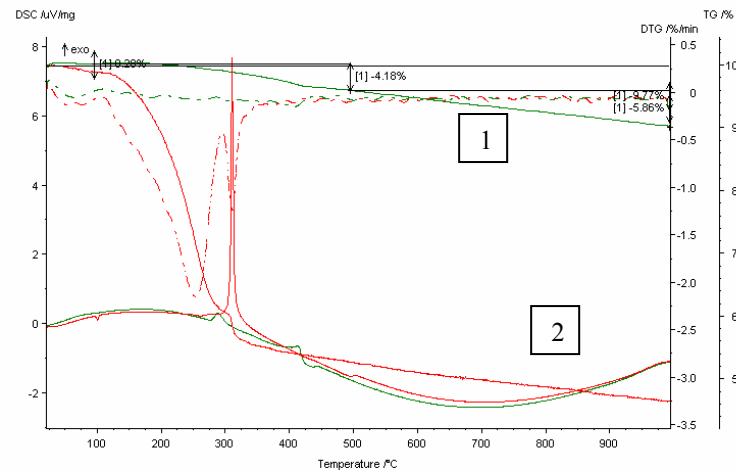


Figura 24. Curve TGA e DSC dei campione C16 non funzionalizzato prima (curva 1) e dopo (curva 2) il processo di estrazione

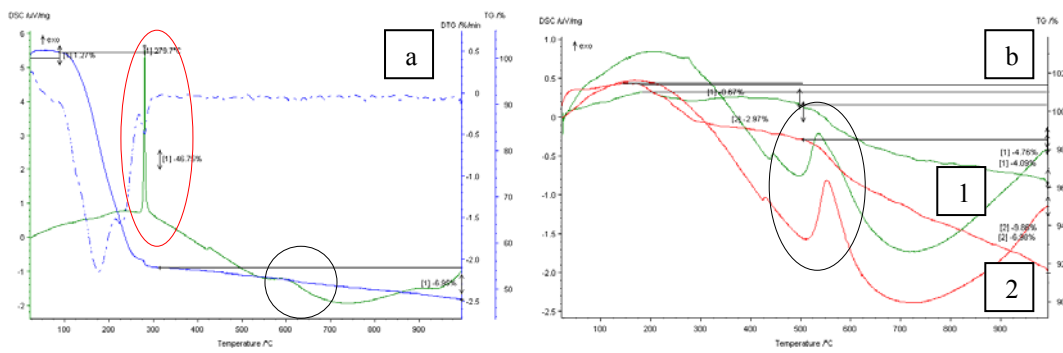


Figura 25. (a) TGA e DSC del campione C16 M30 prima del processo di estrazione; (b) TGA e DSC del campione C16 con differenti percentuali di metile: campione 1 (0,3); 2 (0,33)

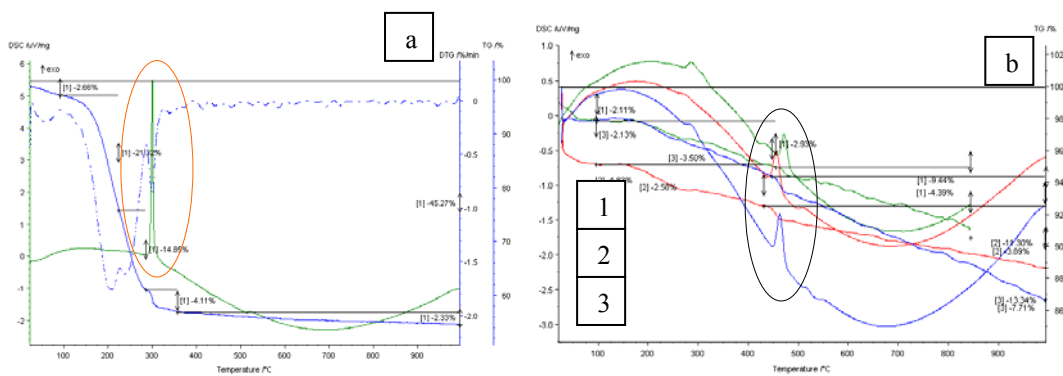


Figura 26 (a): TGA e DSC del campione C16Ph30 prima del processo di estrazione; (b): TGA e DSC del campione C16 con differenti percentuali di fenile: campione 1 (0,1); 2 (0,2); 3 (0,3).

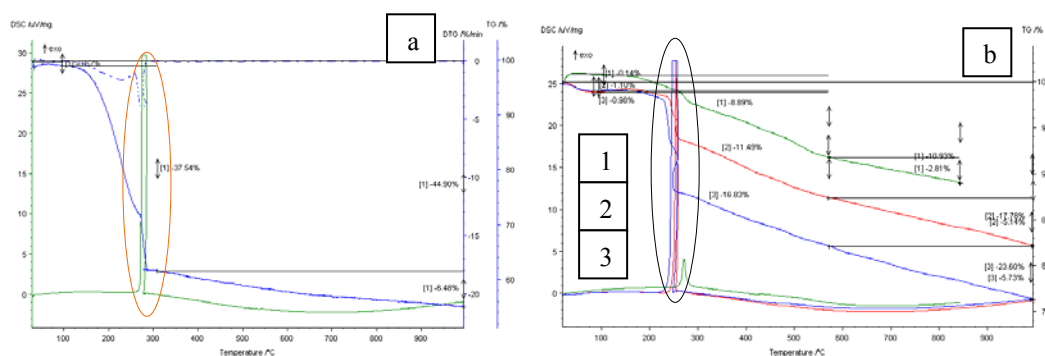


Figura 27: (a) TGA e DSC del campione C16 P 10 prima del processo di estrazione; (b) con differenti percentuali di propile : campione 1 (0,1); 2 (0,2), 3 (0,3);

Inoltre, come riportato nella tabella 14, il tensioattivo viene rimosso quantitativamente dopo un solo ciclo di estrazione con solvente. Sempre dall'analisi TGA è stato possibile calcolare la quantità di funzionalizzante presente nei campioni.

Tabella 14.

Campione	Gruppo Funzionale, (X)	Gruppo funzionale (%)	Tensioattivo (%)
C16	-	-	4.1
C16 – M20	Metile, 0,2	-	-
C16 – M30	Metile, 0,3	4.09	0.67
C16 – M33	Metile, 0,33	6.98	2.97
C16 – Ph10	Fenile, 0,1	4.39	2.93
C16 – Ph20	Fenile, 0,2	3.89	3.50
C16 – Ph30	Fenile, 0,3	7.71	2.58
C16 – P10	Propile, 0,1	8.89	-
C16 – P20	Propile, 0,2	11.49	-
C16 – P30	Propile, 0,3	16.83	-
C12	-	-	4.20
C12 – M20	Metile, 0,2	6.05	1.70
C12 – M30	Metile, 0,3	5.84	2.07
C12 – M33	Metile, 0,33	5.91	2.97

Le misure di adsorbimento in azoto sono state ottenute a 77K con un

analizzatore di adsorbimento volumetrico ASAP 2010 Micromeritics. Prima delle misure, i campioni erano degasati a temperature tra 100 °C e 350 °C in vacuum, nella porta di degasaggio dell'analizzatore, fino a che la pressione residua fosse uguale o sotto i 6 mm Hg.

La temperatura di degasaggio per i diversi campioni è stata scelta in accordo ai risultati della curva DSC, che mostrano diverse temperature di combustione a seconda del gruppo funzionalizzato usato. I campioni non funzionalizzati, ed i derivati metilici sono stati degasati alla temperatura classica di 350 °C per 5 ore circa, mentre temperature più basse sono state utilizzate per i derivati fenilici (200 °C) per 8 ore, e per i derivati propilici (100 °C) per 10 ore. I dati delle isoterme di adsorbimento sono utilizzati per valutare la superficie specifica, il diametro e la distribuzione dei pori e il volume poroso.

La superficie specifica BET è stata valutata in un intervallo di pressioni relative compreso tra 0.01 e 0.02, che è stato mostrato essere adatto per stimare l'area di superficie specifica di silice mesoporosa a pori piccoli¹⁹⁶. Il volume poroso è stato stimato dalla quantità di azoto adsorbito ad una pressione relativa pari a 0.99.

La distribuzione della dimensione dei pori è stata calcolata usando l'algoritmo BJH con la relazione esistente tra la pressione alla quale avviene la condensazione capillare e il diametro dei pori. I valori di superficie specifica, di diametro e volume dei pori riportati in tabella 15 sono in accordo con le valutazioni effettuate attraverso le precedenti analisi.

Nei grafici riportati nelle fig. 28-31 sono mostrate le isoterme di adsorbimento/desorbimento dei campioni funzionalizzati e confrontate con quelle ottenute dai campioni non modificati.

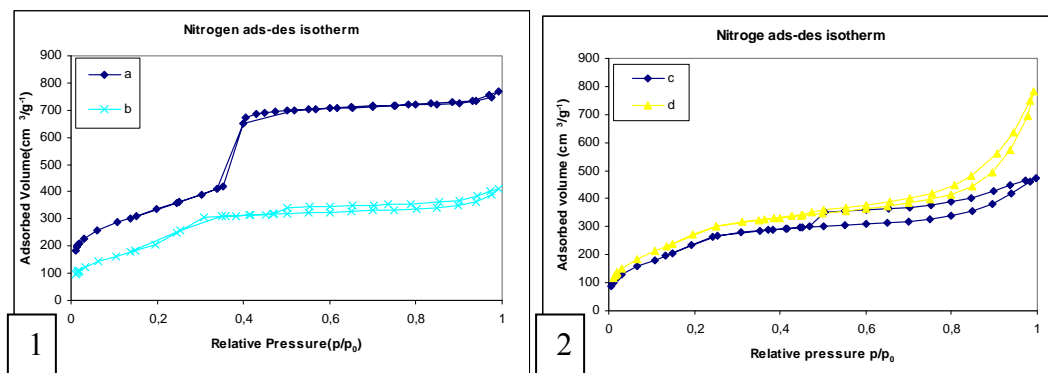


Figura 28. Isotherme di adsorbimento-desorbimento di N₂. (1): campione C16 (a), campione C16M20 (b); (2): campione C16M30 (d), campione C16M33 (c)

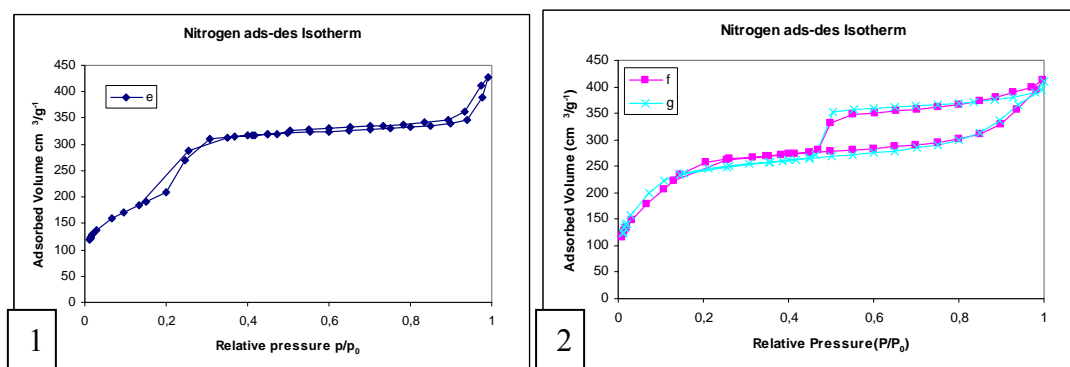


Figura 29. Isotherme di adsorbimento-desorbimento di N₂. (1): campione non funzionalizzato C12 (e); (2) campione C12M20 (f), campione C12M33 (g)

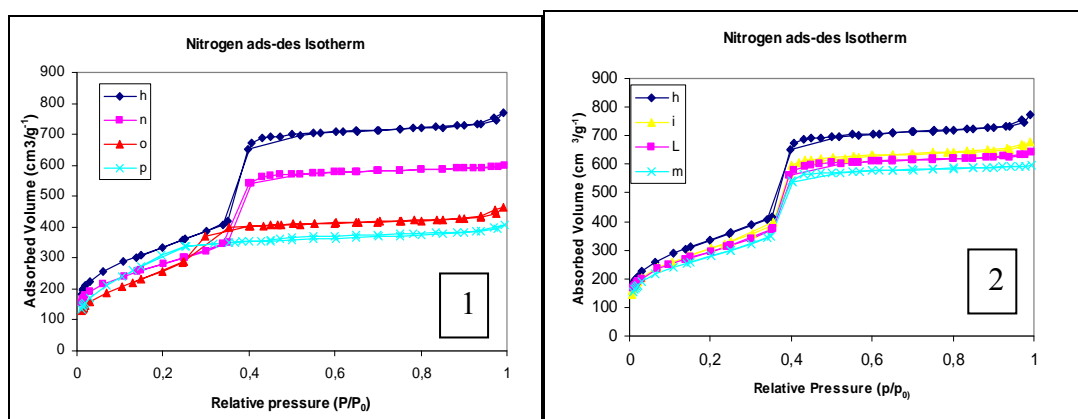


Figura 30. (1): Isotherme di adsorbimento-desorbimento di N₂ del campione C16 non funzionalizzato (h), confrontata con il campione C16Ph10 (i), C16Ph20 (l), C16Ph30 (m); (2) Isotherme di adsorbimento-desorbimento di N₂ del campione C16 non funzionalizzato (h), confrontata con il campione C16P10 (n), con il campione C16P20 (o), con il campione C16P30 (p)

<i>Campione</i>	<i>Distanza Inter-reticolare</i> d_{100} (nm)	<i>Distanza Inter-reticolare</i> d_{200} (nm)	<i>Diametro pori</i> (nm)	<i>Superficie specifica BET</i> (m^2/g)	<i>Volume pori</i> (cm^3/g)
C16	4.3	2.1	3.0	1217	1.27
C16 – M20	3.98	1.98	2.6	885	0.70
C16 – M30	3.8		3.3	976	0.83
C16 – M33	3.8		5.0	1081	1.30
C16 – Ph10	4.	2.1	3.0	1112	1
C16 – Ph20	4.1		3.0	1063	1
C16 – Ph30	4.4	2.1	2.9	1009	1
C16 – P10	4.0	2.0	2.6	1000	0.80
C16 – P20	3.84		2.4	1210	0.57
C16 – P30	3.98		3.3	880	0.29
C12	3.5	1.7	2.6	728	0.75
C12 – M20	3.5		3.5	901	0.52
C12 – M30	3.4		4.4	811	0.43
C12 – M33	3.2		6.1	842	0.46

Tabella 15.

Come si vede dalle figure sopra riportate, la forma delle isoterme di adsorbimento cambia dal tipo IV ad isoterme di tipo I, all'aumentare del contenuto di agente funzionalizzante. L'isoterma di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi MCM-41, è caratterizzata da un pronunciato *stepped pore filling*, relativo al fenomeno della condensazione capillare nell'intervallo di P/P_0 0.3÷0.8 (vedi paragrafo 6.1.4).

L'isoterma di tipo I è osservata invece per materiali mesoporosi con dimensioni dei pori vicini all'intervallo microporoso. Il cambiamento del tipo di isoterma di adsorbimento osservato all'aumentare della quantità di agente funzionalizzato introdotto nella miscela di sintesi è indicativo della variazione del diametro dei pori. Come si può vedere in Tabella 15 il diametro dei pori, diminuisce da 3.0 nm nel campione tal quale a 2.6 nm e fino a valori di 2.4 nm quando la quantità del gruppo propilico è aumentata dal 10 % al 20 % nei rispettivi campioni C16-P10 e C16-P20.

Il diametro dei pori diminuisce anche nel campione funzionalizzato con il 20% di metile e con il 30% di fenile rispetto al campione non funzionalizzato. E' interessante osservare come tali variazioni nel diametro dei pori eguagliano quelle relative agli spazi interplanari.

La idrofilicità dei materiali sintetizzati è stata valutata qualitativamente immergendoli in una fase liquida costituita da acqua e cloruro di metilene. L'acqua che ha carattere polare ed il cloruro di metilene che ha carattere apolare sono completamente immiscibili tra di loro. I materiali idrofobi si ripartiranno nella fase organica, mentre i materiali idrofili si ripartiranno nella fase acquosa.

I campioni tal quali ed il campione sintetizzato con il 10% di agente funzionalizzante fenil derivatio si sono ripartiti nella fase acquosa. I campioni sintetizzati con il 20 ed il 30% di derivato fenilico si sono disposti all'interfaccia delle due fasi esibendo un comportamento anfifilico. Tutti gli altri campioni si sono ripartiti nella fase apolare manifestando un carattere molto idrofobico.

Lo stesso comportamento è stato osservato quando una miscela di etere dietilico e di acqua sono state usate come mezzo di ripartizione. La permanenza dei campioni idrofobici nello strato apolare è stata osservata per tempi superiori alle quattro settimane.

7.3.2 Caratterizzazione in ambienti acquosi

L'impiego dei materiali mesoporosi in applicazioni dominate dai meccanismi host-guest, è dovuto alle loro peculiari caratteristiche. Infatti, essi esibiscono arrangiamenti di canali ordinati e cavità di differenti geometrie costruite sopra unità di silice. Il diametro del poro è variabile da 2nm a 50nm e può essere controllato e modificato, in un ragionevole range, usando differenti strategie sintetiche.

Fino ad oggi, molti dei lavori di ricerca in questo settore sono stati rivolti ad investigare come le interazioni host-guest potessero essere migliorate, regolando precisamente le proprietà strutturali e superficiali di tali materiali. In tali investigazioni i materiali mesoporosi hanno mostrato di essere capaci di ospitare molecole di interesse farmacologico e di rilasciarle successivamente, nelle condizioni stabilite, in maniera graduale.

Attualmente, non esistono contributi scientifici che investigano specificatamente le interazioni tra la silice mesoporosa e gli ambienti biologici per comprendere come queste interazioni possono essere ottimizzate da adatte modifiche delle proprietà superficiali. E' necessario studiare per sistemi candidati al trasporto controllato di farmaci alcuni parametri morfologici (in particolare la carica, la dimensione, l'idrofobicità,) che sono parametri fondamentali nell'influenzare le interazioni membrana-materiale e quindi determinanti per le proprietà di biocompatibilità del materiale.

L'idrofobicità, la carica superficiale, la dimensione delle particole sono i principali fattori influenzanti la citotossicità e l'adesione cellulare ¹⁹⁷.

7.3.2.1 “Bagnabilità” e misure di angolo di contatto

Una serie di misure di angolo di contatto statico (o metodo della goccia sessile) sono state condotte sui campioni dei materiali mesoporosi funzionalizzati. Le misure di angolo di contatto sono state condotte su 250 mg di polvere che sono stati compressi con una forza di 38 kp/cm² in pastiglie di 13 mm di diametro. Il sistema di angolo di contatto usato è mostrato in figura 31.



Figura 31. Sistema goniometrico di angolo di contatto

Tutte le misure sono state condotte a temperatura ambiente usando acqua come

agente bagnante. Le immagini (figura 32-33) e i valori dell'angolo di contatto (tabella 16) sono mostrate di seguito.

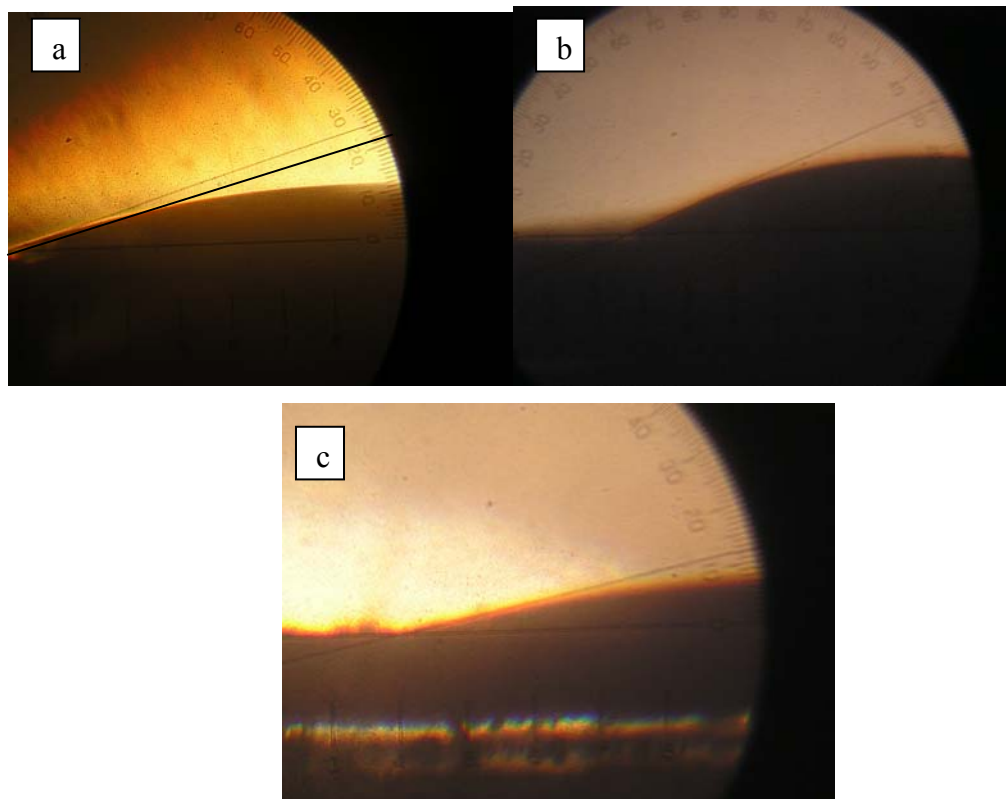


Figura 32. Misure di angolo di contatto : (a) campione 9, (b) campione 14, (c) campione 8

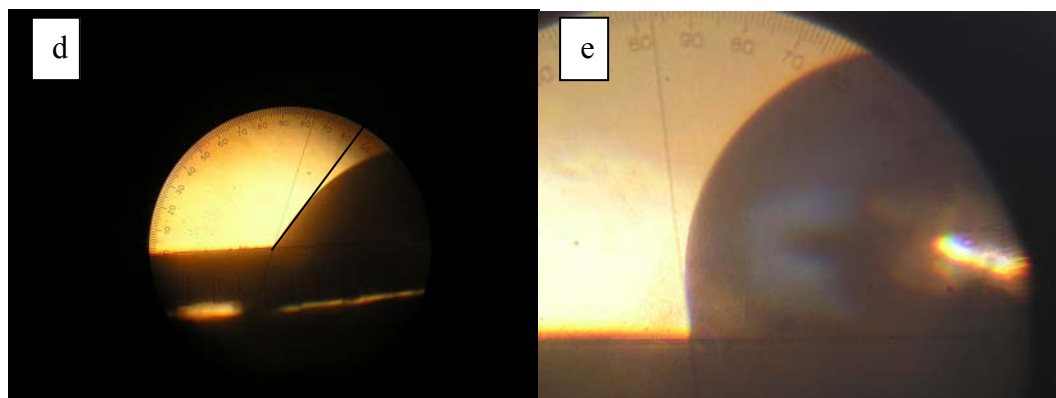


Figura 33. Misure di angolo di contatto : (d) campione 11, (e) campione 12

<i>Campione</i>	<i>Gruppo Funzionale, (X)</i>	<i>Angolo di contatto (gradi)</i>
C16	-	0
C16 – M20	Metile, 0,2	0
C16 – M30	Metile, 0,3	0
C16 – M33	Metile, 0,33	0
C16 – Ph10	Fenile, 0,1	12
C16 – Ph20	Fenile, 0,2	21
C16 – Ph30	Fenile, 0,3	31
C16 – P10	Propile, 0,1	0
C16 – P20	Propile, 0,2	55
C16 – P30	Propile, 0,3	110
C12	-	0
C12 – M20	Metile, 0,2	0
C12 – M30	Metile, 0,3	0
C12 – M33	Metile, 033	0

Tabella 16. Valori di angolo di contatto misurati

Sulla superficie estremamente idrofilica del campione non funzionalizzato, utilizzato come materiale di riferimento, la goccia d'acqua si è allargata immediatamente dando un angolo di contatto pari a 0°. Per i campioni modificati con i derivati fenilici e propilici è stata possibile ottenere una relazione tra l'angolo di contatto e la percentuale di agente funzionalizzante utilizzato. I risultati mostrati in figura 34 indicano che le superfici di tali campioni sono meno idrofiliche, anche per basse concentrazioni di funzionalizzante utilizzato.

Conseguentemente aumenta l'angolo di contatto e diminuisce, anche se di poco, la bagnabilità. Il rapporto percentuale di agente funzionalizzante/angolo di contatto è lineare. È stato dimostrato infatti da Mattigold *et al.*¹⁹⁸ che questo rapporto rimane

lineare fino all'80% di funzionalizzazione.

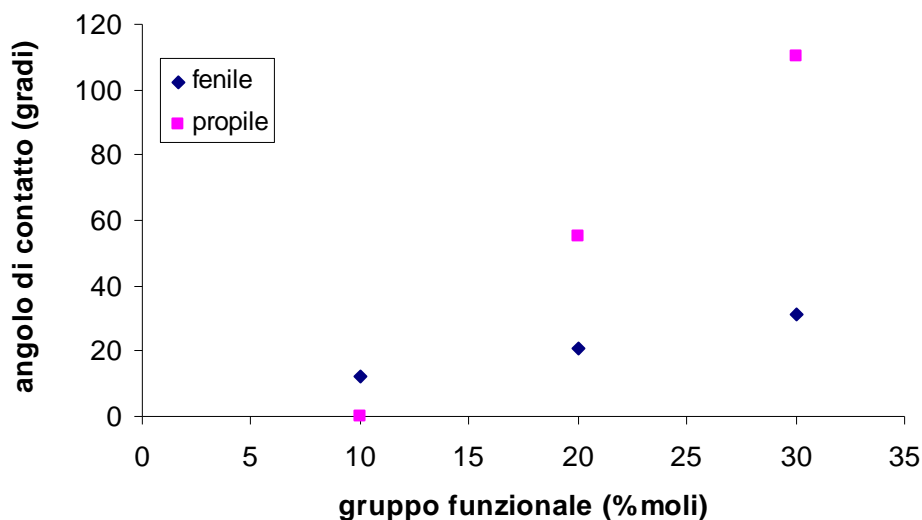


Figura 34. Relazione tra % di gruppo funzionalizzante utilizzata e le misure di angolo di contatto misurate

L'unico campione che ha evidenziato un carattere spiccatamente idrofobico è il campione modificato con il 30% di propile, per il quale è stato misurato un angolo di contatto maggiore di 90°.

Risultati che è possibile confrontare nelle due indagini, sono stati ottenuti solo per i campioni modificati con il fenile, e per i campioni modificati con il 20% e 30% del propilderivato. I risultati ottenuti per gli altri campioni modificati sono contrastanti.

Infatti i materiali che preferivano risiedere nello strato apolare quando immersi nella dispersione costituita da acqua e cloruro di metilene (vedi pag. 115), sono stati caratterizzati da un angolo di contatto pari a 0°.

E' ipotizzabile che la compressione effettuata per formare le pasticche sia deleteria nei confronti dei campioni evidenziando una perdita del loro ordine strutturale.

Inoltre, tali campioni hanno mostrato la presenza di isteresi nelle isoterme di adsorbimento di azoto: tale fenomeno è usualmente attribuita a stati non in equilibrio che potrebbero essere dovuti a rugosità di superficie o eterogeneità chimica¹⁹⁹. In

accordo a questa interpretazione, le isteresi potrebbero corrispondere a densità di difetti nella copertura di superficie che vengono amplificati dalla compressione che viene applicata durante la preparazione delle pasticche e che porta alla perdita dell'integrità della modificazione superficiale.

Le ulteriori investigazioni, sono proseguite solo sui materiali che hanno dimostrato bagnabilità in acqua.

7.3.2.2 Scanning force microscopy e analisi morfologica

La morfologia della superficie e la forma delle particelle sono state esaminate preliminarmente tramite Scanning Force Microscopy, tecnica meglio conosciuta come Atomic Force Microscopy, utilizzando uno strumento Bioscope equipaggiato con un (controller) Nanoscope IV (Strumenti digitali, Veeco, Santa Barbara, California).

I campioni sono stati esaminati in condizioni ambientali in tapping mode (vedi parag. 6.3.2.) utilizzando una sonda a scansione con una costante di forza di 40 N/m ad una frequenza di risonanza di ~170 kHz (Anfatec, Oelsnitz, Germany).

La preparazione del campione prevede l'ottenimento di una dispersione del campione in acqua e la deposizione di una goccia su un opportuno supporto.

Non avendo trovato riferimenti bibliografici sulla preparazione del campione sono state effettuate analisi utilizzando differenti concentrazioni, differenti supporti e differenti modalità di disseminazione del campione sul supporto.

Sono stati così avviate una serie di protocolli di analisi al fine di ottenere delle condizioni di analisi ottimali.

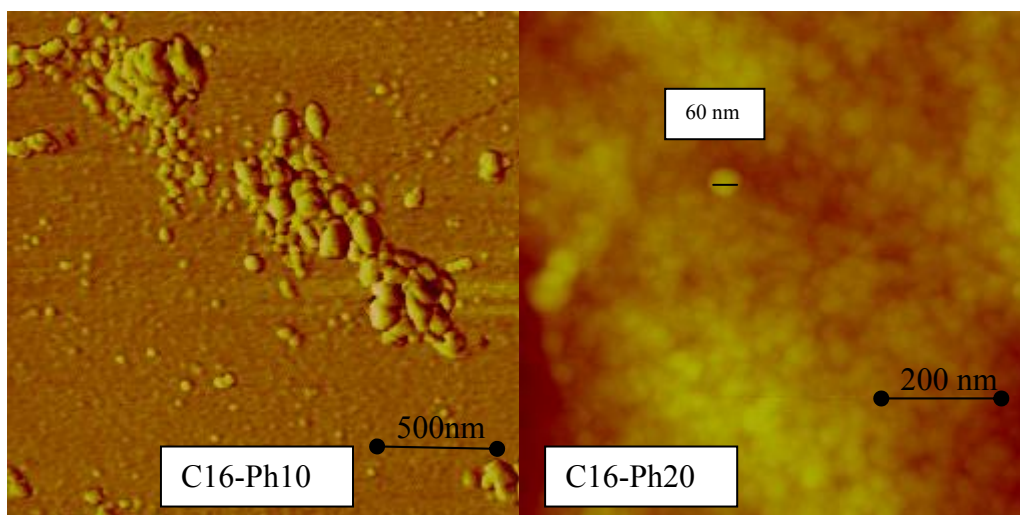


Figura 35. Morfologia osservata da SFM

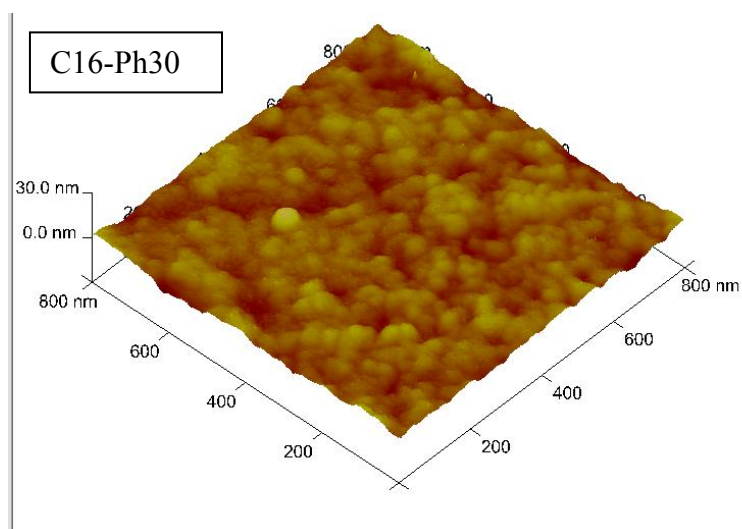


Figura 36. 3D surface plot-SFM image

Le immagini sopra riportate sono state ottenute disseminando una goccia di dispersione del campione in acqua, su un supporto di silicio. In figura 35 (immagine a sinistra) si può notare la presenza di aggregati secondari da particelle ancestrali (primitive) ben dispersi, ma con una ampia distribuzione (30-300 nm).

Nell'immagine a destra sono sempre presenti gli aggregati, ma sono osservate particelle primitive sferiche e con una stretta distribuzione tra 50 e 70 nm.

Sono state tentate delle diluizioni dei campioni e diverse tecniche di disseminazione

utilizzando inoltre supporti diversi, ma non sono state ottenute immagini soddisfacenti. Si è cercato così di minimizzare il fenomeno dell'agglomerazione attraverso dei cicli di centrifugazione e sedimentazione in etanolo al fine di migliorare la distribuzione dimensionale dei campioni.

A questo punto, secondo il diagramma riportato in figura 37, sono state effettuate analisi in parallelo sul supernatante in etanolo e sul precipitato ridisperso in acqua,

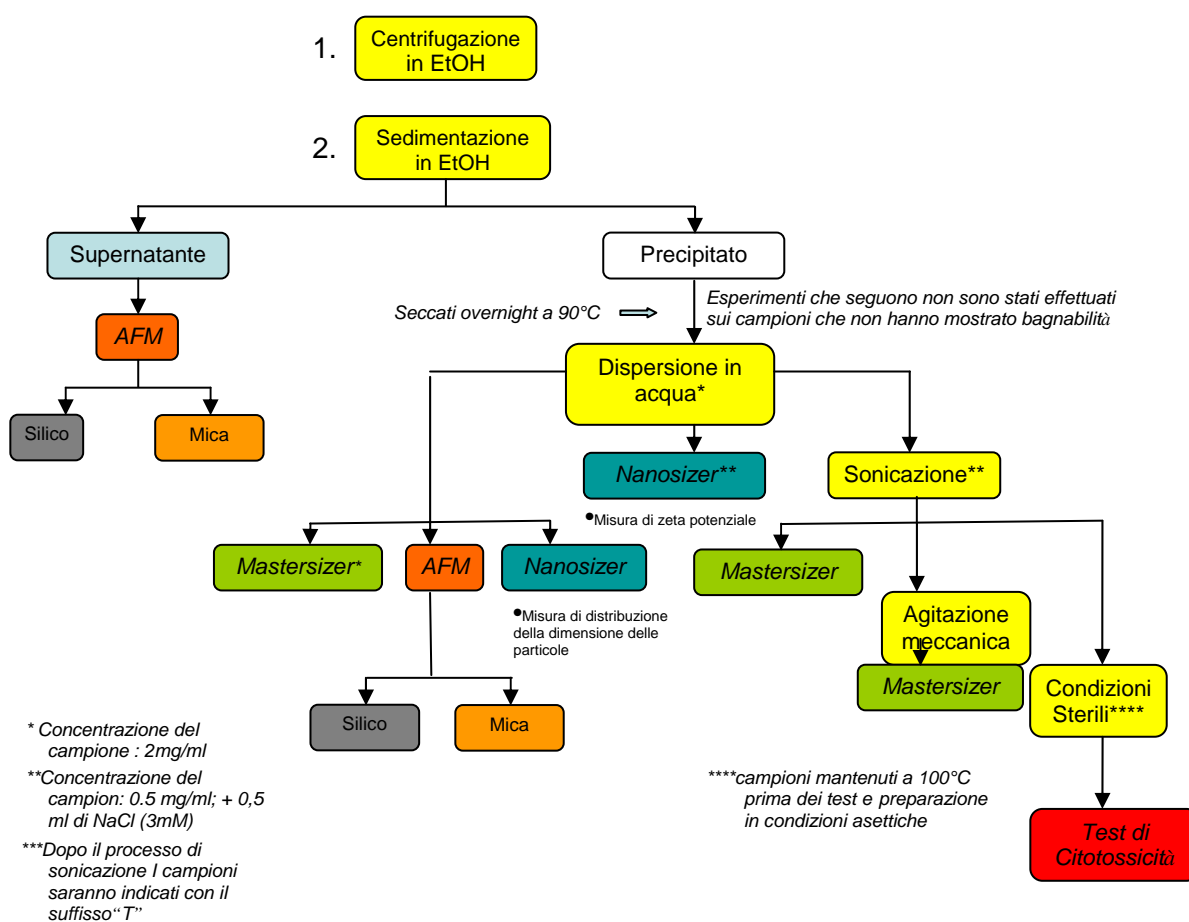


Figura 37. Rappresentazione del piano sperimentale

Il supernatante raccolto dallo step di sedimentazione è stato disseminato sui vari supporti è osservato allo SFM.

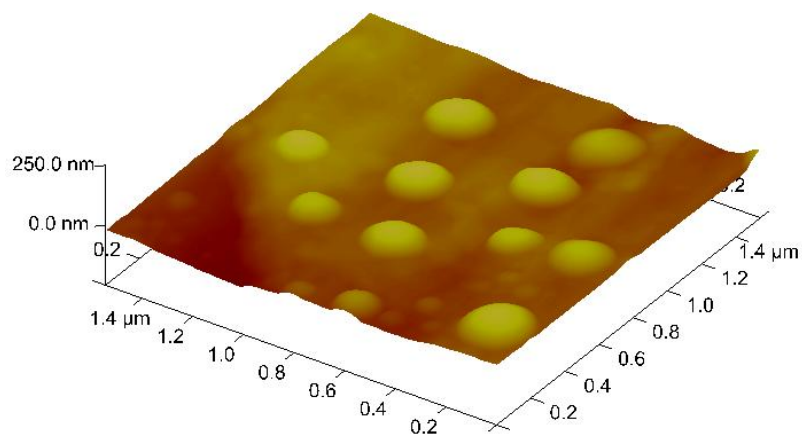
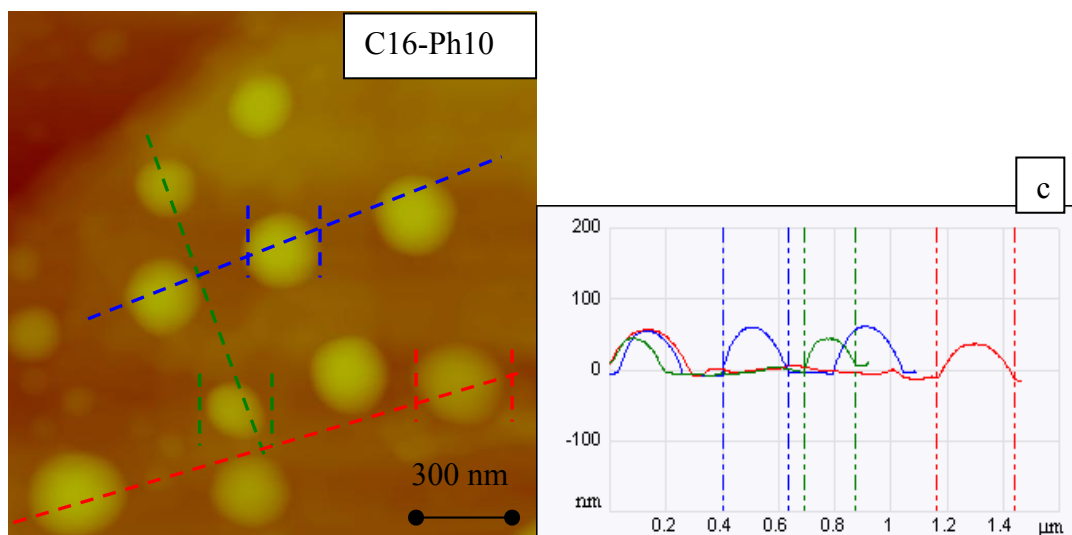


Figura 38. Morfologia, analisi della sezione (c), 3D-surface plot osservate da SFM

Come si può notare il supernatante della dispersione del campione C16-Ph10 in etanolo mostra una ben differente morfologia da quella presentata in acqua: sono presenti particole sferiche ben disperse di circa 300 nm, probabilmente grazie ad una

migliore azione disperdente dell'etanolo rispetto all'acqua nei confronti della silice.

Il campione è stato disseminato ed analizzato su un supporto di mica (silico-alluminato), in quanto non è stato possibile ottenere immagini chiare utilizzando il supporto di silicio previa sedimentazione. Probabilmente la differente morfologia del campione è stata ottenuta dalle differenti interazioni che esso ha instaurato sia in presenza dell'etanolo che con la successiva disseminazione su un supporto di mica. Identico risultato è stato ottenuto con il campione 14 (figura 39).

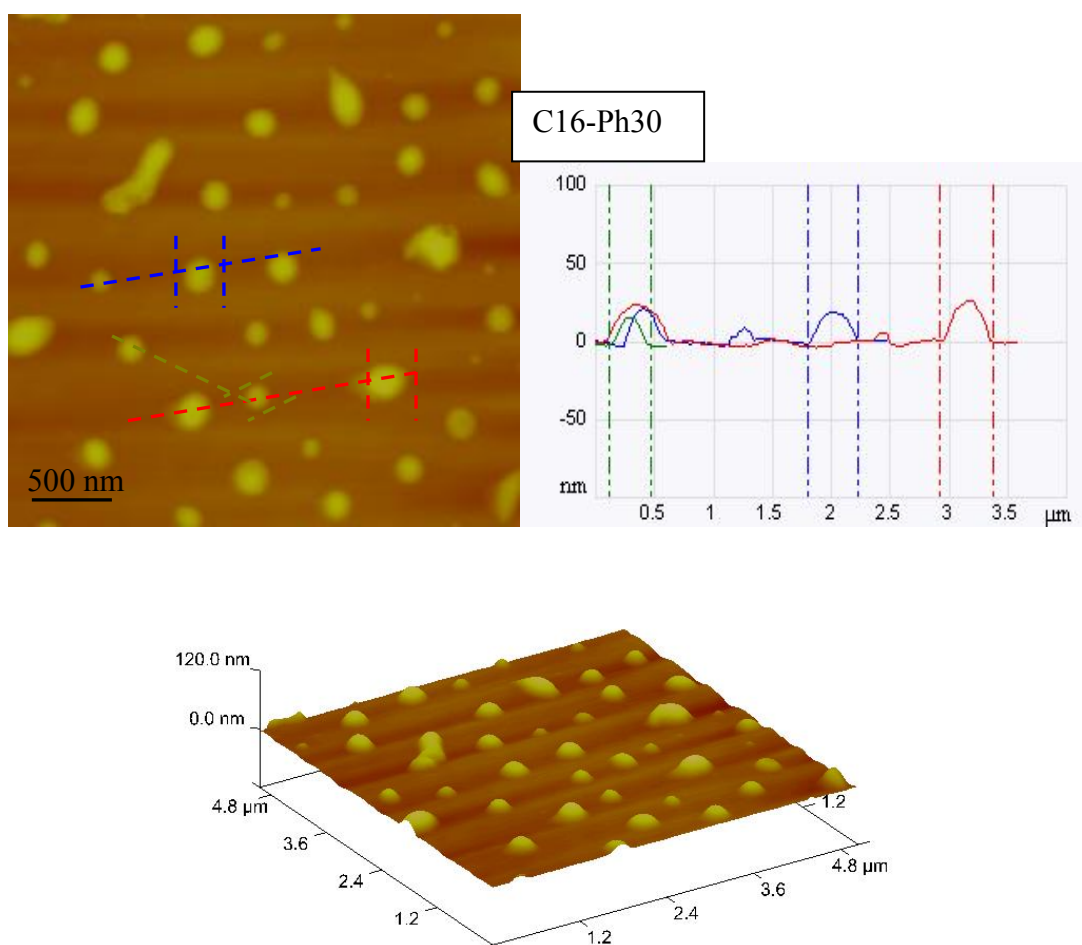


Figura 39. Morfologia, analisi della sezione , 3D-surface plot osservate da SFM

Il nostro interesse è ora rivolto al comportamento del campione in ambienti acquosi; per cui precipitato della sedimentazione è stato ridisperso in acqua e caratterizzato nella sua morfologia (figura 40-41).

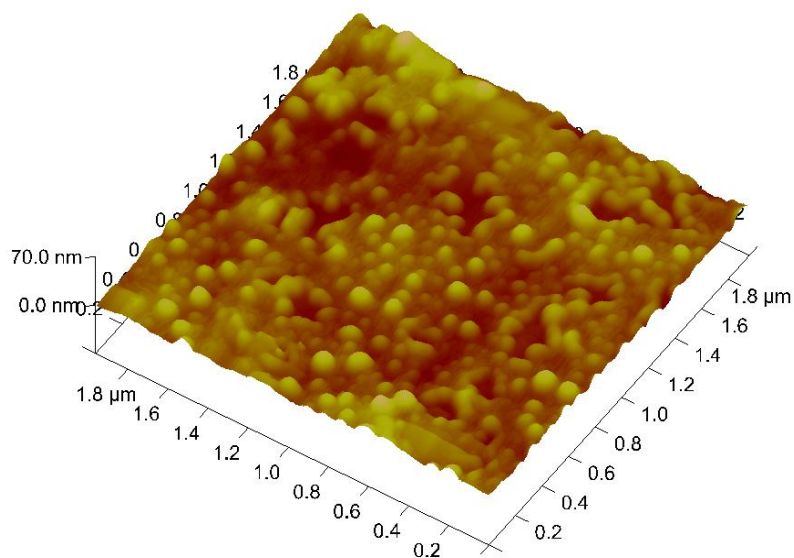


Figura 40. 3D surface plot del campione C16-Ph30

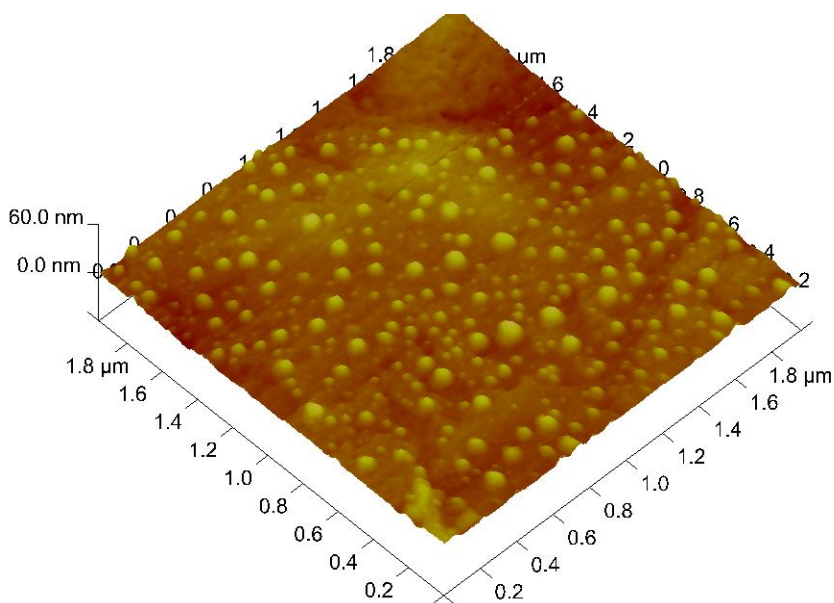


Figura 41. 3D surface plot del campione C16-Ph10

Entrambi i campioni hanno evidenziato particole sferiche, ben disperse: di dimensioni tra 30 e 70 nm per il campione C16-Ph10 e di dimensioni tra 70 e 100 nm per il campione C16-Ph30. E' ipotizzabile che il processo di centrifugazione e sedimentazione abbia migliorato il fenomeno dell'agglomerazione.

7.3.2.3 Light scattering:

Il diametro medio delle particole è la distribuzione delle loro dimensioni sono state analizzate, in accordo con i risultati ottenuti previa indagine morfologica da SFM, usando un Malvern Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Le misure sono state eseguite tramite la tecnica di *dynamic light scattering* (conosciuta anche come *Photon Correlation Spectroscopy*) a 25°C con un angolo di *scattering di 173 deg.*

Anche in questo caso è stato necessario studiare i protocolli di analisi, testando differenti concentrazioni in acqua (MilliQ water). Un esempio è mostrato nei grafici della figure seguenti: 41, 42

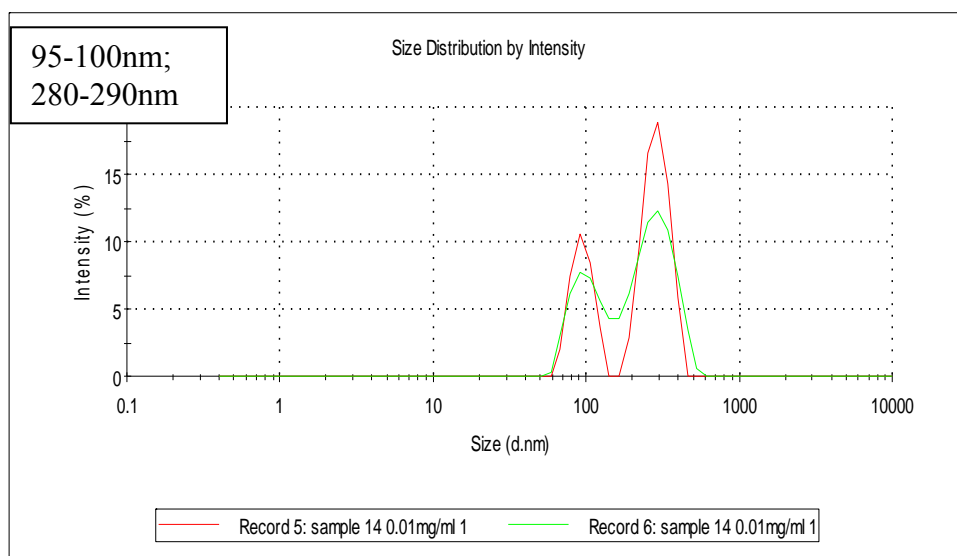


Figura 41. Distribuzione delle dimensioni del campione C16-Ph30 conc. 0,01mg/ml

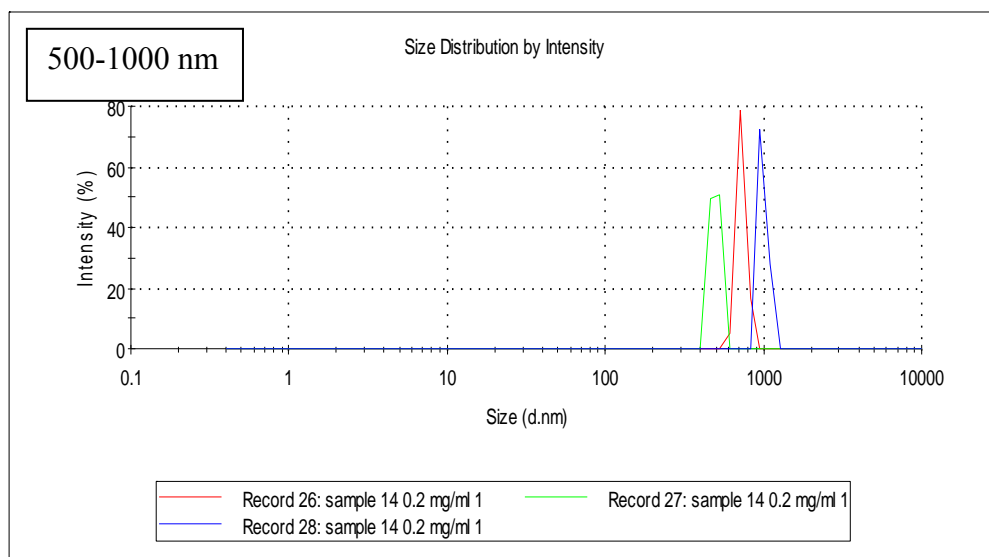


Figura 42. Distribuzione delle dimensioni delle particole del campione C16-Ph30 a conc. di 0.02 mg/ml

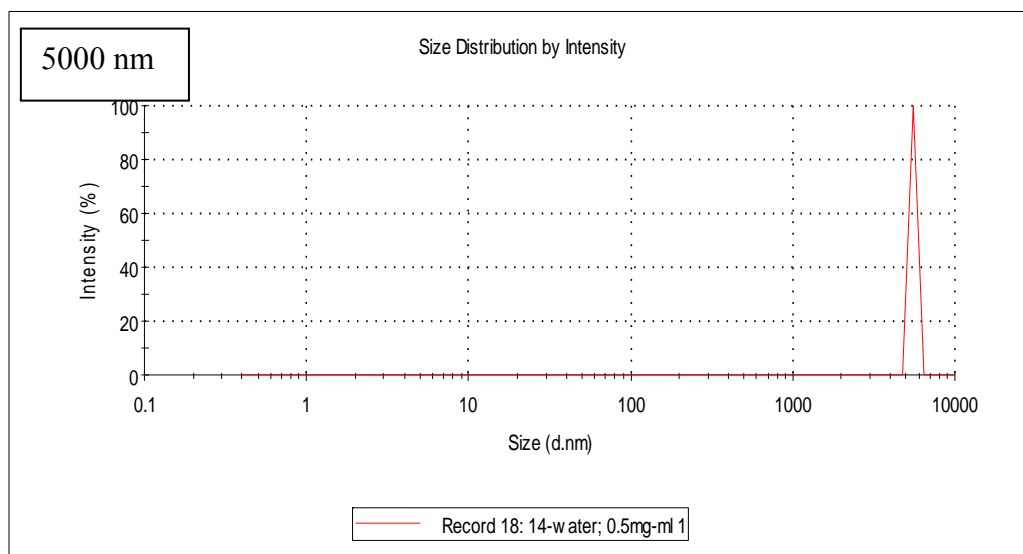


Figura 43. Distribuzione delle dimensioni delle particole del campione C16-Ph30 a conc. di 0.5 mg/ml

Come evidenziato dalle figure 40-43, differenti concentrazioni dello stesso campione hanno dato diversi intervalli di dimensione di particole. Questo comportamento sicuramente non è ideale, per cui si è verificato se i risultati ottenuti soddisfano i criteri di qualità proposti dallo strumento. I criteri di qualità che non sono stati soddisfatti

sono i seguenti:

- La dimensione misurata è più larga della dimensione di analisi limite superiore
- L'indice di polidispersità è molto alto
- Il campione potrebbe non essere adatto per misure di DLS
- Il campione contiene particole larghe/aggregati/

Se i risultati sono confrontati con quelli ottenuti dall'SFM, che aveva rilevato particole ancestrali tra 30 e 100 nm, appare evidente che le dimensioni del diametro delle particole misurate dal laser light scattering, è riferita a quella delle particole secondarie.

Il limite massimo dimensionale misurabile da questo strumento è compreso in un intervallo tra 0.6 nm e 6000 nm. Inoltre è stato rilevato un alto indice di polidispersione e presenza di aggregati che sono esclusi dalla misura.

È stato necessario, dunque, effettuare la misura della distribuzione della dimensione delle particole con un mastersizer che ha limiti dimensionali molto più elevati.

È stato utilizzato un Mastersizer 2000 μ P (Malvern Instruments, Malvern, UK) il cui limite massimo dimensionale misurabile è compreso in un intervallo tra 20 nm e 2000 μ m. La distribuzione delle dimensioni è stata valutata tramite *Static Light Scattering* misurando la concentrazione del volume delle particelle. Una concentrazione minima di 2mg/ml è richiesta dal protocollo standard operativo dell'analisi. Per l'analisi dei dati è stata utilizzata la teoria di scattering di Mie .

Una prima analisi è stata effettuata sui campioni che non sono stati sottoposti al processo di sedimentazione (figure 44-46).

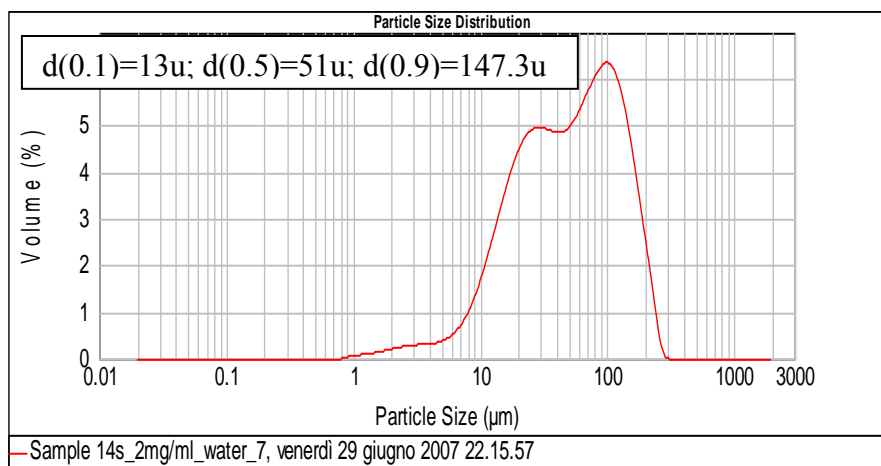


Figura 44. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph30 prima del processo di sedimentazione

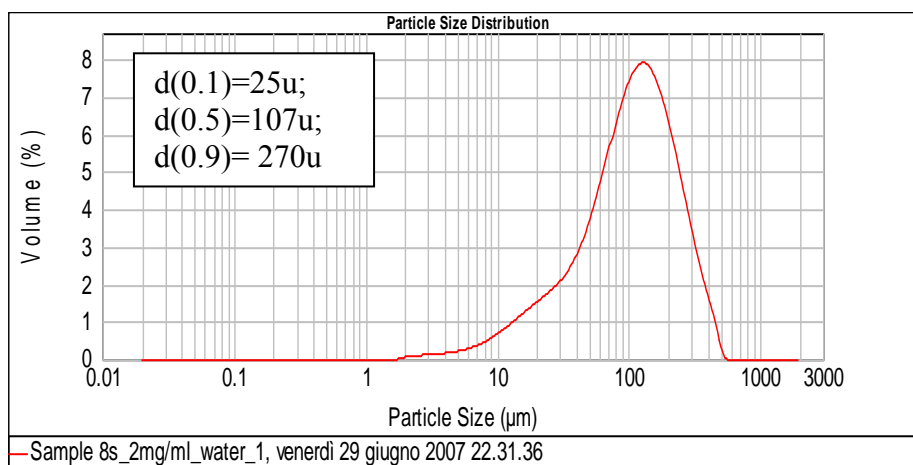


Figura 45. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph10 prima del processo di sedimentazione

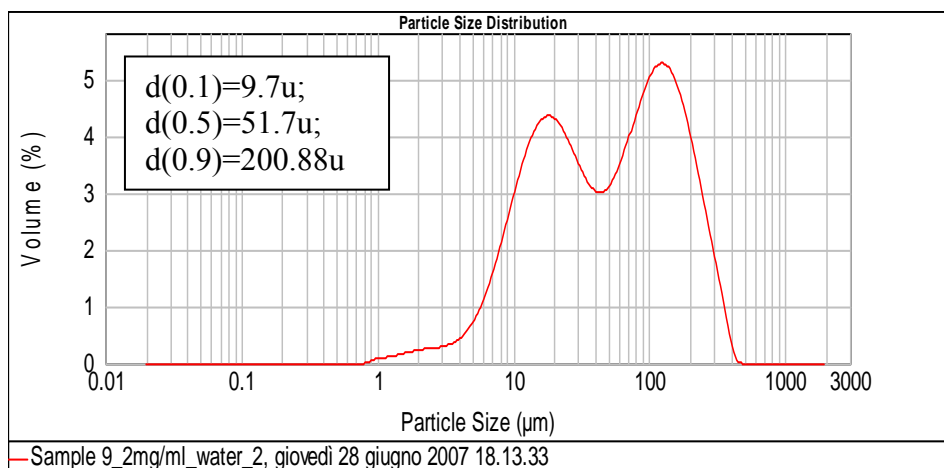


Figura 46. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph20 prima del processo di sedimentazione

Come previsto dal report della qualità delle misure aggregazione e polidispersità sono presenti in tutti i campioni. Si è così ripetuto il ciclo di sedimentazione in etanolo ed il precipitato ridisperso in acqua è stato nuovamente analizzato (figure 47-50)

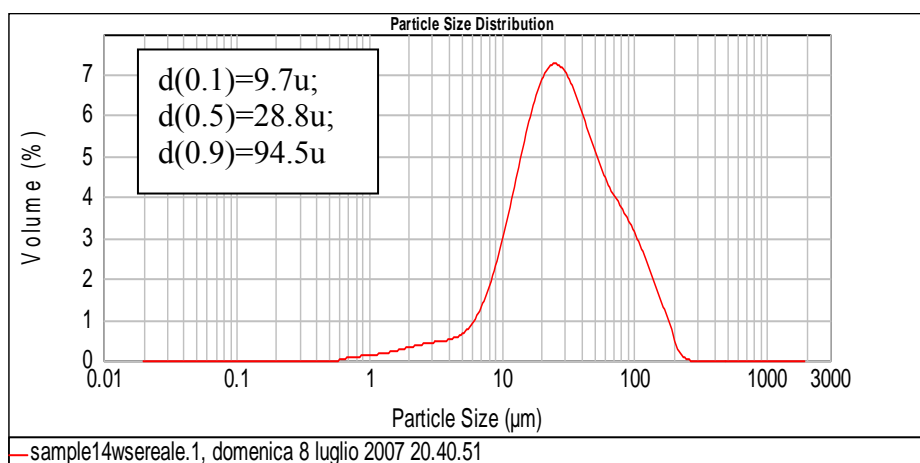


Figura 47. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph30 dopo il processo di sedimentazione

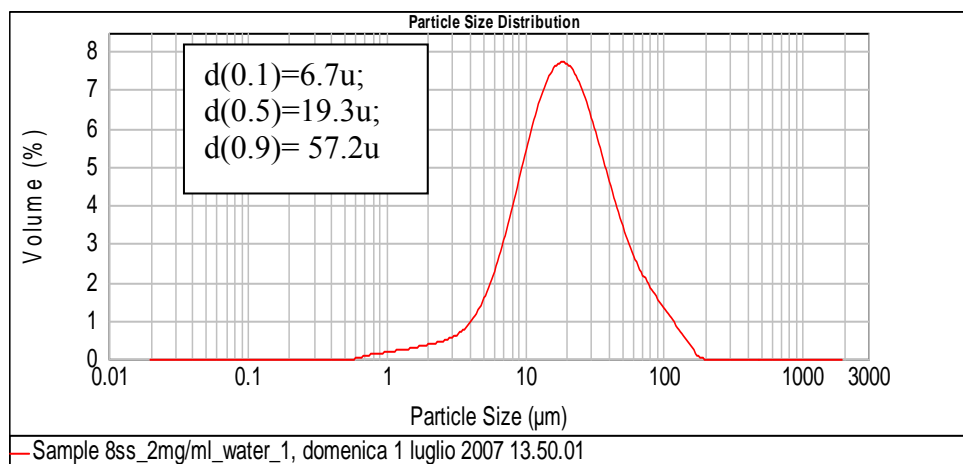


Figura 48. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph10 dopo il processo di sedimentazione

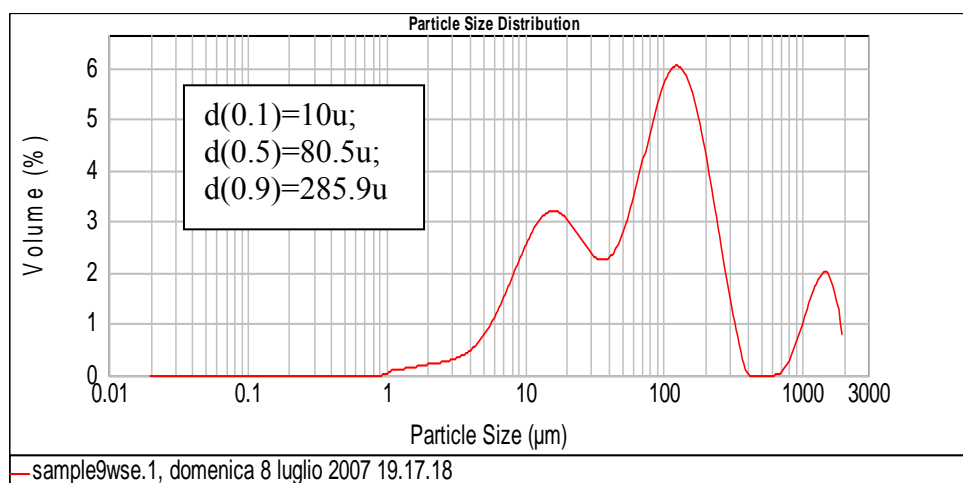


Figura 49. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph20 dopo il processo di sedimentazione

Come si può notare dai grafici sopra riportati, il processo di sedimentazione ha minimizzato, ma non risolto il problema della polidispersione o dell'aggregazione. Un altro trattamento di sonicazione è utilizzato al fine di migliorare la distribuzione delle dimensioni dei campioni. Le dispersioni vengono immerse per 15 minuti in un bagno sonico.e analizzate nuovamente²⁰⁰ (figure 50-52).

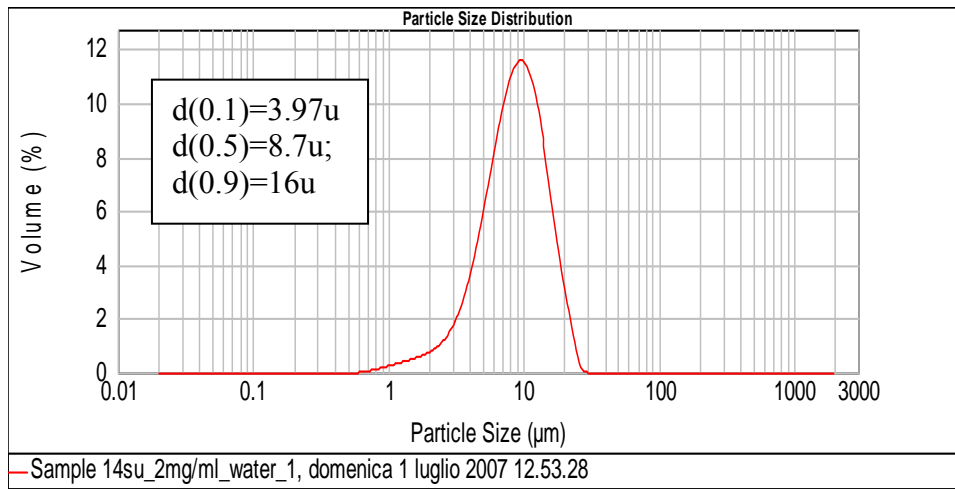


Figura 50. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph30 dopo il processo di sonicazione

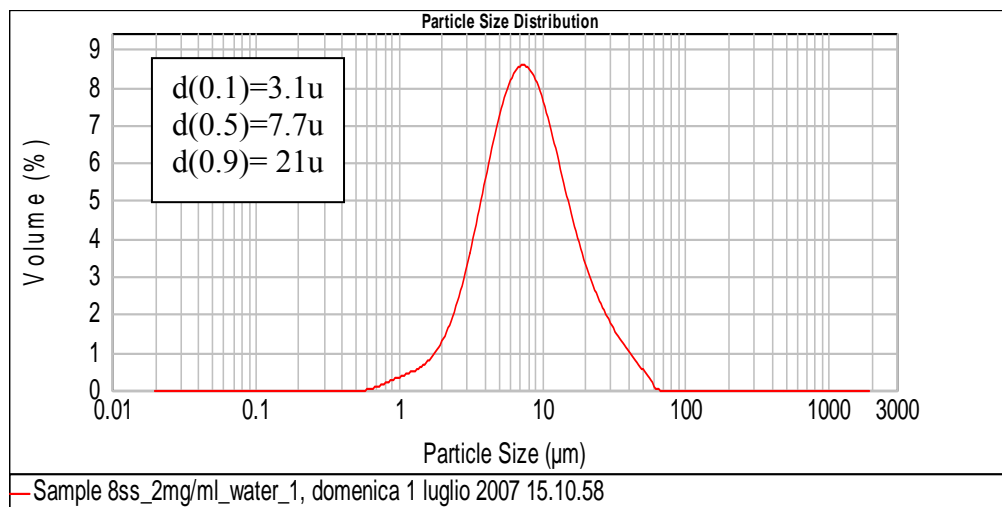


Figura 51. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16Ph10 dopo il processo di sonicazione

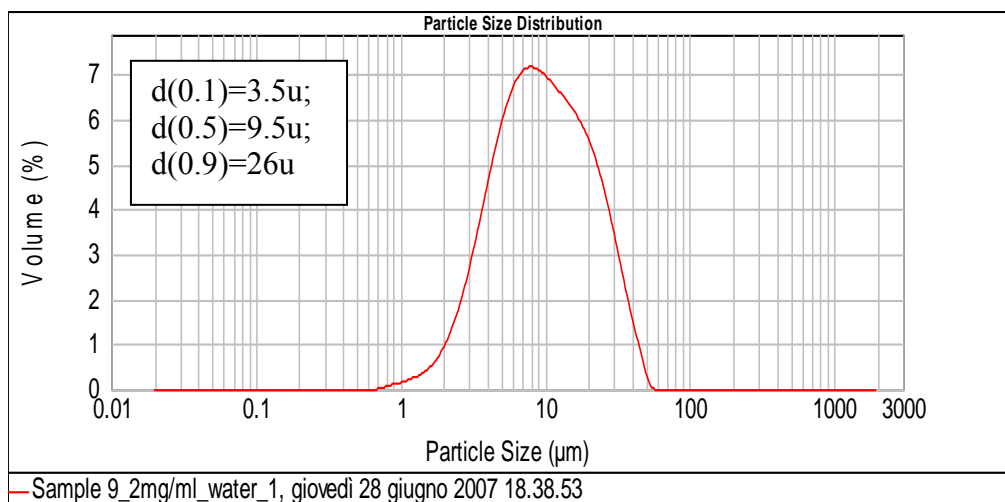


Figura 51. Distribuzione della dimensione delle particole del campione C16-Ph20 dopo il processo di sonicazione

Il trattamento sonico ha notevolmente migliorato la polidispersione e l'aggregazione. Ulteriori cicli di trattamento sonico o cicli di agitazione magnetica ad alte velocità per un periodo di 12 ore, restringono ancora la distribuzione dimensionale; cicli di agitazione lenti e protratti nel tempo sembrano peggiorarla.

7.3.2.4 Test di citotossicità

Prima che un nuovo materiale possa essere autorizzato per uso clinico, deve essere accertata la sua biocompatibilità, tramite test di citotossicità in vitro. I saggi di biocompatibilità in vitro sono basati sull'esposizione dei materiali da analizzare su colture cellulari.

Per tale motivo nel valutare la tossicità cellulare gli esperimenti hanno incluso due tra i test più sensibili, accurati e sicuri: il test del sale di tetrazolio (MTT assay) ed il test del rilascio dell'enzima lattatodeidrogenasi (LDH assay). I principi di funzionamento dei test sono stati descritti nel paragrafo 6.3.4.

Il rilascio dell'LDH nel supernatante della coltura cellulare è correlato e proporzionale alla quantità di danno della membrana e quindi fornisce un marker

sensibile per valutare il grado di citotossicità indotto dalla sostanza analizzata. Nel test di MTT la quantità di prodotto insolubile formato è correlata e proporzionale all'attività respiratoria cellulare e quindi fornisce una misura della capacità delle cellule di sopravvivere all'esposizione del materiale investigato.

Allo scopo di valutare gli effetti dei biomateriali sulle colture cellulari, le cellule sono esposte a varie concentrazioni dei materiali da analizzare, previa solubilizzazione in un opportuno mezzo cellulare ed incubati per diversi periodi di tempo (si indica come tempo di incubazione il tempo in cui il materiale è lasciato interagire con le cellule).

La linea cellulare utilizzata è stata Caco-2, clone C2BBE1. Le cellule sono state seminate in un una micropiastra a 96 well ad una densità di 1×10^5 cell/ml per well. Dopo una settimana circa, resa nota la crescita delle cellule dalla formazione del monostrato che si può osservare al microscopio ottico, le piastre possono essere utilizzate per gli esperimenti di citossicità.

I parametri investigati sono stati la concentrazione della dispersione di materiale mesoporoso, i tempi di incubazione ed i parametri morfologici.

MTT assay e protocollo sperimentale utilizzato

I campioni precedentemente investigati sono stati analizzati nella valutazione della loro biocompatibilità. Sono stati esaminati parametri come l'effetto della concentrazione, dell'idrofobizzazione, del trattamento sonico e dei differenti tempi di incubazione. I campioni sono stati sterilizzati mantenendoli a 70 °C per circa 10 ore, previa dispersione nel mezzo cellulare. Sono state preparate 5 dispersioni, ognuna in un intervallo di concentrazione tra 1 mg/ml e 0,001 mg/ml; 3 di loro sono state sottoposte a trattamento di sonicazione prima di essere messe a contatto con le cellule. Le soluzioni sono state messe a contatto con le cellule dopo 14 ore la loro preparazione.

Il mezzo cellulare utilizzato è stato il Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM), arricchito con l'1% di amminoacidi non essenziali e con il 10% di Fetal Calf Serum (FCS).

E' stato utilizzato il kit di rilevazione della citotossicità (MTT) della Roche. Il test è basato sulla conversione del sale di tetrazolio MTT giallo, nel sale insolubile

(formazano) blu porpora dalle cellule metabolicamente attive. La riduzione cellulare coinvolge i cofattori NADH/NADPH. I cristalli del sale sono solubilizzati e la risultante colorazione è quantificata utilizzando un lettore spettrofotometrico multiwell.

I valori di assorbanza ottenuti dalla coltura “test” sono stati confrontati con i valori ottenuti da colture di controllo:

- un controllo di cellule lisate, denominato controllo negativo, che costituisce lo 0% di vitalità cellulare. In questo caso le cellule sono state messe a contatto con una soluzione di un agente tossico (in quest’esperimento è stata utilizzata una soluzione di SDS al 1%);
- un controllo di cellule nel solo mezzo cellulare, denominato controllo positivo che costituisce il “100%” di vitalità.

Allo scopo di verificare eventuali interazioni tra il materiale analizzato ed il test colorimetrico è stata utilizzata un’ulteriore piastra di controllo contenente i campioni ed il test colorimetrico in assenza di cellule.

La capacità delle cellule di sopravvivere dopo l’esposizione ai campioni da testare è messa in relazione alla percentuale di formazano prodotto, che è data dalla seguente formula:

$$\% \text{ formazano} = \frac{\text{Abs. del campione} - \text{Abs del controllo negativo}}{\text{Abs. del controllo positivo} - \text{Abs del controllo negativo}} \times 100$$

I risultati sono mostrati nei grafici sottostanti (figure 52-54) per differenti tempi di incubazione.

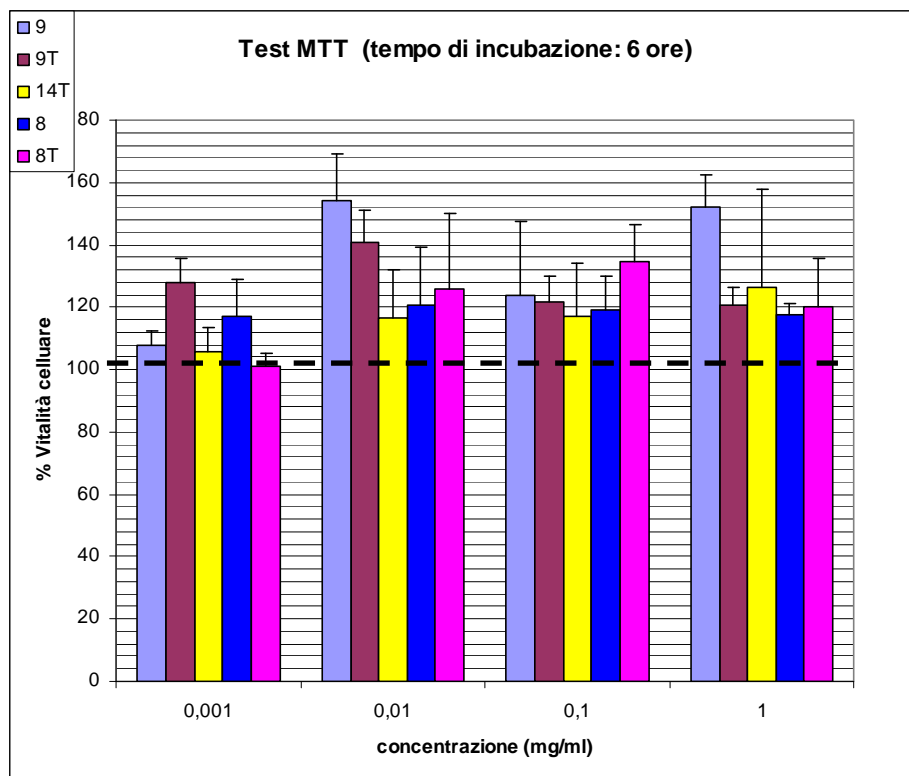


Figura 52. Test MTT a 6 ore

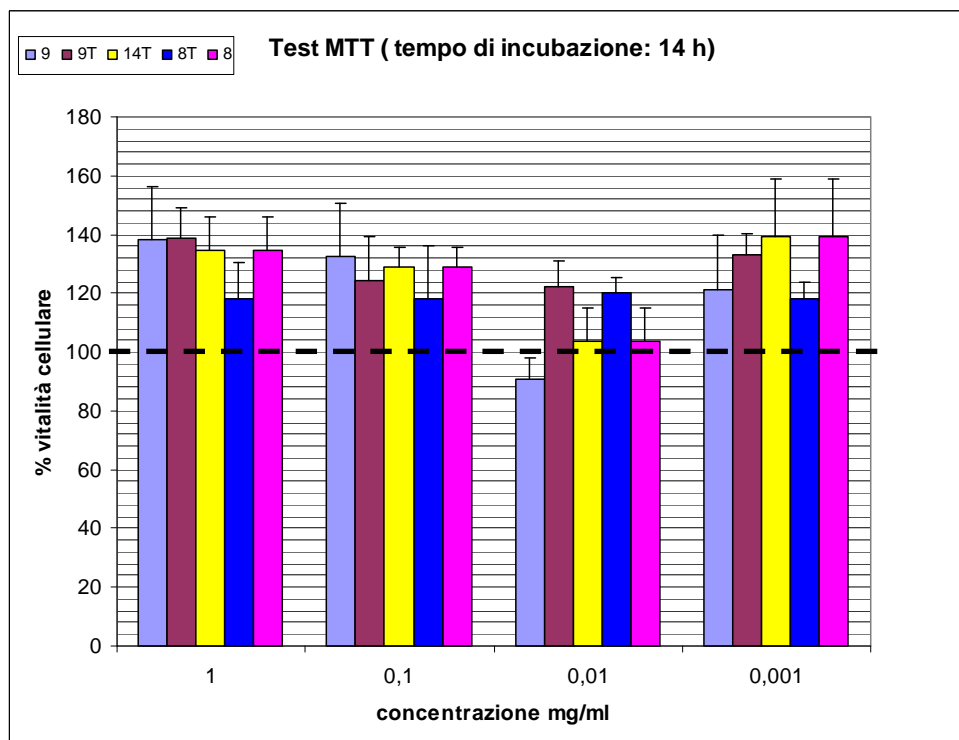


Figura 53. Test MTT a 14 ore

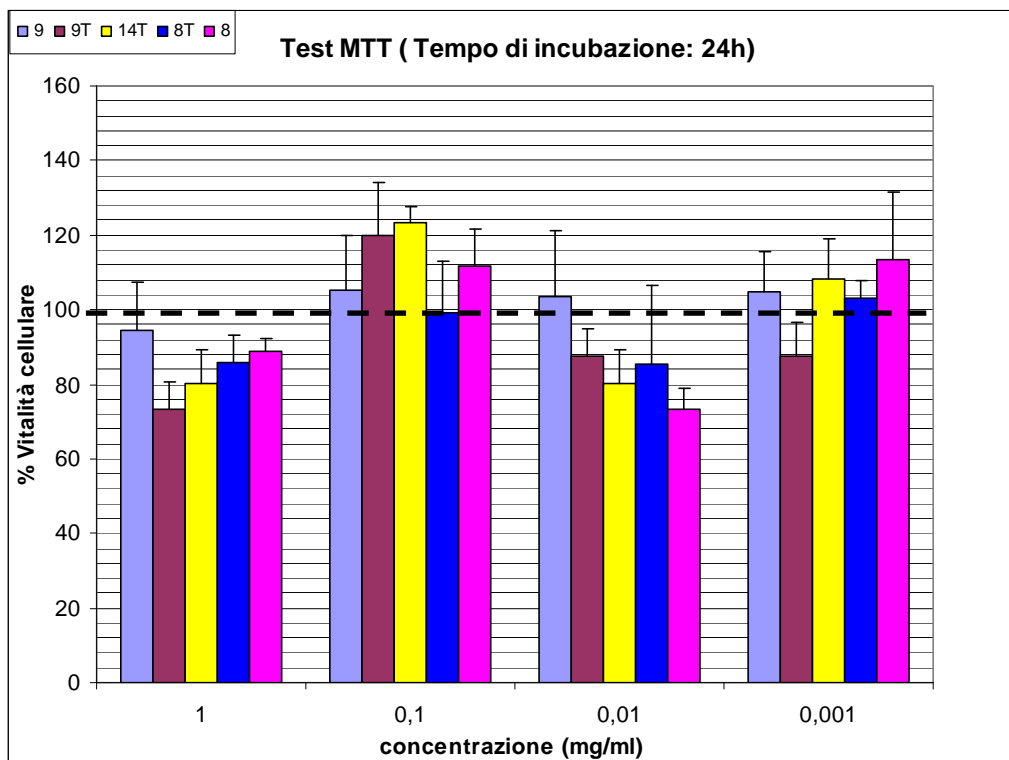


Figura 54. MTT assay a 24 ore

I numeri 8, 9 e 14 riportati in legenda indicano rispettivamente i campioni C16Ph10, C16Ph20, C16Ph30 mentre la lettera T indica che i campioni hanno subito il trattamento di sonicazione.

Come è facilmente visibile la vitalità delle cellule è altissima per tutti i campioni ed indipendentemente dalle concentrazioni. Si può quindi affermare che i campioni investigati sono biocompatibili e non producono citotossicità cellulare. La vitalità sembra diminuire leggermente per tempi di incubazione maggiori.

LDH assay e protocollo sperimentale utilizzato

L'LDH assay è più sensibile rispetto al test MTT ed è utilizzato per rilevare eventuali differenze nei materiali sottoposti a differenti trattamenti e precedentemente

analizzati a diverse concentrazioni. L'effetto della concentrazione e della sonicazione sono stati i parametri esaminati. Un solo tempo di incubazione, pari a 6 ore, è stato inizialmente analizzato. I campioni sono stati sterilizzati secondo la procedura precedentemente descritta. Sono state preparate 4 dispersioni in un intervallo di concentrazioni comprese tra 1 mg/ml e 0,001 mg/ml e 2 di loro sono state sottoposte a trattamento di sonicazione prima di essere messe a contatto con le cellule. Le soluzioni sono state preparate e immediatamente messe a contatto con le cellule; ulteriori 4 dispersioni alle stesse concentrazioni, utilizzate dopo 5 giorni dalla preparazione, sono state analizzate al fine di valutare la stabilità dei campioni nel mezzo cellulare.

Il mezzo cellulare utilizzato è stato il Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM), libero da fenolo (che può interferire con la reazione colorimetrica del test), e arricchito con l'1% di amminoacidi non essenziali.

Il mezzo cellulare in genere è arricchito con il 10% di Fetal Calf Serum (FCS); esso, contenendo proteine, zuccheri, enzimi (tra cui lo stesso LDH che può interferire con il test), è una fonte di nutrimento e di crescita cellulare importante, che riveste e protegge le cellule e le rende meno sensibili al contatto con il materiale da investigare.

In questi esperimenti preliminari di citotossicità si è preferito lavorare senza l'aggiunta di FCS ed avere così una sensibilità sovrastimata delle interazioni materiale-cellule. È stato utilizzato il kit di rilevazione della citotossicità (LDH) della Roche. Il test è basato su un dosaggio enzimatico accoppiato che coinvolge la conversione del sale di tetrazolio, 2-p-(iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio cloruro (INT), nel formazano prodotto. La reazione è catalizzata dall' LDH rilasciato dalle cellule e dalla diaforasi, un enzima contenuto nel kit del test. Le reazioni chimiche che avvengono sono presentate in dettaglio nella figura successiva (fig. 55)

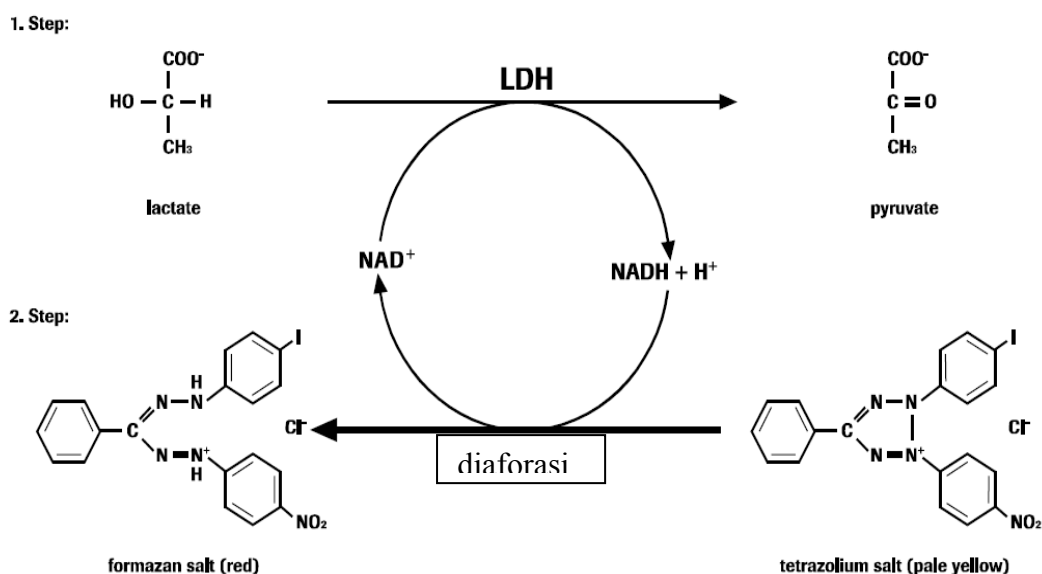


Figura 55. Descrizione del test di rilascio di LDH.

Nel primo passaggio, se l'enzima LDH è presente, perché rilasciato dalle cellule, riduce il NAD⁺ a NADH⁺/H⁺ dall'ossidazione del lattato in piruvato. Nella seconda reazione enzimatica i 2 idrogeni della coppia NADH⁺/H⁺ sono trasferiti dalla diaforasi, catalizzatore contenuto nel kit del test, al sale giallo di tetrazolio INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride) che viene ridotto nel formazano rosso.

Le concentrazioni di formazano sono determinate misurando l'assorbanza ottica a 492 nm, attraverso un lettore spettrofotometrico di microplate.

I valori di assorbanza ottenuti dalla coltura "test" sono stati confrontati con i valori ottenuti da colture di controllo:

- un controllo di cellule lisate, denominato controllo positivo, che costituisce il 100% di citotossicità. Le cellule in questo caso sono state messe a contatto con una soluzione di un agente tossico (in questo esperimento è stata utilizzata una soluzione di triton al 2%);
- un controllo di cellule nel mezzo cellulare, denominato controllo negativo che costituisce lo 0 % di citotossicità.

Allo scopo di verificare eventuali reazioni di interazioni tra il materiale testato ed il test colorimetrico è stata utilizzata un'ulteriore piastra di controllo contenente i campioni ed il test colorimetrico.

La percentuale di LDH rilasciato è ricavato dalla seguente formula

$$\% LDH = \frac{\text{Abs del campione} - \text{Abs controllo negativo}}{\text{Abs. controllo positivo} - \text{Abs controllo negativo}} \times 100$$

I risultati sono mostrati in grafici differenti per facilitare la comprensione nella valutazione dei dati (figure 57-60). I numeri 8 e 9 mostrati in leggenda indicano i campioni C16Ph10 e C16Ph20, con la lettera N si identificano le soluzioni che sono state preparate di fresco, con la sigla *old* si indica che le dispersioni sono state conservate prima del test, e con la lettera T si identificano i campioni sottoposti al trattamento di sonicazione.

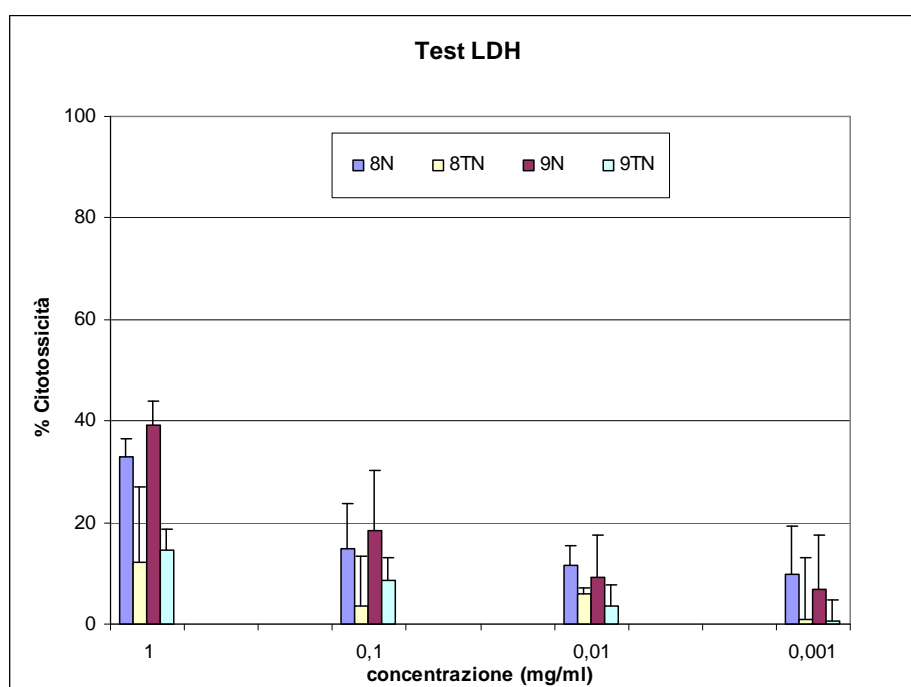


Figura 57. LDH test: valutazione dell'effetto della concentrazione e della sonicazione nelle soluzioni preparate di fresco

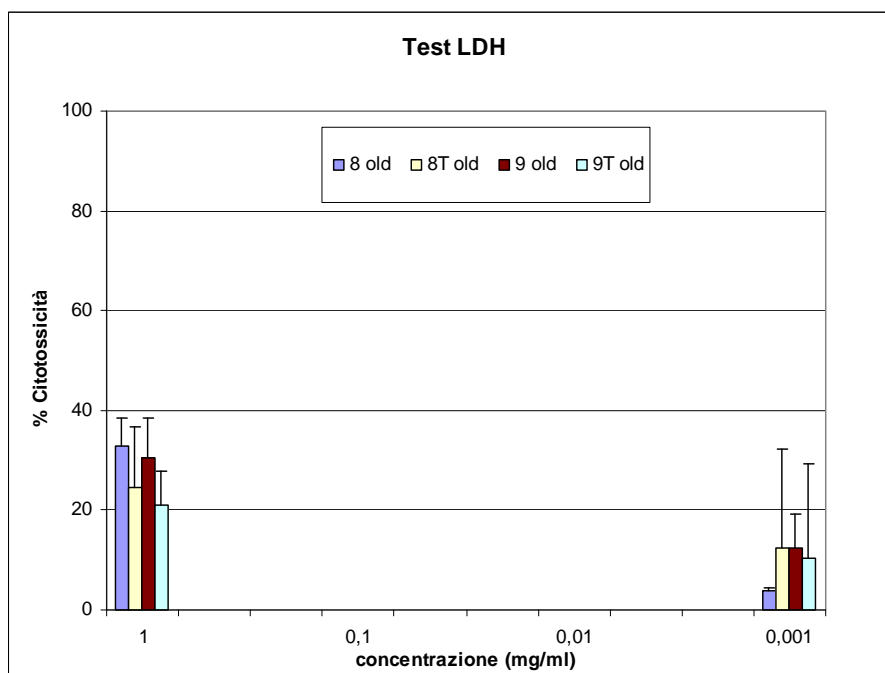


Figura 58. LDH test: valutazione dell'effetto della concentrazione e della sonicazione nelle soluzioni old

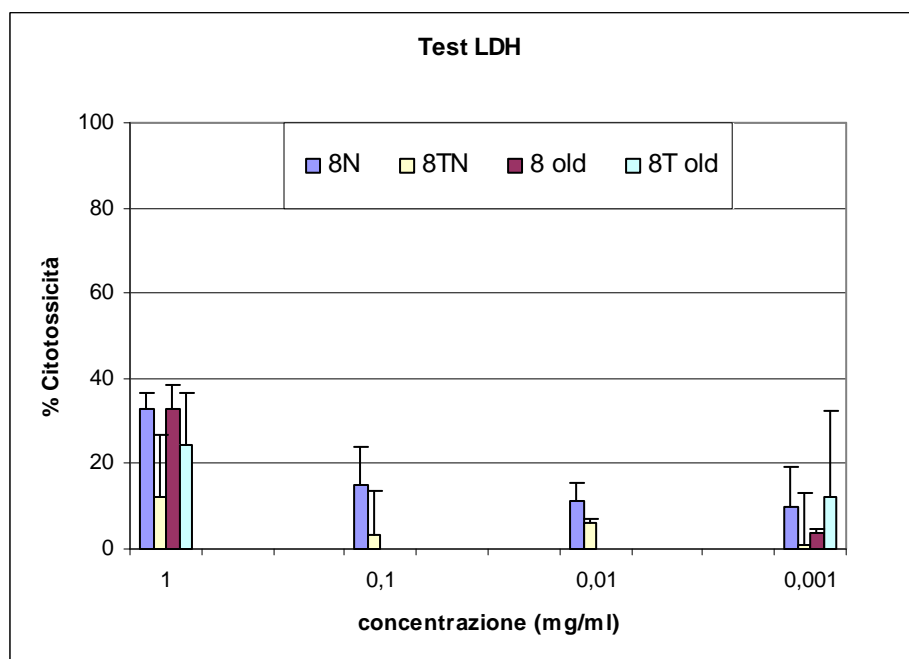


Figura 59. LDH test: confronti nella valutazione dell'effetto della concentrazione e della Sonicazione tra le soluzioni preparate di fresco e le soluzioni old per il campione 8

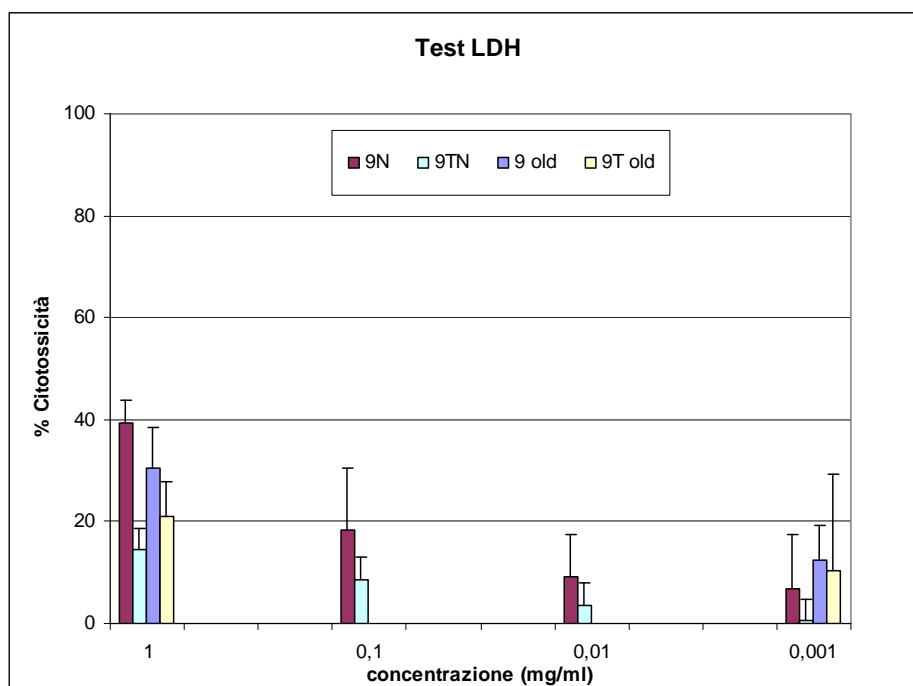


Figura 60. LDH test: confronti nella valutazione dell'effetto della concentrazione e della Sonicazione tra le soluzioni preparate di fresco e le soluzioni old per il campione 9

Ricordando che si è lavorato in assenza di FCS, e che quindi le cellule potrebbero essere già di per sé in condizioni stressate, i valori di citotossicità ottenuti sono quelli riportati nei grafici precedenti. Come è ben evidenziato la citotossicità diminuisce al decrescere della concentrazione delle dispersioni di tutti i campioni. Anche la sonicazione sembra avere un effetto positivo sulla biocompatibilità. Sono state postulate due ipotesi:

- è noto che l'aggregazione provoca una diminuzione della tossicità. La formazione di aggregati più grandi nei campioni sonicati ben spiega l'effetto riscontrato dai test. Questo risultato contrasta però con quelli ottenuti dalle misure di light scattering, nelle quali la sonicazione sembrava ridurre l'aggregazione delle particole. I materiali sono stati dispersi in un mezzo diverso dall'acqua (solvente utilizzato nelle precedenti analisi di light scattering) per cui il trattamento di sonicazione può aver prodotto effetti diversi;

- la migliore biocompatibilità dei materiali sottoposti a trattamento sonico potrebbe essere spiegata attraverso un minore effetto di sedimentazione delle particole provocato dal processo di sonicazione stesso. La sonicazione potrebbe diminuire la velocità di sedimentazione delle particole e quindi diminuirne l'effettiva concentrazione che è a contatto con la superficie delle cellule.

Le due ipotesi devono ancora essere confermate da ulteriori analisi. Non sono state rilevate differenze tra il comportamento delle soluzioni dei campioni preparate di fresco e quello delle soluzioni conservate nel mezzo cellulare. Si può quindi dedurre che i campioni rimangono stabili nel mezzo cellulare.

Non è stata rinvenuta nessuna sostanziale differenza per quanto riguarda le percentuali di agente funzionalizzante utilizzato, probabilmente perché la differenza tra i due campioni è così piccola da non costituire un parametro fondamentale negli esperimenti di citotossicità.

7.3.3 Conclusioni

Importanti conoscenze riguardo il comportamento di alcuni materiali mesoporosi ibridi sono state ottenute dalle indagini svolte negli ambienti cellulari. Protocolli di preparazione e di indagine di tali materiali in ambienti biologici sono stati ottenuti.

Mediante Scanning Force Microscopy sono state rilevate particole ancestrali nanometriche, che non sono riscontrabili dalle classiche tecniche morfologiche utilizzate.

Un trattamento post-sintesi di sonicazione è risultato efficace nel ridurre notevolmente la distribuzione e l'aggregazione delle dimensioni delle particole.

Il risultato più importante raggiunto è sicuramente aver dimostrato e misurato la loro biocompatibilità confrontando due test diversi. Mancano infatti referenze bibliografiche relative ai dati di citotossicità per la silice mesoporosa. La capacità di sopravvivenza delle cellule dopo esposizione ai materiali è risultata altissima per tutti i tempi di incubazione a cui sono state testate. D'altra parte il danno alla membrana è concentrazione dipendente, ma questa valutazione deve essere confermata da ulteriori analisi.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Baker, R., *Controlled release of biologically active agents*, John Wiley & Sons (1987).
2. Robinson, J., Ed. *Sustained and Controlled Release of Drug Delivery Systems. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Marcel Dekker, INC (1978) Vol. 6*
3. Domb, A. J., Ed., *Polymeric Site-specific Pharmacotherapy*, John Wiley and Sons (1994).
4. Ottenbrite, R., Ed., *Frontiers in Biomedical Application Technomic Publishing, INC, (1998) Vol. 1.*
5. Park, K., Shalaby, W. S. W., Park H., *Biodegradable hydrogels for drug delivery, Technomic Publishing INC. (1993).*
6. Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995, 41, 2
7. Brinker, C. J., Scherer, G. W. , *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing, Academic Press (1989)*
8. Radu, D. R., Lai, C.-Y., Huang, J., Shu, X., Lin, V. S. Y, *Chem. Commun.* 2005, 1264.
9. Slowing, I., Trewyn, B. G., Lin, V. S. Y, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128,14 792.
10. Lin, Y.-S., Tsai, C.-P, Huang, H.-Y., Kuo, C.-T, Hung, Y., Huang, D.-M., Chen, Y.-C., Mou C.-Y., *Chem. Mater.* 2005, 17, 4570.
11. Luo, D.; Han, E.; Belcheva, N.; Saltzman, W. M. *J. Controlled Release* 2004, 95, 333-341.
12. http://www.menarini.com/ricerca_sviluppo/farmaco.htm
13. a) **Carino I. S.**, et al. *Atti del 6° congresso Nazionale Scienza e Tecnologia delle zeoliti Vietri sul Mare (SA) 2003*, p.104 (b) **Carino I. S.**, et al., *Drug Delivery*, 2007 vol.14, issue 8 pag. 491
14. (a) **Carino, I.,S.** et al *VIII° Convegno Nazionale AIMAT*, Palermo 27 giugno-1 luglio 2006; (b) **I., S. Carino**, F.Testa,, F. Puoci, L. Pasqua, e R. Aiello *Submitted at 4° international FEZA conference, Paris 2-6 sett. 2008*
15. Robinson, J. R., *Controlled Drug Delivery*, ACS, Washington DC 1997,Ch. 1
16. <http://www.vioxx>.
17. Sahoo, S. K., Labhasetwar, V., *Drug Discovery Today* 2003, 24, 1112
18. Colombo, P., Bettini, R., Perachia, M. T., Santi, P., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet* 1996, 2, 87
19. Dekker, M., *Modified Release Drug Delivery Technology*, New York 2003
20. Lohmann, D., *Macromol. Symp.* 1995, 100, 25
21. Emerson, D., L., *Pharm. Sci. Technol. Today* 2000, 3, 205
22. Martin, F., Huang, T., Dekker, M., *Modified Release Drug Delivery Technology*, New York 2003 Ch. 58
23. Oussoren, G., Storm, A., *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001, 50, 143
24. Mayer, L., *Helix Amgen's Magazine of Biotechnology* 2000, 1, 48
25. Rmailek-Abu, R., Attwood, D., D'Emmanuelle, A., *Drug Delivery Syst. Sci.* 2003, 3, 65
26. Martini, A., Ciocca, C., *Expert Opin. Ther. Patents* 2003, 13, 1801
27. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. W., J.

- Controlled Release* 2001, 70, 1
28. Carmeliet, P., Jain, R.K., *Nature*, 2000, 407, 249
 29. Jain, R. K., *J. Controlled Release* 1998, 53, 49
 30. Moghimi, M., Hunter, A.C., Murray, J.C., *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 283
 31. Avnir, D., Braun, S., Ottolenghi, M., *Chem. Mater.* 1994, 6, 1605
 32. Avnir, D., Braun, S., Ottolenghi, M., *Sopramolecular Architecture: Syntetic Control in Thin Films and Solids*, ACS Symposium Series, Vol. 499, Oxford University Press, New York 1992 p. 384
 33. Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M., *Material Letters* 1990, 10, 1
 34. Dave, B. C., Dunn, B., Valentine, J. S., Zink, J. S., *Nanotechnology: Molecularly Designed Materials*, ACS Symposium Series, Vol. 622, Oxford University Press New York 1996, pag. 351
 35. Wie, Y., Xu, J., Feng, Q., Dong, H., Lin, M., *Mater. Lett.* 2000, 44, 6
 36. Bringley, J. F.; Liebert, N. B. *J. Dispersion Sci. Technol.* 2003, 24,589.
 37. Ahola, M., Kortesuso, P., Kangasniemi, I., Kiesvaara, P., Yli-Urpo, A., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1999a, 25, 955-959
 38. Ahola, M., Rich, J., Kortesuso, P., Kiesvaara, P., Seppala, J. and Yli-Urpo A., *Int. J. Pharm.*, 1999b, 181, 191
 39. Ahola, M., Kortesuso, P., *et al.*, *International J. of Pharmaceuticals*, 2000, 195, 219-227
 40. Ahola, M., Säilynoja, E., Raitavuo, M., Vaathio, M., Salonen, J., Yli-Urpo, A., *Biomaterials*, 2001, 22, 2163-2179
 41. Barbè, C., *et al.*, *Advanced Materials*, 2004, 16, 1959
 42. Bottcher, H., *et al.*, *J. Cont. Rel.* 1999, 60, 57.
 43. Bottcher, H., Kallies, K.-H. and Haufe, H., *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, 1997, 8, 651-654
 44. Bottcher, H., Slowik, P. and Suss, W., *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, 1998, 13, 277-281
 45. Falaize, S., Radin, S. and Ducheye, P., *J. Am. Ceram. Soc.*, 1999, 82, 969-976
 46. Kortesuso, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 44, 162
 47. Morpurgo, M., *et al.*, *4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, and Pharmaceutical Technology*, Florence, Italy, 2002.
 48. Gill, I., Ballesteros, A., *Tren. Biotechn.*, 2000 18, 282.
 49. Kortesuso, P, *et al.*, *Biomater.* 2000 21, 193
 50. Sieminska, L., Ferguson, M., Zerda, T. W. and Cough, E., *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, 1997, 8, 1105-1109
 51. Otsuka, M., Tokumitsu, K. and Matsuda, Y., *J. Controlled Release*, 2000, 67, 369-374
 52. Nicoll, S. B., Radin, S., Santos, E. M., *et al.*, *Biomaterials*, 1997, 18, 853-859
 53. Unger, K., Rupprech, H., *et al.*, *Drug Dev. Indus. Pharm.*, 1983, 9, 69-91
 54. Eckert-Lill, C., Lill, N.A., *et al.*; *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13, 1511-1532
 55. Iler, R. K., *The chemistry of silica* 1979
 56. Sieminska, L. and Zerda, T. W., *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 4591-4597
 57. Chang, J. H.; Chang, H. S.; Kim, B. J.; Shin, Y.; Exarhos, G. J.; Kim, K. J. *AdV. Mater.*, 2005, 17, 634
 58. Bogershausen, A., Pas, S. J., Hill, A. J., Koller, H., 2006 *Chem. Mater* 18, 664
 59. Kortesuso, P.; Ahola, M.; Kangas, M; *Int. Journal Pharm* 2001, 221, 107
 60. Ahola *et al.*, *PCT Patent Application WO 97/45367 A1* 1997

61. Kortesuo, P.; Ahola, M.; Kangas M.; *Biomaterials* 2002, 23, 2795
62. Lopez-Quintela M. Arturo; *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2003, 8, 137
63. Arriagada, F.J., Osseo-Asare, K., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 154, 1999, 311–326
64. Holmberg, K., *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004 274, 355–364
65. Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K.D.; Chu, C. T-W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1992, 10834-10843
66. Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S.; *Nature*, 359, 1992, 710-712
67. Raimondi, M. E.; Seddon, J. M.; *Liquid Crystals*, 1999, 26, 3 305-339
68. Myers, D.; *Surfactant science and Tecnology*, VCH: New York 1992
69. Huo, Q.; Margolese, D. I.; Ciesla, U.; Feng, P.; Gier, T. E.; Sieger, P.; Leon, R.; Petroff, P. M.; Schüth, F.; Stucky, G. D.; *Nature*, 1994, 368, 317
70. Vartuli, J. C.; Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Chu, A. S.; McCullen, S. B.; Johnson, I. D.; Sheppard, E. W.; *Chem. Mater.*, 1994, 6, 2070
71. Danumah, Ch.; Zaidi, S. M. J.; Voyer, N.; Giossan, S.; Kaliaguine, S. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1998, 117, 281
72. Chen, C. Y.; Burkett, S. L.; Li, H. X.; Davis, M. E.; *Microporous Mater.*, 1993, 2, 27-30
73. Cheng, C. F.; Luan, Z.; Klinowski, J.; *Langmuir*, 1995, 11, 2815
74. Huo, Q.; Margolese, D. I.; Ciesla, U.; Demuth, D. G.; Feng, P.; Gier, T. E.; Sieger, P.; Firouzi, A.; Chmelka, B. F.; Schüth, F.; Stucky, G. D.; *Chem. Mater.*, 1994, 6, 1176-1191
75. Vartuli, J. C.; Schmitt, K. D.; Kresge, C. T.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; McCullen, S., B.; Hellring, S., D.; Beck, S.; Schlenker, J., L.; Olson, D., H.; Sheppard, E. W.; *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1994, 84, 53-57
76. Monnier, A.; Schuth, F.; Huo, Q.; Kumar, D.; Margolese, D. I.; Maxwell, R. S.; Stucky, G. D.; Krishnamurty, M.; Petroff, P., M.; Firouzi, A.; Janicke, M.; Chmelka, B. F.; *Science*, 1993, 261, 1299
77. Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Roth, W. J.; Schramm, S. E.; *Chem. Mater.*, 1994, 6, 1816-1821
78. Sierra, L.; Guth, J-L., *Microporous and Mesoporous Material*, 1999, 27, 243-253
79. Bagshaw, S., A.; Prouzet, E.; Pinnavaia, T., J.; *Science*, 1995, 269, 1242-45
80. Gimon-Kinsel M. E., Jimenez, V. L., Washmon, L., Balkus, K. J., *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1998, 117, 373-380
81. Han, Y.J., Stucky, G.D., Butler, A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121 9897
82. Wang, Y. and Caruso, F. *Chem. Communication*, 2004, 1528-1529
83. Yang, J., Daehler, A., Stevens, G., O'Connors, A., *Studies in Surface Science and Catalysis*, 2003, 146
84. Yoo, J-W., Mouloungui, Z., *Studies in Surface Science and Catalysis*, 2003, 146
85. Yiu, H.H.P., Botting, C.H., *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2001, 15, 8
86. Moller, K.; Bein, T.; *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1998, 117 53-64
87. Olson, D. H.; Stucky, G. D.; Vartuli, J. C.; *U.S. Patent 5*, 1994, 364, 797
88. Zhao, D., Huo, Q., Feng, J., Chmelka, B. F., Stucky, G. D., *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 6024.
89. Zhao, D., Yang, P., Huo, Q., Chmelka, B. F., Stucky, G. D., *Curr. Opin.*

- Solid State Mater. Sci.* 1998, 3, 111.
90. Yang, H, Coombs, N., Ozin, G. A, *Nature* 1997, 386, 692.
91. Matos, J. R., Mercuri, L. P, Kruk, M., Jaroniec, M., *Chem. Mater.*, 2001, 13, 1726.
92. Vallet-Regi *et al.* *Chem. Mater.* 2001, 13, 308-311
93. Balkus, Jr., Kenneth, J., Decio, H., *United States Patents*, 2003, n° 6,630, 170
94. Charnay C., Begu S., Devoisselle J.M. *et al.*, *Europ. J. of Pharmaceutics and Biofarmaceutics*, 2004, 57, 533-540
95. Doadrio, A.L., Sousa, E.M.B., Doadrio, J.C., Perez Pariente, J., Vallet-Regi, M., *J. of Controlled Release* 2004, 97, 125-132
96. Lay, W., Ducheyne, P., Garino, J., *Bioceramics* 1998, Vol.11, 9
97. Lay, C. Y., Trewyn, B. G., Jeftinija, M., Jeftinija, K., Xu, S., Jeftinija, S., Lin, V. S., *J Am Chem Soc.* 2003, April 16, 125(15):4451
98. Munõz, B., Ramila, A., Pérez-Pariente, J., Diaz, I., Vallet-Regi, M., *Chem. Mater.*, 2003, 15, 500-503
99. Ramila, A., Munõz, B., Pérez-Pariente, J. and Vallet-Regi, M., *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 2003, 26, 1199-1202,
100. Cavallaro, G., Pierro, P., Palumbo, Testa, F., Pasqua, L., Aiello, R., *Drug Delivery*, 2004, 11, 41
101. Horcajada, P., Rámila, A., Pérez-Pariente, J., Vallet-Regí, M., *Microporous and Mesoporous Materials*, 2004, 68, 105-109
102. Pang, J.B., Qiu, K. Y, Wey, Y., *J. of Non-Crystalline Solide* 2001, 283,101
103. Interrante, L. V.; Hampden-Smith, M. J. Eds. *Chemistry of Advanced Materials, An Overview*, Wiley-VCH, 1998.
104. Bescher, E.; Mackenzie, J. D.; *Hybrid Organic-Inorganic Sensors, Materials Sciences and Engineering*, Chap. 6, 1998, 145-154
105. Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., Beck, J. S., *Nature*, 1992, 359, 710-712
106. Tanev, P. T.; Pinnavaia, T. J. *Science* 1995, 267, 865.
107. Bellat, J. P.; Bertrand, O.; Bouvier, F. ; Broyer, M.; François, V.; Maure, S.; Weber, G.; *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1999, 125, 737-744
108. Feng, X., Fryxell., *et al.*, *Science*, 1997, 276, 923
109. Zemanian, T. S., Fryxell, G. E., Liu, J., Mattigod, S., Franz, J. A and Nie, Z., *Langmuir*, 2001, 17, 8172.
110. Yanagisawa, T., Shimizu, T., Kuroda, K. and Kato, C., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1990, 63, 1535.
111. Antochshuk V., and Jaroniec M., *Chem. Commun.*, 1999, 2373.
112. Lin, H.-P., Yang L.-Y., Mou, C.-Y, Liu, S.-B. and Lee H.-K., *New J. Chem.*, 2000, 24, 253.
113. Burkett, S. L., Sims, S. D and Mann S, *Chem. Commun.*, 1996, 1367.
114. Macquarrie, D. J., *Chem. Commun.*, 1996, 1961.
115. Asefa, T., MacLachlan, M. J, Grondy, H., Coombs, N and Ozin, G. A, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 1808.
116. Lim, M. H and Stein, A., *Chem. Mater.*, 1999, 11, 3285.
117. Dong, H., *Accademic Dissertation* Drexel University, 2002
118. Stein A., Melde B. J and Schrodin R. C, *Adv. Mater.*, 2000, 12, 147.
119. Sayari, A and Hamoudi S, *Chem. Mater.*, 2001, 13, 3151
120. Macquarrie D. J, *Green Chem.*, 1999, 195.

121. Mori Y. and Pinnavaia T. J, *Chem. Mater.*, 2001, *13*, 2173.
122. Kruk M., Asefa T., Jaroniec M. and Ozin G. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, *124*, 6383.
123. Kruk M., Asefa T., Jaroniec M. and Ozin G. A, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2002, *141*, 197.
124. Tourné-Peteilh C., Brunel D., Begù S., Chice B., Fajula F., et al., *New J. Chemistry*, 2003, *27*, 1415-1418
125. Babonneau F., Yeung L., Steunou N., Gervais C., Ramila A. and Vallet-Regi M. *J. of Sol-Gel Science and Technology*, 2004, *31*, 219-223
126. Nawal Kishor Mal, Masahiro Fujiwara & Yuko Tanaka, *Letters to nature, Nature*, 2003, *vol. 421*, pg.350
127. Yufang Zhu, Jianlin Shi, Weihua Shen, Xiaoping Dong, Jingwei Feng, Meilin Ruan, and Yongsheng Li, *Angew. Chem.* 2005, *117*, 5213–5217,
128. Tripp, C. P.; Hair, M. L. *Langmuir* 1995, *11*, 149.
129. Tripp, C. P.; Hair, M. L. *Langmuir* 1992, *8*, 1961.
130. A. Corma, J. L. Jorda, M. T. Navarro and F. Rey, *Chem. Commun.*, 1998, 1899.
131. M. Koya and H. Nakajima, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1998, *117*, 243.
132. A. Bhaumik and T. Tatsumi, *J. Catal.*, 2000, *189*, 31.
133. I. Diaz, C. Marquez-Alvarez, F. Mohino, J. Perez-Pariente and E. Sastre, *J. Catal.*, 2000, *193*, 283.
134. I. Diaz, C. Marquez-Alvarez, F. Mohino, J. Perez-Pariente and E. Sastre, *J. Catal.*, 2000, *193*, 295.
135. A. Bhaumik and T. Tatsumi, *Catal. Lett.*, 2000, *66*, 181.
136. N. Igarashi, Y. Tanaka, S.-I. Nakata and T. Tatsumi, *Chem. Lett.*, 1999, 1.
137. J. Joo, T. Hyeon and J. Hyeon-Lee, *Chem. Commun.*, 2000, 1487.
138. Lim, M. H.; Branford, C. F.; Stein, A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, *119*, 4090
139. Macquarrie, D. J. *Chem. Commun.* 1996, 1961.
140. Lim, M. H.; Branford, C. F.; Stein, A. *Chem. Mater.* 1998, *10*, 467.
141. Van Rhijn, W. M.; De Vos, D. E.; Sels, B. F. Bossaert, W. D.; Jacobs, P. A. *Chem. Commun.* 1998, 317.
142. Jones, C. W.; Tsuji, K.; Davis, M. E. *Nature*, 1998, *39*, 52.
143. Fowler, C. E.; Burkett, S. L.; Mann, S. *Chem. Commun.*, 1997, 1769.
144. Yamamoto, K.; Tatsumi, T. *Micropor. Mesopor. Mater.* 2001, *44-45*, 459.
145. Ribeiro Carrott, M. M. L.; Estevao Candeias, A. J.; Carrott, P.J. M.; Unger, K. K. *Langmuir* 1999, *15*, 8895.
146. Zhao, X. S.; Audsley, F.; Lu, G. Q. *J. Phys. Chem. B* 1998, *102*, 4143.
147. Igarashi, N.; Tanaka, Y.; Nakata, S.; Tatsumi, T. *Chem. Lett.* 1999, *1*, 1.
148. Van der Voort, P.; Mathieu, M.; Vansant, E. F. *Stud. Surf. Sci. Catal.* 2001, *135*, 06-P-06.
149. Landau, M. V.; Varkey, S. P.; Herskowitz, M.; Regev, O.; Pevzner, S.; Sen, T.; Luz, Z. *Micropor. Mesopor. Mater.* 1999, *33*, 149.
150. Trong On, D., Zaidi, S. M. J., Kaliaguine, S. *Micropor. Mesopor. Mater.* 1998, *22*, 211.
151. Edler, K. J.; White, J. W. *J. Mater. Chem.* 1999, *9*, 2611.
152. Stein, A.; Melde, B. J.; Schroden, R. C. *Adv. Mater.* 2000, *12*, 1403.
153. Rich J., Korteso P., Ahola M., Yli-Urpo A., Kiesvaara P., and Seppala J., *Int. J. Pharm.*, 2000, *212*, 121-130
154. (a) Langer, R., S.; Peppas, N., A.; *Biomaterials*, 1981, *2*, 201-214; (b)

- Langer, R., *New methods of drug delivery. Science*, 1990, 24, 1527-1533
155. Higuchi T., *J. Pharm. Sci.* 1963, 52 121145
156. European Pharmacopoeia National Formulary
157. CMEC 16 (Complementary Medicines Evaluation Committee), *Sixteenth Meeting* 21 and 22 October 1999
158. www.cabot-corp.com/control
159. Radin S., Ducheyne P., *et al.*, *Bioceramics*, 1998, 11, 529-532
160. Wilson J., Pigott G.H., Shoen F. J., Hench L. L., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1981, 15, 805-817
161. Palumbo G., *J. Mat. Sci. Mat. Med.*, 1997, 8, 417-421
162. Korteso P., "*Academic Dissertation Helsinki*" 2001
163. Corma, A.; *Chem. Rev.*, 1997, 97, 2373-2419
164. Chen, C. Y.; Li, H. X.; Davis, M. E.; *Microporous Mater.* 1993, 2, 17-26
165. Zhao, X., S.; Lu, G., Q., (Max); Millar, G., J.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1996, 35, 2075-2090
166. Gregg, S. J.; Sing, K. S. W.; *Adsorption, Surface Area and Porosity*, Academic Press: London, 1982
167. Galarneau A., Desplantier D., Dutartre R., Di Renzo F., *Microporous and Mesoporous Mat.*, 1999, 27, 297-308
168. Halsey, G. D.; *Adv. Catal.*, 4, 1952, 263
169. Defay, R.; Prigogine, I.; Bellemans, A.; Everett, D. H.; *Surface Tension and Adsorption*, Longmans: London, 1966, 257-258
170. Zhuravlev, L., T.; *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect* 2000 173, 1-38
171. Ciesla, U.; Grün, M.; Isajeva, T.; Kurganov, A. A.; Neimark, A. V.; Ravikovitch, P.; Schacht, S.; Schüth, F.; Unger, K. K.; Pinnavaia, T. J.; Thorpe, M. F.; *Access in Nanoporous Materials, Plenum: New York*, 1995, 231
172. Llewellyn, P. L.; Grillet, Y.; Schüth, F.; Reichert, H.; Unger, K. K.; *Microporous Mat.*, 3, 345 1994)
173. Alfredsson, V.; Keung, M.; Monnier, A.; Stucky, G. D.; Unger, K. K.; Schüth, J.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 921, 1994
174. http://ncl.cancer.gov/working_assay-cascade.asp
175. <http://www.dpci.unipd.it/biomateriali>
176. http://en.wikipedia.org/wiki/Contact_angle
177. Howland R. and Benatar A *practical guide to scanning probe microscopy*, Park Scientific Instruments 1997 o <http://mechmat.caltech.edu/~kaushik/park>
178. <http://web.mit.edu/cortiz/www/nanomechanics.html>
179. <http://www.malvern.co.uk>
180. <http://www.malvern.co.uk/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>
181. <http://www.physchem.uni-freiburg.de/pc-kolloide/htmlen/scherer/ensls.html>
182. [http://www.malvern.co.uk/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LD E.htm](http://www.malvern.co.uk/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LD_E.htm)
183. <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1465007a.pdf>,
184. Decker, T. and Lohmann-Matthes, M-L. *J. Immunol. Methods* 1988, 115, 61
185. Korzeniewski, C. and Callewaert, D.M. *J. Immunol. Methods* 1983, 64, 313.
186. Rae, T. *J. Biomed. Mater. Res.* 1977, 11, 839,
187. Rae, T. *J. Bone Jt. Surg* 1975, 57-B, 444 ;
188. Rae, T. *J. Bone Jt. Surg.* 1981, 63-B, 435

189. Mosmann, T *et al. J Immunology Methods* 1983, 65, 55
190. Hidalgo I., J., Raub T., J. and Borchardt R.T, *Gastroenterology*, 1989: 96-736-49
191. Goodman-Gilman *Basi Farmacologiche della terapia*, IX edizione, 1997
192. Moffat, Osselton, Widdop, *Clarck's: Analysis of drug and poisons*, 1048-1049
193. Bogershausen Ansgar, Pas Steven J., Hill Anita J, and Hubert Koller, *Chem. Mater.* 2006, 18, 664-672
194. Akimitsu Kugimiya, Takasi Mukawa and Toshifumi Takeuchi, *The analyst* 2001, 126, 772
195. Babonneau Florence, Leite Lorraine and Fontlupt Stephanie, *J. of Mat. Chem.* 1999, 9, 175
196. Kruk M., Asefa T., Jaroniec M. and Ozin G. A., *J. Mat. Chem.*, 2002, 12, 3452.
197. R. Ryoo, I.-S. Park, S. Jun, C. W. Lee, M. Kruk and M. Jaroniec, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 1650.
198. Mattigod S.V., Liu J., Fryxell G. E., Gong M., Nie Z., Feng X., *et al* PNNL 12007
199. Israelachvili J., *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London, 1992, 323.
200. Hong Yang, Gregory Vovk, Neil Coombs, Igor Sokolov and Geoffrey A. Ozin, *J. Mater. Chem.*, 1998, 8(3), 743