



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Preparazione e caratterizzazione chimico-fisica di nanocarriers
farmaceutici innovativi a base di ZIF-8 e acidi grassi per il rilascio
controllato di ketoprofene e curcumina

Relatore: Prof.ssa Chiara Milanese

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Sabrina Greggio

Anno Accademico 2025/2026

*A mia Zia, che ha sempre creduto in me e nelle mie capacità
Spero che oggi, da lassù, tu sia orgogliosa di me*

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. MOFs (<i>METAL ORGANIC FRAMEWORKS</i>)	3
1.2. ZIF-8 (<i>ZEOLITIC IMIDAZOLATE FRAMEWORK-8</i>)	4
1.3. KETOPROFENE.....	6
1.3.1. Meccanismo d'azione di Ketoprofene	7
1.3.2. Limiti biofarmaceutici di Ketoprofene	8
1.4. CURCUMINA	9
1.4.1. Proprietà terapeutiche di Curcumina	10
1.4.2. Limiti biofarmaceutici di Curcumina	11
1.5. MATERIALI A CAMBIAMENTO DI FASE (<i>PHASE CHANGE MATERIALS, PCMs</i>)	12
1.5.1. Miscele eutettiche di acidi grassi	12
2. TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE	15
2.1. CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC)	15
2.1.1. Descrizione della strumentazione	16
2.1.2. Procedura sperimentale	17
2.2. DIFFRAZIONE A RAGGI X SU POLVERI (XRPD).....	17
2.2.1. Descrizione della strumentazione	18
2.2.2. Procedura sperimentale	19
2.3. SPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATATA DI FOURIER (FT-IR).....	19
2.3.1. Descrizione della strumentazione e modalità ATR.....	20
2.3.2. Procedura sperimentale	20
2.4. MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).....	21
2.4.1. Descrizione della strumentazione	21
2.4.2. Procedura sperimentale	22
3. MATERIALI E METODI.....	23
3.1. MATERIALI	23
3.2. METODO SPERIMENTALE	25
3.2.1. Sintesi di ZIF-8	25
3.2.2. Sintesi one-pot di ZIF-8@Ketoprofene.....	26
3.2.3. Sintesi one-pot di ZIF-8@Curcumina	28
3.2.4. Preparazione delle miscele eutettiche di acidi grassi	29
3.2.5. Rivestimento dei sistemi ZIF-8@Ketoprofene e ZIF-8@Curcumina con miscela eutettica ternaria MAPALA	33
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	35
4.1. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI ZIF-8.....	35

4.1.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC).....	35
4.1.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)	36
4.1.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	37
4.2. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI KETOPROFENE	39
4.2.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC).....	39
4.2.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)	39
4.2.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	40
4.3. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI ZIF-8@KETOPROFENE	42
4.3.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC).....	42
4.3.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)	43
4.3.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	44
4.3.4. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)	46
4.4. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI CURCUMINA.....	48
4.4.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC).....	48
4.4.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)	49
4.4.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	50
4.5. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI ZIF-8@CURCUMINA	51
4.5.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC).....	51
4.5.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)	52
4.5.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	54
4.5.4. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)	55
4.6. ANALISI DSC DI ACIDO LAURICO, ACIDO MIRISTICO E ACIDO PALMITICO	58
4.7. ANALISI DSC DI MISCELE EUTETTICHE DI ACIDI GRASSI (PCM)	61
4.7.1. Miscele Binarie di Acidi Grassi.....	61
4.7.2. Miscele Ternarie di Acidi Grassi	63
4.8 ANALISI DSC DEI SISTEMI FINALI ZIF-8@KETOPROFENE@PCM E ZIF-8@CURCUMINA@PCM ...	70
4.8.1. Analisi DSC di ZIF-8@KETOPROFENE@PCM	71
4.8.2. Analisi DSC di ZIF-8@CURCUMINA@PCM	73
4.8.3. CONFRONTO TRA ZIF-8@KETOPROFENE@PCM E ZIF-8@CURCUMINA@PCM	75
5. CONCLUSIONI.....	76
6. PROSPETTIVE FUTURE	76
BIBLIOGRAFIA.....	77
Elenco delle figure	78
Elenco delle tabelle	80
RINGRAZIAMENTI	81

ABSTRACT

Negli ultimi anni, lo sviluppo di sistemi avanzati di somministrazione farmaceutica (*Drug Delivery Systems*, DDS) si è focalizzato sulla progettazione di vettori nanostrutturati capaci di proteggere il principio attivo e modularne il rilascio in risposta a stimoli fisiologici specifici. Tra questi, i *Zeolitic Imidazolate Frameworks-8* (ZIF-8), una sottoclasse di composti metallo-organici (MOFs), presentano proprietà chimico-fisiche idonee quali elevata area superficiale, porosità modulabile, biocompatibilità e possibilità di degradazione a pH acido. L'elevata porosità di ZIF-8, però, mostra anche delle sfide come il possibile rilascio prematuro di farmaco in condizioni basiche o neutre.

Il presente lavoro di tesi propone una strategia innovativa per il superamento di questo limite tramite la progettazione di sistemi ibridi stimolo-responsivi. Due differenti molecole modello con nota attività antinfiammatoria ma anche limiti biofarmaceutici, il Ketoprofene (FANS tradizionale sintetico) e la Curcumina (polifenolo naturale idrofobo), sono state incapsulate separatamente all'interno della matrice dello ZIF-8. L'incorporazione dei *guest* è stata condotta mediante una strategia di sintesi *one-pot* in mezzo idro-alcolico a temperatura ambiente, permettendo l'intrappolamento dei principi attivi contestualmente alla nucleazione del network cristallino.

I sistemi sintetizzati sono stati sottoposti a caratterizzazione chimico-fisica: l'analisi in Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC) ha mostrato l'elevata stabilità termica dei sistemi farmaceutici preparati, l'analisi di diffrazione a raggi X su polveri (XRPD) e la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) hanno confermato il mantenimento dell'integrità strutturale e della cristallinità dello ZIF-8 dopo l'inserimento di ketoprofene e curcumina. Infine, l'indagine mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) ha permesso di valutare la morfologia dei cristalli.

Successivamente, per funzionalizzare lo ZIF-8 è stata sintetizzata una miscela eutettica ternaria composta da acido laurico, acido miristico e acido palmitico. La composizione della miscela lipidica è stata ottimizzata per ottenere una transizione di fase solido-liquido confinata nell'intervallo termico fisiologico e febbrile di 37-38°C, agendo così come un interruttore termico (*gatekeeper*) sensibile alla temperatura

corporea. I sistemi caricati (ZIF-8@Ketoprofene e ZIF-8@Curcumina) sono stati quindi rivestiti con tale matrice eutettica.

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) ha dimostrato il profilo termico idoneo della miscela eutettica e lo stato fisico amorfo dei principi attivi confinati, ma ha evidenziato un comportamento termico differente in base alla natura chimica del guest: mentre il sistema basato su Curcumina ha mantenuto il profilo di fusione target (37-38°C), la spiccata affinità chimica del Ketoprofene per la matrice lipidica ha indotto un marcato abbassamento crioscopico, riducendo eccessivamente la temperatura di transizione del rivestimento.

In conclusione, lo studio ha dimostrato l'importanza cruciale delle interazioni farmaco-matrice nella progettazione di vettori intelligenti. Sebbene entrambi i sistemi rappresentino approcci sintetici validi, il sistema ZIF-8@Curcumina@PCM si è rivelato strutturalmente ottimale per un rilascio termo-programmato a temperatura corporea, mentre l'impiego del Ketoprofene richiede una successiva rimodulazione della quota lipidica per compensare l'effetto osservato.

I risultati ottenuti pongono le basi per lo sviluppo di una piattaforma terapeutica intelligente "smart" e versatile, potenzialmente applicabile al trattamento localizzato o sistemico di stati infiammatori attraverso un rilascio a doppio stimolo di pH e temperatura.

1. INTRODUZIONE

I veicoli farmaceutici (*drug carriers* o *drug delivery systems*) rappresentano approcci tecnologici avanzati per ottimizzare la somministrazione di farmaci e molecole bioattive. Tra i vantaggi si trova l'aumento della biodisponibilità, il rilascio controllato e sostenuto, il targeting al sito d'azione, la maggior aderenza terapeutica e la riduzione significativa degli effetti collaterali. (1)

1.1. MOFs (METAL ORGANIC FRAMEWORKS)

Una delle frontiere più promettenti nella nanomedicina come sistema di trasporto per farmaci (*drug delivery system*) è rappresentata dalla classe dei *Metal Organic Frameworks* (MOFs), materiali cristallini altamente porosi costruiti a partire da ioni metallici e leganti organici, che grazie alle loro caratteristiche di elevata porosità, stabilità termica e chimica, ampia area superficiale interna, bassa tossicità e modulabilità della struttura sono ottimi potenziali sistemi utili nella veicolazione e nel rilascio controllato dei farmaci. (2,3)

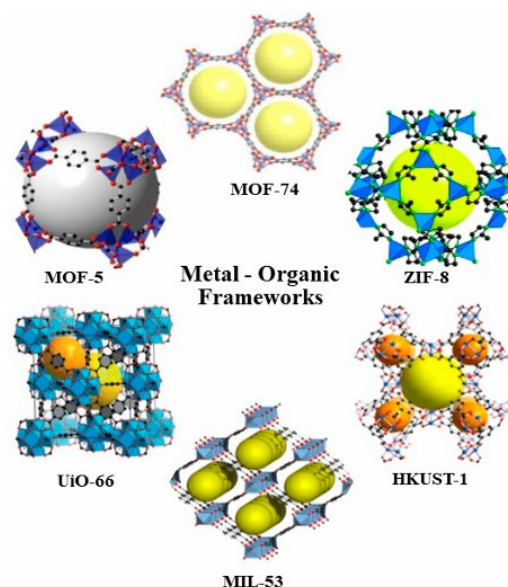


Figura 1.1 Esempi di tipici metal-organic frameworks (1)

Secondo il principio *HSAB* (*Pearson's hard and soft acids and bases principle*), i MOFs stabili possono formarsi sia tramite l'assemblaggio di basi *hard* (come i leganti carbossilato) con ioni metallici ad alto stato di ossidazione [come Ti(IV), Zr(IV), Al(III),

Fe(III) e Cr(III)], sia tramite l'assemblaggio di basi *soft* (come leganti imidazolato, pirazolato, triazolato e tetrazolato) con ioni divalenti *soft* [come Zn(II), Cu(II), Mn(II)]. (3)

1.2. ZIF-8 (ZEOLITIC IMIDAZOLATE FRAMEWORK-8)

ZIF-8 (*Zeolitic Imidazolate Framework-8*) fa parte della famiglia dei MOFs, studiato come potenziale veicolo farmaceutico grazie alle sue caratteristiche di elevata porosità e di conseguenza elevata capacità di carico, relativa bassa tossicità, stabilità termica. ZIF-8 si forma a partire da ioni zinco Zn(II) e leganti metilimidazolici che formano una struttura con morfologia rombica dodecaedrica o cubica. (2,4)

Una delle caratteristiche che rende ZIF-8 un promettente veicolo farmaceutico è sicuramente la sua degradazione sensibile al pH, in questo modo è possibile indirizzare il rilascio del principio attivo contenuto; a pH acido, infatti, la protonazione dei linkers imidazolici provoca la decomposizione della struttura e lo rende adatto al rilascio di attivi mirati ad esempio a cellule tumorali o a tessuti che presentano un pH inferiore rispetto alle cellule sane e questo riduce anche i possibili effetti collaterali. (2)

Sintesi di ZIF-8

La sintesi utilizza condizioni sperimentali che influenzano la porosità, morfologia e cristallinità del prodotto; pertanto, è importante scegliere correttamente il metodo di sintesi.

Questi metodi includono sintesi elettrochimica, assistita da microonde, meccanochimica, idrotermale, sonochimica e a temperatura ambiente.

La sintesi a temperatura ambiente, utilizzata in questo progetto di tesi, è di grande importanza per soddisfare la domanda di chimica sostenibile (*green chemistry*) e sostituisce l'utilizzo di solventi organici nocivi con acqua; consiste nel miscelare la soluzione contenente lo ione metallico e quella contenente il legante organico, con aggiunta di una base che aumenti il pH e favorisca la deprotonazione del legante organico, in una specifica proporzione e mantenere in agitazione fino a reazione completata. (1,4,5)

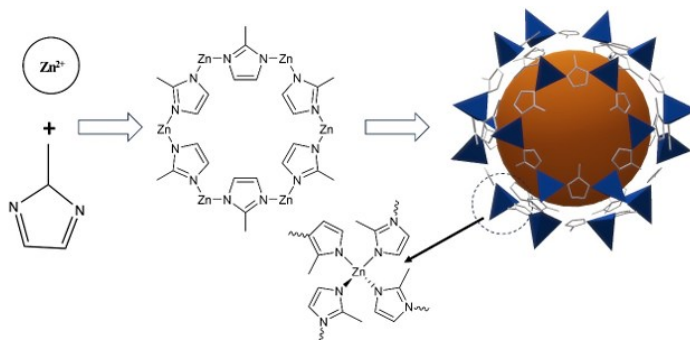


Figura 1.2 Rappresentazione schematica del processo di sintesi di ZIF-8 (2)

Metodi di incapsulamento di principi attivi in ZIF-8

Il meccanismo principale mediante il quale ZIF-8 rilascia principi attivi consiste nell'incapsularli nei pori, preservando l'integrità strutturale del reticolo e permettendo al contempo un rilascio controllato. Vengono utilizzati due metodi per incapsulare farmaci in ZIF-8: il primo metodo è l'incapsulamento post-sintetico, che consiste nel sintetizzare ZIF-8 prima e incapsulare il farmaco successivamente, il secondo metodo è quello della sintesi in un unico passaggio (*one pot*) che prevede l'incapsulamento del farmaco durante la sintesi del network cristallino di ZIF-8, la soluzione madre di farmaco viene quindi aggiunta contestualmente alle soluzioni dei precursori. (4)

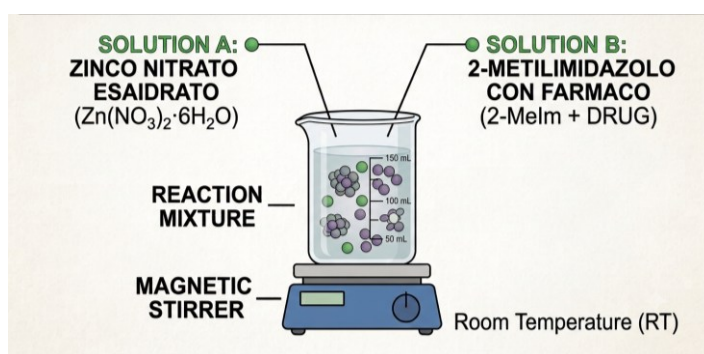


Figura 1.3 Schema di sintesi one-pot (Immagine creata con Gemini-AI)

Come molecole modello da incapsulare separatamente in ZIF-8 tramite sintesi one-pot sono state scelte: *ketoprofene*, farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS) di sintesi appartenente alla classe II del Sistema di Classificazione Biofarmaceutica (BCS) ed avente quindi caratteristiche di bassa solubilità in ambiente acquoso ed alta permeabilità intestinale (6) e *curcumina*, principale molecola attiva polifenolica estratta dalla radice di *Curcuma longa*, responsabile del suo caratteristico colore giallo-arancio, con spiccate proprietà antinfiammatorie e antiossidanti ma con un grande svantaggio ovvero una bassa biodisponibilità orale, appartiene infatti alla classe IV del Sistema di Classificazione Biofarmaceutica (BCS) con scarsa solubilità in acqua e bassa permeabilità intestinale. (7)

1.3. KETOPROFENE

Il ketoprofene (*RS*)- acido 2-[3-(benzoil)fenil]propanoico è un farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS), derivato dell'acido propionico, ampiamente utilizzato nella pratica clinica per le sue spiccate proprietà analgesiche, antinfiammatorie ed antipiretiche. Ha un peso molecolare di 254.3 g/mol e una formula chimica $C_{16}H_{14}O_3$. (6)

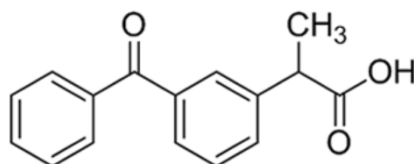


Figura 1.4 Formula di struttura di ketoprofene

Dal punto di vista strutturale presenta:

- **Gruppo Carbossilico -COOH:** è la porzione acida tipica dei FANS derivati dell'acido propionico. Questo gruppo è fondamentale per l'interazione con l'enzima bersaglio, ma è anche responsabile della tipica irritazione gastrointestinale.
- **Centro Chirale:** la molecola possiede un atomo di carbonio asimmetrico nel gruppo propionico, rendendola una miscela racemica di due enantiomeri (l'isomero attivo è principalmente l'enantiomero S responsabile delle azioni

farmacologiche e farmacodinamiche. L'enantiomero R ha un'attività terapeutica inferiore o nulla)

- **Gruppo Benzoile:** la presenza del gruppo benzoile (un anello fenilico legato tramite un ponte chetonico all'anello aromatico centrale) aumenta la lipofilia della molecola e la sua affinità di legame con i canali idrofobici delle ciclossigenasi (COX-1 e COX-2).

La sua particolare conformazione chimica gli permette di legarsi in modo non selettivo e reversibile agli enzimi ciclossigenasi, bloccando la sintesi delle prostaglandine mediatrici del dolore e dell'infiammazione.

1.3.1. Meccanismo d'azione di Ketoprofene

Il ketoprofene svolge la sua azione antinfiammatoria e analgesica inibendo la ciclossigenasi (COX), un enzima di cui si conoscono tre diverse isoforme: COX-1, COX-2 e COX-3.

La COX-1 è un'isoforma costitutiva, normalmente presente nelle cellule e coinvolta nei meccanismi di omeostasi cellulare, la COX-2, invece, è un'isoforma inducibile che viene prodotta dalle cellule infiammatorie (citochine infiammatorie) attivate. Questi enzimi convertono l'acido arachidonico presente nel nostro organismo in prostaglandine, prostacicline e trombossani.

Le prostaglandine, e in particolare le prostaglandine G_2 e H_2 (PGG_2 e PGH_2), sono coinvolte nei processi infiammatori e mediano le risposte dolorose. Mentre le prostaglandine E (PGE) inducono l'aumento della temperatura corporea, quindi, inducono la febbre. Pertanto, con l'inibizione dell'attività della COX-2, il ketoprofene impedisce la sintesi delle prostaglandine responsabili d'infiammazione e dolore.

Tuttavia, il ketoprofene non è selettivo nei confronti della COX-2, perciò, è in grado di inibire anche la COX-1. Quest'ultima inibizione è all'origine di alcuni degli effetti collaterali tipici di tutti i FANS non selettivi (effetti collaterali di tipo gastrointestinale).
(8)

Il ketoprofene esercita anche un'azione antagonista nei confronti della bradichinina, un neurotrasmettitore rilasciato durante i processi infiammatori responsabile dell'attivazione dei recettori periferici del dolore.

Infine, il ketoprofene è anche in grado di inibire la sintesi dei leucotrieni (molecole implicate nei processi infiammatori) e di ridurre la migrazione dei leucociti nelle giunture infiammate.

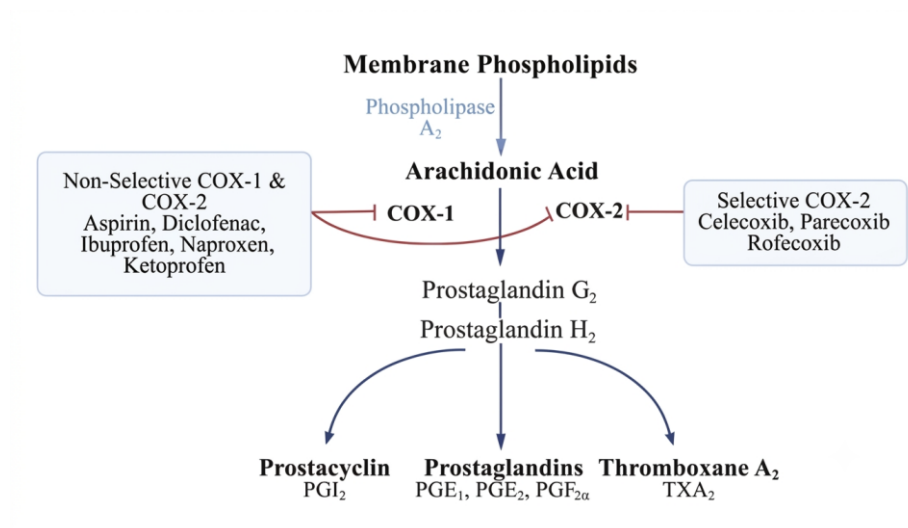


Figura 1.5 Meccanismo d'azione dei FANS (da [8] modificata con AI)

1.3.2. Limiti biofarmaceutici di Ketoprofene

Il ketoprofene si presenta come una molecola lipofila ($3.1 < \log P < 3.6$) caratterizzata da una funzione acida carbossilica terminale ($pK_a \sim 4.5$). I limiti biofarmaceutici che ne condizionano l'assorbimento e la tollerabilità sono:

- **Scarsa solubilità in ambiente acquoso:** la forma acida è praticamente insolubile in acqua e questo ne limita la velocità di dissoluzione e conseguentemente la sua biodisponibilità
- **Tossicità gastrointestinale:** essendo un forte inibitore delle prostaglandine che proteggono la mucosa gastrica, provoca effetti collaterali come irritazione, gastrite e aumento di rischio di ulcere

Per superare questi limiti e migliorarne la biodisponibilità, la ricerca farmaceutica ha sviluppato la salificazione con lisina che produce una forma più idrosolubile e garantisce un assorbimento più rapido e una migliore tollerabilità gastrica.

1.4. CURCUMINA

La curcumina [1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione] è la principale molecola bioattiva polifenolica (curcuminoide) estratta dal rizoma della *Curcuma Longa*. È un diferuloilmetano con formula chimica $C_{21}H_{20}O_6$, massa molecolare di 368.39 g/mol e colore giallo-arancio cristallino. (9)

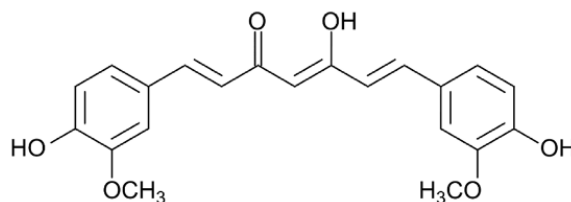


Figura 1.6 Formula di struttura di curcumina [9]

Dal punto di vista strutturale presenta:

- **Due anelli aromatici:** sono costituiti da anelli fenolici sostituiti con un gruppo ossidrilico (-OH) e un gruppo metossilico (-OCH₃) in posizione *orto*. Questi gruppi garantiscono le spiccate proprietà antiossidanti della molecola.
- **Catena alifatica centrale:** gli anelli sono collegati da una catena di 7 atomi di carbonio che contiene un gruppo beta-dicarbonilico (forma chetonica).
- **Doppi legami coniugati:** i doppi legami (in configurazione *trans*) si alternano lungo la catena, formando un sistema esteso di elettroni π delocalizzati. Questo sistema conferisce alla curcumina il suo tipico colore giallo intenso, le proprietà fluorescenti e la capacità di assorbire la luce UV.

Chimicamente esibisce un tautomerismo cheto-enolico con una predominante forma chetonica in ambienti acidi o neutri e una predominante forma enolica, più stabile, in ambienti basici e allo stato solido. (9)

1.4.1. Proprietà terapeutiche di Curcumina

Molti effetti biologici sono associati all'uso di curcumina. La ricerca si focalizza maggiormente sul suo potenziale antinfiammatorio, antiossidante ed antitumorale ma come indicato in *Figura 1.6* presenta anche effetti antimicrobici, cardioprotettivi, neuroprotettivi, antireumatici ed epatoprotettivi.

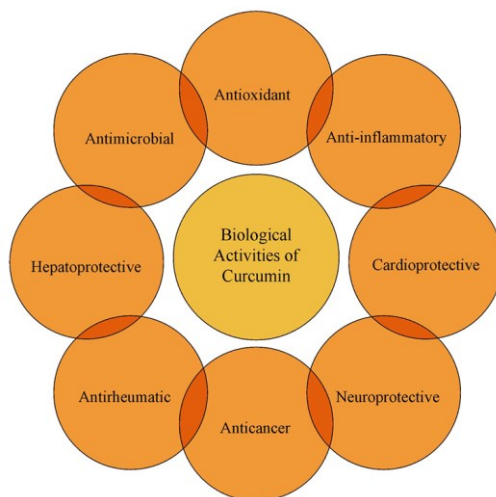


Figura 1.7 Schema illustrativo delle attività biologiche di Curcumina [9]

La curcumina esplica il suo potenziale antiossidante eliminando le specie reattive dell'ossigeno (ROS) come radicali superossido, perossido d'idrogeno e radicali ossido nitrico (NO), inibendo anche la perossidazione lipidica.

Dal punto di vista antinfiammatorio la curcumina può inibire i fattori di trascrizione pro-infiammatori (NF- κ B e AP-1) e ridurre le citochine proinfiammatorie come TNF α , IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8. Inoltre, potrebbe ridurre lo stress ossidativo e l'infiammazione tramite la via Nrf2

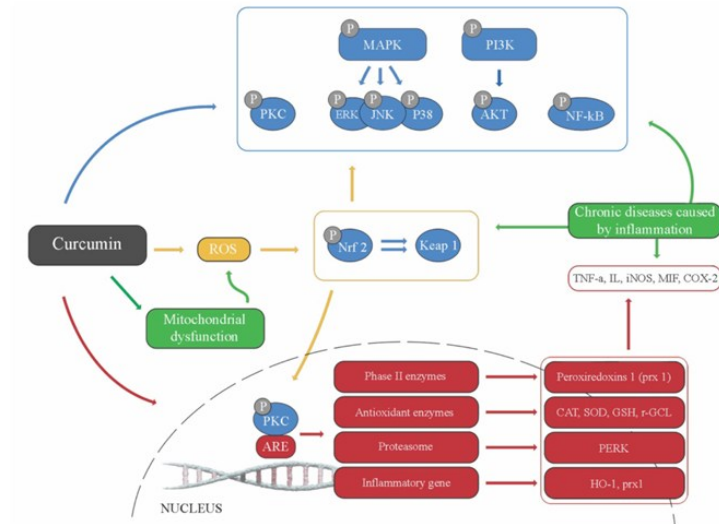


Figura 1.8 Meccanismo antinfiammatorio di curcumina [9]

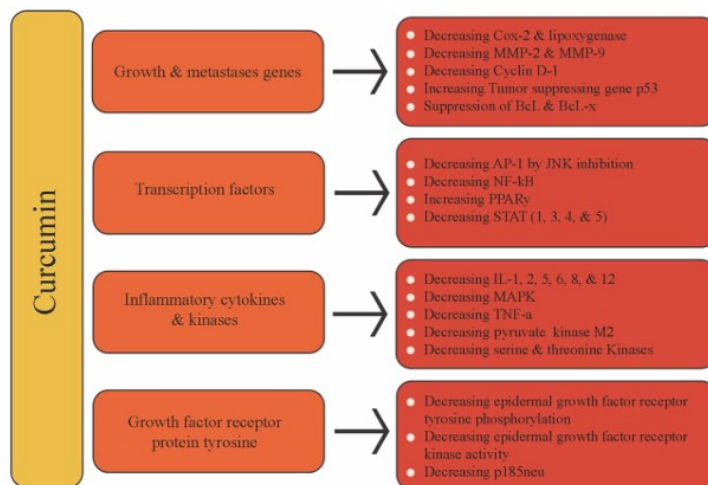


Figura 1.9 Target molecolari di curcumina nelle cellule tumorali [9]

È stato dimostrato anche il potenziale antitumorale di curcumina, che previene la carcinogenesi influenzando due processi: angiogenesi (inibisce gli stimolatori dei fattori angiogenici come VEGF e il fattore di crescita dei fibroblasti basici) e crescita delle cellule tumorali. È anche in grado di sopprimere le metastasi delle

cellule tumorali e indurre apoptosi delle cellule cancerose (tramite una via dipendente da p53 che è una delle proteine oncosoppressive più importanti). (9)

1.4.2. Limiti biofarmaceutici di Curcumina

Nonostante le innumerevoli proprietà terapeutiche della curcumina, la sua efficacia è strettamente limitata dalle sue proprietà farmacocinetiche, principalmente a causa dell'insolubilità in ambiente acquoso e della bassa biodisponibilità dovuta a basse concentrazioni ematiche libere, distribuzione tissutale limitata, breve emivita e rapido metabolismo epatico ed intestinale. Inoltre, la sua lipofilia gioca un ruolo chiave

nell'assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione (ADME). Questi fattori riducono la quantità di curcumina che raggiunge gli organi bersaglio.

La curcumina mostra anche una spiccata fotosensibilità: sotto l'effetto della luce solare o dei raggi UV subisce una rapida fotodegradazione e le sue proprietà biologiche vengono meno.

Per superare questi limiti la ricerca si sta concentrando su formulazioni tecnologiche avanzate come:

- **Associazione con adiuvanti:** l'aggiunta di piperina (estratto di pepe nero) ne aumenta la biodisponibilità
- **Complessi fosfolipidici:** ne aumentano la capacità di attraversare le membrane cellulari
- **Nanoparticelle:** favoriscono una maggior penetrazione nei tessuti (9)

Ketoprofene e curcumina sono quindi i candidati ideali per essere incapsulati in nanocarriers farmaceutici intelligenti che ne possano migliorare la biodisponibilità e l'assorbimento.

1.5. MATERIALI A CAMBIAMENTO DI FASE (*PHASE CHANGE MATERIALS, PCMs*)

I materiali a cambiamento di fase (*Phase Change Materials, PCMs*) sono sostanze che assorbono o rilasciano calore latente quando subiscono un cambiamento del loro stato fisico, che solitamente è il passaggio tra stato solido e stato liquido. Durante il riscaldamento o il raffreddamento subiscono quindi un cambiamento di fase quando raggiungono una temperatura specifica.

Tali materiali vengono classificati in due categorie: a cambiamento di fase inorganici e a cambiamento di fase organici. Tra questi ultimi vi sono anche gli acidi grassi come laurico, miristico, palmitico e stearico che essendo biocompatibili, biodegradabili e stabili possono essere efficacemente integrati nei sistemi di *drug delivery* per ottenere un rilascio termoresponsivo. (4,10)

1.5.1. Miscele eutettiche di acidi grassi

Una miscela eutettica è un sistema formato da 2 o più acidi grassi che ha un punto di fusione inferiore rispetto a quello dei singoli componenti; essa, permette, in opportune condizioni, di controllare il rilascio di attivi alla temperatura desiderata.

I PCM a base di acidi grassi sono molto studiati come metodo di drug delivery grazie alla loro abbondanza in natura, bassa tossicità, biodegradabilità, e versatilità. (11)

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati Acido Laurico, Acido Miristico e Acido Palmitico per preparare una miscela eutettica ternaria e successivamente rivestire la struttura ZIF-8 contenente i principi attivi.

ACIDO LAURICO

L'acido laurico ha formula chimica $C_{12}H_{24}O_2$, è un acido grasso saturo a media catena (MCFA). Si trova principalmente nell'olio di cocco e di palma. Ha il punto di fusione più basso tra i 3 acidi considerati ed è spesso utilizzato per abbassare il punto di fusione della miscela finale verso il valore di temperatura corporea.

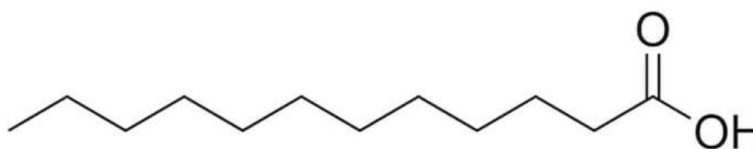


Figura 1.10 Formula di struttura di Acido Laurico

ACIDO MIRISTICO

L'acido miristico ha formula chimica $C_{14}H_{28}O_2$ ed è un acido grasso saturo a catena lunga, estratto principalmente dalla noce moscata, dall'olio di cocco e di palma.

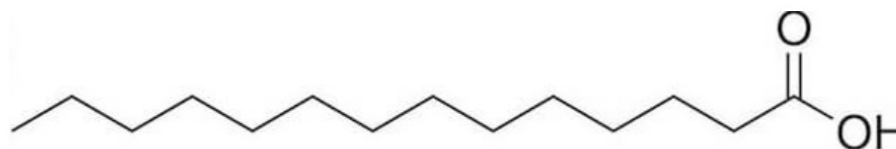


Figura 1.11 Formula di struttura di Acido Miristico

ACIDO PALMITICO

L'acido palmitico ha formula chimica $C_{16}H_{32}O_2$ ed è l'acido grasso saturo più diffuso in natura. È un acido grasso saturo a lunga catena che costituisce il 20-30% dei fosfolipidi di tutte le membrane cellulari umane. Estratto dall'olio di palma. Ha il punto di fusione più alto.

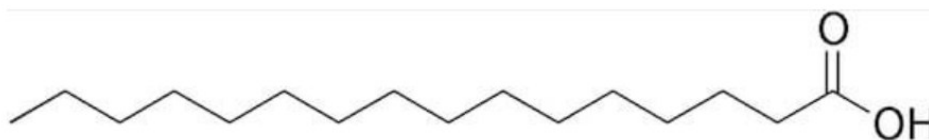


Figura 1.12 Formula di struttura di Acido Palmitico

L'obiettivo di questo lavoro è quindi la progettazione e la caratterizzazione di un sistema di veicolazione ibrido e innovativo combinando le proprietà del framework metallo-organico ZIF-8 con la versatilità chimico-fisica di miscele eutettiche di acidi grassi. Con questo approccio sinergico si intende sviluppare nanocarriers capaci di massimizzare l'efficacia terapeutica e ottimizzare il profilo farmacocinetico di attivi scarsamente solubili.

2. TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE

2.1. CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*) è una tecnica di analisi termica utilizzata per lo studio delle proprietà termiche e chimico-fisiche dei materiali che consente di misurare le variazioni di flusso di calore verso o da un campione rispetto ad un materiale di riferimento in funzione di una variazione controllata di temperatura. Con questa tecnica è possibile studiare transizioni di fase come fusione e cristallizzazione ma anche determinare la temperatura di transizione vetrosa (T_g), e la capacità termica dei materiali.

La tecnica DSC è ampiamente utilizzata in ambito farmaceutico perché permette la caratterizzazione dello stato solido dei principi attivi, lo studio del polimorfismo, la valutazione della purezza, lo studio della stabilità fisica delle formulazioni e la caratterizzazione di sistemi amorfi e dispersioni solide.

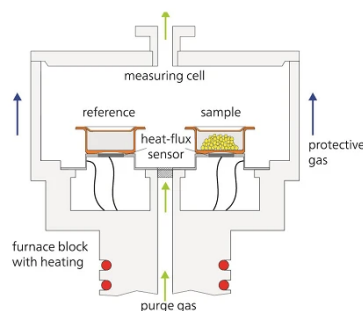


Figura 2.1 Schema cella di misura DSC

Il principio si basa sulla misura della differenza di flusso di calore (dQ/dt) necessaria per mantenere un campione e un riferimento (solitamente un crogiolo vuoto) alla stessa temperatura mentre vengono sottoposti a un programma di riscaldamento o raffreddamento controllato. Il segnale risultante, espresso in mW, permette di identificare:

- **Transizioni del primo ordine:** come fusione e cristallizzazione (picchi endotermici o esotermici).

- **Transizioni del secondo ordine:** come la transizione vetrosa (T_g), visibile come un gradino rispetto alla linea di base dovuto alla variazione del calore specifico (C_p).

2.1.1. Descrizione della strumentazione

Per la caratterizzazione termica dei campioni è stato impiegato un calorimetro **TA Instruments Q2000**.

Questo strumento opera secondo il principio del **flusso di calore (heat flux)** e si distingue per l'integrazione della tecnologia **Tzero™**, che permette una misura diretta della capacità termica e una linea di base estremamente stabile e piatta.



Figura 2.2 Strumento utilizzato per analisi DSC

Le componenti chiave dello strumento includono:

- **Cella di misura:** realizzata in argento per garantire un'uniformità termica ottimale, contiene i sensori a disco sui quali vengono posizionati i crogioli.
- **Autosampler:** lo strumento è dotato di un sistema di caricamento automatico (visibile nella parte destra della *figura 2.2*) che garantisce la riproducibilità del posizionamento dei campioni e permette sessioni di misura multi-campione senza intervento manuale.
- **Sistema di raffreddamento:** il Q2000 è tipicamente accoppiato a un sistema di raffreddamento (RCS o azoto liquido) che consente di operare in un range di temperatura esteso, partendo da valori sotto lo zero termico.



Figura 2.3 Dettaglio interno alloggiamenti crogioli

2.1.2. Procedura sperimentale

I campioni (circa 3-5 mg) sono stati pesati con una bilancia analitica di precisione e posti in crogioli di alluminio aperti. Un crogiolo vuoto della stessa tipologia è stato utilizzato come riferimento per bilanciare la capacità termica del sistema.

I vari programmi termici utilizzati per ogni campione sono indicati nelle sezioni corrispondenti del *Capitolo 4*.

L'analisi dei dati, inclusa l'integrazione delle aree dei picchi per il calcolo delle entalpie (ΔH) e la determinazione delle temperature caratteristiche (T_{onset} , T_{peak}), è stata effettuata mediante il software **TA Instruments Universal Analysis**.

Durante l'analisi DSC, il campione può subire trasformazioni fisiche o chimiche (ad esempio fusione, cristallizzazione, transizioni vetrose, polimorfismo, decomposizione), che comportano un assorbimento o un rilascio di calore. Tali eventi si manifestano nel termogramma come picchi endotermici o esotermici, la cui posizione (temperatura di onset e di picco) e area (entalpia associata alla transizione) forniscono informazioni quantitative e qualitative sulle proprietà del materiale analizzato.

Le analisi sono state effettuate in atmosfera dinamica di azoto (50 mL/min), al fine di prevenire fenomeni ossidativi.

2.2. DIFFRAZIONE A RAGGI X SU POLVERI (XRPD)

La diffrazione a Raggi X è una tecnica analitica fondamentale per determinare la struttura atomica e molecolare dei materiali cristallini, basata sulla diffusione e interferenza dei raggi X da parte degli atomi.

La tecnica di diffrattometria a raggi X su polveri (XRPD) è stata impiegata per l'identificazione delle fasi cristalline e per lo studio del grado di cristallinità dei campioni. Il principio fisico si basa sull'interazione tra un fascio incidente di raggi X monocromatici e gli elettroni degli atomi disposti ordinatamente nel reticolo cristallino.

Quando le condizioni soddisfano la **Legge di Bragg**:

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

(dove n è l'ordine di riflessione, λ è la lunghezza d'onda, d è la distanza interplanare e θ è l'angolo di incidenza), si verifica il fenomeno della riflessione dei raggi X.

Il risultato è un pattern di diffrazione (diffrattogramma) unico per ogni specie chimica, che funge da "impronta digitale" del materiale.

2.2.1. Descrizione della strumentazione

Per le analisi è stato utilizzato un diffrattometro da banco **Bruker D2 PHASER (2G)**

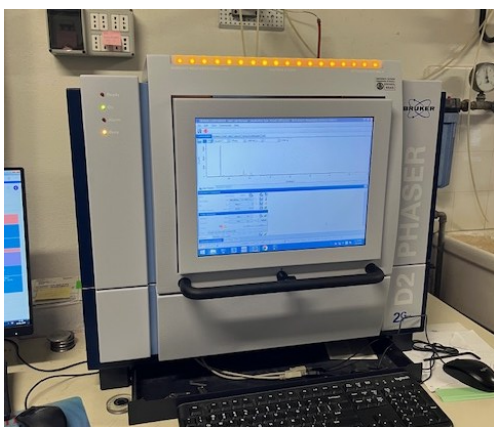


Figura 2.4 Strumento utilizzato per analisi XRPD

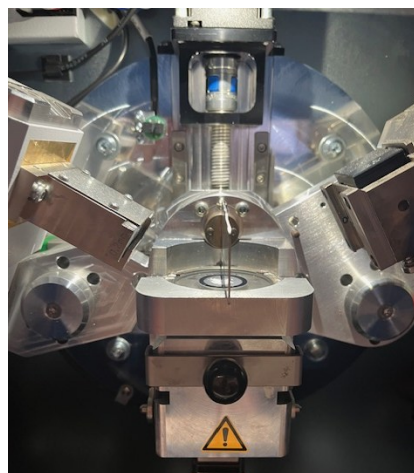


Figura 2.5 Dettaglio interno dello strumento

Lo strumento opera in **geometria Bragg-Brentano θ / θ** , una configurazione in cui il tubo radiogeno e il rivelatore ruotano in modo sincronizzato attorno al campione, che rimane in posizione orizzontale. Questa configurazione è particolarmente vantaggiosa per evitare la fuoriuscita di polveri non compattate o il disallineamento del campione durante la rotazione.

Le caratteristiche principali dello strumento utilizzato includono:

- **Sorgente:** tubo a raggi X con anodo in Rame (Cu), che emette la radiazione caratteristica $K\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).
- **Sistema di filtraggio:** utilizzo di filtri (tipicamente Nickel) o di un discriminatore elettronico nel rivelatore per eliminare la componente $K\beta$ indesiderata e ottenere un fascio monocromatico.
- **Ottiche:** presenza di fenditure di divergenza fisse e filtri Soller per limitare la divergenza assiale del fascio e migliorare la risoluzione dei picchi.

- **Rivelatore:** lo strumento è equipaggiato con un rivelatore a stato solido ad alta velocità (serie LYNXEYE), in grado di acquisire i dati con un rapporto segnale/rumore elevato in tempi ridotti.

2.2.2. Procedura sperimentale

I campioni sono stati opportunamente polverizzati e alloggiati in porta-campioni standard in silicio a "background zero". La superficie è stata livellata accuratamente per minimizzare l'errore di spostamento del campione (*displacement error*).

I programmi di scansione utilizzati per ogni campione sono indicati nelle sezioni corrispondenti del *Capitolo 4*.

L'elaborazione dei dati e l'identificazione delle fasi sono state eseguite tramite Microsoft Excel.

2.3. SPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATTA DI FOURIER (FT-IR)

La spettroscopia FT-IR è una tecnica di analisi vibrazionale utilizzata per identificare i gruppi funzionali presenti in una molecola. Quando un campione viene investito da radiazione infrarossa, le molecole assorbono energia a frequenze specifiche che corrispondono ai loro modi normali di vibrazione (stretching, bending, ecc.).

Il risultato è uno spettro che riporta l'intensità dell'assorbimento (o della trasmittanza) in funzione del numero d'onda (cm^{-1}), fornendo un profilo chimico dettagliato del materiale analizzato.

2.3.1. Descrizione della strumentazione e modalità ATR

Per l'identificazione dei gruppi funzionali e la verifica della struttura molecolare, è stato utilizzato uno spettrometro **Thermo Scientific Nicolet iS20**.



Figura 2.6 Strumento utilizzato per analisi FT-IR

Lo strumento è equipaggiato con un accessorio **ATR (Attenuated Total Reflection) Smart iTX**, caratterizzato da un cristallo ad alto indice di rifrazione (tipicamente Diamante o Germanio).

Questa configurazione offre diversi vantaggi:

- **Analisi non distruttiva:** il campione viene analizzato tal quale, senza necessità di pretrattamento o diluizione in matrici trasparenti all'IR.
- **Interazione del raggio:** il raggio IR subisce una riflessione totale interna all'interno del cristallo a contatto con il campione. Questo genera un'onda evanescente che penetra nel campione per una profondità limitata (solitamente tra 0.5 e 5 μm), permettendo di ottenere lo spettro della superficie di contatto.
- **Precisione del contatto:** la torretta a pressione (visibile nella figura 2.7 sopra il cristallo) garantisce un contatto intimo e uniforme tra il campione e l'elemento sensibile, fondamentale per ottenere segnali riproducibili e intensi.

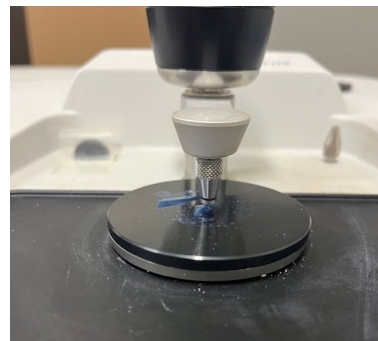


Figura 2.7 Dettaglio cristallo ATR

2.3.2. Procedura sperimentale

Le analisi sono state condotte in un range spettrale compreso tra **4000 e 400 cm^{-1}** . Prima di ogni serie di misure, è stato acquisito lo spettro del fondo (background) in aria per eliminare i contributi dell'anidride carbonica e del vapore acqueo atmosferico.

I campioni sono stati posizionati direttamente sul cristallo e pressati mediante l'apposita vite micrometrica. Per ogni campione sono state effettuate 64 scansioni con una risoluzione di 4 cm^{-1} , al fine di ottimizzare il rapporto segnale/rumore.

Dopo ogni acquisizione, la superficie del cristallo è stata accuratamente pulita con acetone per evitare cross-contaminazioni tra le misure.

L'elaborazione dei dati e l'assegnazione delle bande caratteristiche sono state effettuate tramite Microsoft Excel.

2.4. MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

La microscopia elettronica a scansione (SEM) permette di ottenere immagini ad alta risoluzione della morfologia e della topografia superficiale di un campione solido. A differenza della microscopia ottica, che utilizza i fotoni, il SEM utilizza un fascio di elettroni accelerati focalizzato su un punto finissimo.

L'interazione tra il fascio primario e gli atomi del campione genera diversi segnali che vengono raccolti da appositi rilevatori:

- **Elettroni Secondari (SE):** emessi dagli strati più superficiali, forniscono informazioni dettagliate sulla morfologia e sulla struttura 3D della superficie.
- **Elettroni Retrodiffusi (BSE):** elettroni del fascio primario riflessi per urto elastico. Poiché l'intensità del segnale dipende dal numero atomico (Z), permettono di distinguere zone a diversa composizione chimica (fasi più "pesanti" appaiono più chiare).

2.4.1. Descrizione della strumentazione

Per le indagini morfologiche è stato impiegato un microscopio **Zeiss EVO**.

Questo strumento è particolarmente versatile grazie alla possibilità di operare in diverse modalità di vuoto, permettendo l'analisi anche di campioni non perfettamente



Figura 2.8 Strumento utilizzato per analisi SEM

conduttori o parzialmente idratati.

Lo strumento è integrato con un sistema di **Microanalisi a Dispersione di Energia (EDX o EDS)** (sonda **Oxford Instruments X-Max**). Quando il fascio elettronico colpisce il campione, provoca l'espulsione di elettroni dai livelli energetici interni degli atomi; il successivo rilassamento elettronico genera l'emissione di **Raggi X caratteristici**.

L'analisi dello spettro di questi raggi X consente di effettuare:

- **Analisi elementare qualitativa:** identificazione degli elementi presenti.

- **Analisi semi-quantitativa:** determinazione delle concentrazioni relative degli elementi in un punto o in un'area.
- **Mappatura chimica (Mapping):** visualizzazione della distribuzione spaziale dei diversi elementi sulla superficie del campione.



Figura 2.9 Dettaglio interno dello strumento visibile da computer

2.4.2. Procedura sperimentale

I campioni sono stati fissati su uno stub metallico mediante nastro biadesivo conduttivo al carbonio. Per evitare l'accumulo di cariche elettrostatiche, i campioni sono stati precedentemente metallizzati con uno strato sottile di oro tramite Sputter Coater.

Le osservazioni sono state condotte con una tensione di accelerazione (EHT) compresa tra 5 e 20 kV, modulando la distanza di lavoro (WD) e l'intensità del fascio in base alla risoluzione e alla profondità di campo desiderate.

L'acquisizione e l'elaborazione delle immagini e degli spettri sono state effettuate mediante il software **SmartSEM**.

3. MATERIALI E METODI

3.1. MATERIALI

Per questo progetto di tesi sono stati utilizzati i seguenti reagenti e solventi:

➤ Per la sintesi di ZIF-8:

- **Zinco Nitrato esaidrato ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)** come “nodo” metallico: acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza 98%, MM=297,49 g/mol
- **2-metilimidazolo ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$)** come legante organico: acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza 99%, MM=82,10 g/mol
- **Acqua deionizzata (dH_2O)** come solvente della reazione
- **Idrossido di Sodio (NaOH)** acquistato da Sigma-Aldrich, MM=40 g/mol e utilizzato per preparare una soluzione 1M usata nel processo di sintesi per favorire la deprotonazione del legante organico e conseguentemente la corretta formazione della struttura cristallina di ZIF-8
- **Etanolo (EtOH)** acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza >99,8%, MM=46,07 g/mol e utilizzato per effettuare i lavaggi finali post-sintesi al fine di eliminare eventuali reagenti in eccesso

➤ Per la sintesi one-pot di ZIF-8@Ketoprofene:

- **Zinco Nitrato esaidrato ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)** come “nodo” metallico: acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza 98%, MM=297,49 g/mol
- **2-metilimidazolo ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$)** come legante organico: acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza 99%, MM=82,10 g/mol
- **Ketoprofene ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$)** come principio attivo incapsulato nei pori di ZIF-8, acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza > 98%, MM=254,28 g/mol
- **Acqua deionizzata (dH_2O)** come solvente per solubilizzare il reagente Zinco Nitrato esaidrato
- **Etanolo (EtOH)** acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza > 99,8%, MM=46,07 g/mol e utilizzato come solvente per solubilizzare 2-metilimidazolo e ketoprofene ed anche per effettuare i lavaggi finali post-sintesi

- Per la sintesi one-pot di ZIF-8@Curcumina:
 - **Zinco Nitrato esaidrato ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)** come “nodo” metallico: acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza 98%, MM=297,49 g/mol
 - **2-metilimidazolo ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$)** come legante organico: acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza 99%, MM=82,10 g/mol
 - **Curcumina ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$)** come molecola bioattiva incapsulata nei pori di ZIF-8, acquistato da Sigma-Aldrich, MM=368,38 g/mol
 - **Acqua deionizzata (dH_2O)** come solvente per solubilizzare Zinco Nitrato esaidrato
 - **Etanolo (EtOH)** acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza > 99,8%, MM=46,07 g/mol e utilizzato come solvente per solubilizzare 2-metilimidazolo e curcumina ed anche per effettuare i lavaggi finali post-sintesi
- Per la preparazione delle miscele eutettiche di acidi grassi:
 - **Acido Laurico o Dodecanoico ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$)** acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza 98%, MM=200,32 g/mol
 - **Acido Miristico o Tetradecanoico ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$)** acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza > 98%, MM=228,37 g/mol
 - **Acido Palmitico o Esadecanoico ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$)** acquistato da Sigma-Aldrich, grado di purezza > 99%, MM=256,42 g/mol

Le apparecchiature di laboratorio usate in questo progetto di tesi sono le seguenti:

- **Bilancia analitica Mettler AE 240:** bilancia analitica di precisione fino alla quarta cifra decimale utilizzata per la pesata delle materie prime
- **Agitatore magnetico con piastra riscaldante VWR VMS-A:** utilizzato durante le sintesi e per la preparazione delle miscele eutettiche di acidi grassi
- **Centrifuga da laboratorio Ohaus:** utilizzata per il recupero dei campioni solidi post-sintesi e durante i lavaggi finali
- **Stufa a vuoto Bicasa Vuotomatic 50:** utilizzata per l'essiccazione completa dei campioni post-sintesi

3.2. METODO SPERIMENTALE

3.2.1. Sintesi di ZIF-8

Inizialmente è stata riprodotta la sintesi di ZIF-8, già effettuata precedentemente nello stesso laboratorio, cercando di utilizzare procedure sostenibili, senza l'uso di solventi tossici.

Il protocollo sperimentale ha previsto la preparazione di due soluzioni in dH₂O contenenti rispettivamente i due precursori di ZIF-8 e nello specifico una soluzione 0,7M di Zn(NO₃)₂ x 6H₂O e una soluzione 3M di 2-mim.

Sono quindi stati pesati su bilancia analitica e successivamente posti in 2 becher differenti:

- 0,2457g di Zn(NO₃)₂ x 6H₂O
- 0,5566g di 2-mim

È stata aggiunta dH₂O fino alla concentrazione desiderata.

Le due soluzioni sono state miscelate manualmente fino alla solubilizzazione completa dei due reagenti e, per favorire la deprotonazione del legante organico, è stato preventivamente aggiunto, nella soluzione del metallo, NaOH 1M goccia a goccia fino a pH 8, miscelando vigorosamente con una bacchetta di vetro e valutando il pH con una cartina tornasole.

Successivamente il becher contenente la soluzione di Zn(NO₃)₂ e un'ancoretta magnetica è stato posto sull'agitatore magnetico e si è aggiunta goccia a goccia la soluzione di 2-mim; al termine dell'aggiunta è stato mantenuto il tutto a temperatura ambiente ed in agitazione per 1 ora per far avvenire la reazione e favorire la crescita dei cristalli [Figura 3.1].



Figura 3.1 Cristalli di ZIF-8 in formazione

Alla fine della reazione per recuperare il prodotto solido la sospensione lattiginosa è stata suddivisa equamente in 2 falcon da 15ml e successivamente sono stati eseguiti cicli di centrifugazione alternati a lavaggi con EtOH. Il programma di centrifugazione seguito è stato il seguente:

- Prima centrifugazione: 4000 rpm x 10 minuti
- Seconda centrifugazione: 10.000 rpm x 15 minuti
- Terza centrifugazione: 10.000 rpm x 10 minuti
- Quarta centrifugazione: 10.000 rpm x 10 minuti

Alla fine dell'ultima centrifugazione il campione solido è stato recuperato e posto in un vetrino d'orologio a riposo a temperatura ambiente per 16 ore (overnight).

Per favorire maggiormente l'evaporazione del solvente residuo, il giorno dopo, il vetrino d'orologio contenente il campione è stato posto in stufa ad una temperatura di 70°C x 12 ore.

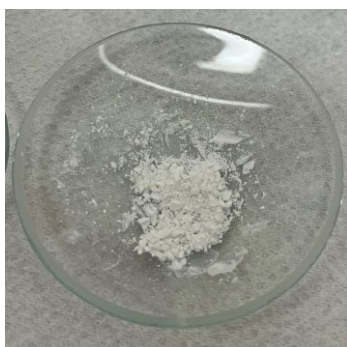


Figura 3.2 Prodotto ottenuto (ZIF-8)

Successivamente il prodotto bianco ottenuto [Figura 3.2] è stato caratterizzato.

3.2.2. Sintesi one-pot di ZIF-8@Ketoprofene

Per incapsulare il principio attivo nella struttura reticolare di ZIF-8 è stato scelto un processo di sintesi one-pot (12), ovvero, intrappolando il ketoprofene nei pori direttamente durante la crescita del reticolo ottenendo una miglior efficienza di incapsulamento rispetto ad altri metodi.

Inizialmente la sintesi è stata realizzata pesando le seguenti quantità di reagenti:

- 0,0824g di $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,1721g di 2-mim
- 0,002g di ketoprofene

In un becher sono stati solubilizzati 2-mim e ketoprofene in 7,5ml di EtOH mentre in un secondo becher è stato solubilizzato il sale di Zinco in 2,5ml di dH₂O.

Per ottenere una soluzione limpida il becher con 2-mim e ketoprofene è stato posto, con ancoretta magnetica all'interno, su un agitatore magnetico.

Successivamente è stata aggiunta goccia a goccia allo stesso becher la soluzione di Zn(NO₃)₂.

A fine aggiunta la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora.

A reazione finita la sospensione lattiginosa ottenuta è stata suddivisa equamente in 2 falcon da 15ml e portata in centrifuga per il recupero del prodotto.

Sono stati eseguiti 4 cicli di centrifugazione da 12.000rpm x 10 minuti ciascuno alternati a lavaggi con EtOH in modo da eliminare eventuali reagenti in eccesso.

Dopo l'ultima centrifugazione il campione solido recuperato in un vetrino d'orologio è stato posto in stufa a 60°C per 12 ore (overnight).

Considerando l'ottenimento di poco prodotto, è stata realizzata nuovamente la sintesi nelle stesse condizioni ma raddoppiando le quantità di reagenti e solventi; quindi, sono state preparate le seguenti soluzioni:

- 0,1585g di Zn(NO₃)₂ x 6H₂O in 5ml di dH₂O
- 0,3351g di 2-mim + 0,004g di ketoprofene in 15ml di EtOH

Il prodotto ottenuto [Figura3.3] è stato poi caratterizzato.



Figura 3.3 Prodotto della seconda sintesi dopo essiccamento (ZIF-8@Ketoprofene2)

3.2.3. Sintesi one-pot di ZIF-8@Curcumina

Anche per incapsulare la Curcumina è stato scelto il metodo di sintesi one-pot (13). Per manipolare la curcumina è stata posta attenzione alla sua fotosensibilità usando carta stagnola per proteggere la sostanza sia durante le pesate che nei vari passaggi di sintesi e recupero del prodotto.

Sono state pesate le seguenti quantità di reagenti:

- 0,2475g di $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,2697g di 2-mim
- 0,0108g di curcumina

Il sale di Zinco è stato solubilizzato in 10ml di dH_2O in un becher, in un secondo becher sono stati solubilizzati 2-mim e curcumina in 10ml di EtOH (soluzione rosso-arancio causata dalla colorazione della curcumina) [Figura 3.4].



Figura 3.4 Soluzione di 2-mim+curcumina in EtOH

È stata posta, con ancoretta magnetica all'interno, su agitatore magnetico la soluzione contenente la curcumina e successivamente è stata aggiunta goccia a goccia la soluzione di Zinco.

A fine aggiunta la sospensione totale è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora

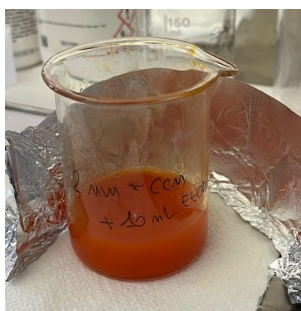


Figura 3.5 Sospensione finale di ZIF-8@Curcumina prima della centrifugazione

A reazione avvenuta, spento l'agitatore magnetico, la sospensione risultante [Figura 3.5] è stata divisa equamente in 2 falcon per il recupero del prodotto tramite centrifugazione.

È stato eseguito un ciclo di centrifugazione a 12.000rpm x 10 minuti seguito da un lavaggio con EtOH per eliminare tracce di reagenti in eccesso; durante il prelievo del surnatante questo risultava già limpido quindi si è scelto di eseguire solo un altro ciclo di centrifugazione a 12.000 rpm x 10 minuti e poi recuperare il prodotto solido rosso-arancio in un vetrino d'orologio e porlo in stufa per l'essiccamento a 60°C per 12 ore (overnight).

Dopo l'essiccamento il prodotto [Figura 3.6] è stato caratterizzato.

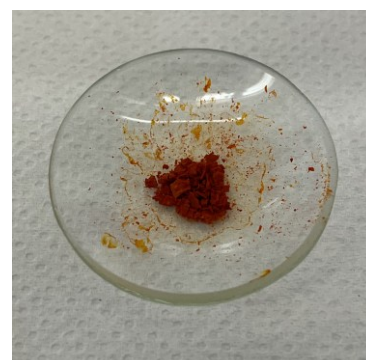


Figura 3.6 Prodotto della sintesi dopo essiccamento (ZIF-8@curcumina)

3.2.4. Preparazione delle miscele eutettiche di acidi grassi

Sono state effettuate diverse prove prima di individuare la miscela eutettica che fondesse alla temperatura voluta.

Il procedimento di preparazione delle varie miscele binarie e ternarie è stato il seguente:

1. Pesata su bilancia analitica delle giuste quantità di acidi grassi (1g totale di miscela) sulla base delle proporzioni scelte e posizionamento degli stessi in un vial o becher di vetro con una piccola ancoretta magnetica
2. Fusione su agitatore magnetico con piastra riscaldante degli acidi grassi per permettere l'efficace miscelazione dei componenti, facendo attenzione a non superare la temperatura di degradazione degli acidi grassi e fino alla formazione di una soluzione limpida
3. Raffreddamento e cristallizzazione della miscela ottenuta su supporto di sughero a temperatura ambiente senza rimuovere ancoretta all'interno per non intaccare la solidificazione

Con la miscela binaria formata da Acido Laurico e Acido Palmitico sono state effettuate 2 prove nei rapporti definiti in *Tabella 3.1*

	PROVA1 Quantità (g)	PROVA1 Proporzione (%)	PROVA2 Quantità (g)	PROVA2 Proporzione (%)
Acido Laurico	0,6005	59,99	0,5493	54,98
Acido Palmitico	0,4005	40,01	0,4497	45,02

Tabella 3.1 Rapporti usati per la miscela binaria LAPA (Laurico + Palmitico)

Successivamente sono state rifuse, con lo stesso procedimento, le due miscele binarie per ottenere una migliore miscelazione ed osservare eventuali cambiamenti nel comportamento termico a seguito di una seconda fusione.

È stata poi eseguita una prova con la miscela binaria Acido Laurico e Acido Miristico nei rapporti definiti in *Tabella 3.2*.

	PROVA3 Quantità (g)	PROVA3 Proporzione (%)
Acido Laurico	0,6612	65,93
Acido Miristico	0,3417	34,07

Tabella 3.2 Rapporti usati per la miscela binaria LAMA (Laurico + Miristico)

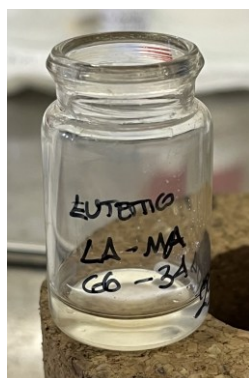


Figura 3.7 Miscela binaria LAMA dopo fusione

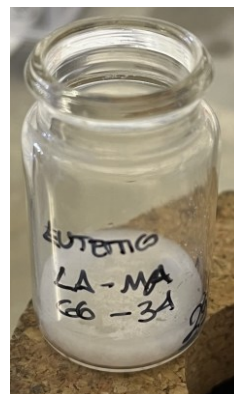


Figura 3.8 Miscela binaria LAMA dopo cristallizzazione

Successivamente un'ulteriore prova è stata realizzata con la miscela binaria formata da Acido Miristico e Acido Palmitico nei rapporti definiti in *Tabella 3.3*.

	PROVA 4 Quantità (g)	PROVA 4 Proporzione (%)
Acido Miristico	0,6320	63,17
Acido Palmitico	0,3684	36,83

Tabella 3.3 Rapporti usati per la miscela binaria MAPA (Miristico + Palmitico)

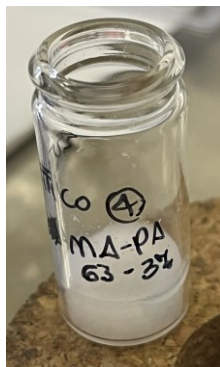


Figura 3.9 Miscela binaria MAPA dopo cristallizzazione

Quest'ultima prova, seppur con una temperatura di fusione ancora elevata rispetto allo scopo previsto, è quella che ha dimostrato un comportamento termico più simile a quanto desiderato; si è quindi pensato di provare ad abbassare il punto di fusione andando ad effettuare aggiunte progressive di Acido Laurico, che ha un punto di fusione inferiore rispetto agli altri due acidi grassi utilizzati, alla miscela binaria MAPA. Si è preparata di fatto una miscela ternaria formata da Acido Laurico, Acido Miristico e Acido Palmitico.

Nello specifico sono state effettuate le aggiunte indicate in Tabella 3.4.

	Acido Laurico (% sul totale)	Acido Miristico (%) sul totale)	Acido Palmitico (%) sul totale)	Quantità Acido Laurico aggiunta (g)
Miscela Base	0	63,17	36,83	0
Aggiunta fino a 5%	5	60,01	34,99	0,0498
Aggiunta fino a 8%	8	58,12	33,88	0,0324
Aggiunta fino a 10%	10	56,85	33,15	0,0228
Aggiunta fino a 11%	11	56,22	32,78	0,0101
Aggiunta fino a 30%	30	44,22	25,78	0,2076
Aggiunta fino a 50%	50	31,59	18,41	0,1784

Tabella 3.4 Aggiunte progressive di Acido Laurico alla miscela binaria MAPA

È stata identificata come miglior miscela eutettica ternaria per lo scopo previsto quella nelle proporzioni Miristico (56,85%) + Palmitico (33,15%) + Laurico (10%) che quindi è stata ripreparata per essere poi usata nel rivestimento successivo dei sistemi ZIF-8@Ketoprofene e ZIF-8@Curcumina.

Le quantità utilizzate per l'ultima preparazione della miscela ternaria sono indicate in Tabella 3.5.

	Quantità (g)	Proporzioni (%)
Acido Miristico	0,6319	56,57
Acido Palmitico	0,3689	33,02
Acido Laurico	0,1163	10,41

Tabella 3.5 Quantità utilizzate nella preparazione della miscela ternaria MAPALA (Miristico + Palmitico + Laurico)

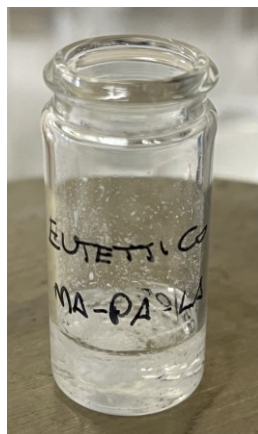


Figura 3.10 Miscela ternaria MAPALA durante la fusione

Le miscele preparate sono state tutte analizzate tramite Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC).

3.2.5. Rivestimento dei sistemi ZIF-8@Ketoprofene e ZIF-8@Curcumina con miscela eutettica ternaria MAPALA

Il rivestimento è stato realizzato calcolando un rapporto 1:2 di sistema ZIF-8 rispetto al rivestimento lipidico di acidi grassi.

Per il sistema ZIF-8@Ketoprofene sono state pesate le seguenti quantità:

- 4,2 mg di ZIF-8@Ketoprofene
- 8,4 mg di miscela eutettica ternaria MAPALA

Per il sistema ZIF-8@Curcumina sono state pesate le seguenti quantità:

- 6,9 mg di ZIF-8@Curcumina
- 13,8 mg di miscela eutettica ternaria MAPALA

Dopo le pesate i 2 componenti dei sistemi sono stati posti in un vial di vetro portati a fusione su piastra riscaldante alla temperatura di fusione della miscela eutettica per permettere un rivestimento omogeneo dei sistemi contenenti ketoprofene e curcumina.

I vial sono stati poi allontanati dalla piastra riscaldante, posti su un supporto in sughero e lasciati raffreddare a temperatura ambiente fino a solidificazione per permettere la cristallizzazione della miscela eutettica attorno ai sistemi. Successivamente il prodotto ottenuto è stato finemente polverizzato mediante macinazione. (14)

I sistemi finali ottenuti sono stati poi analizzati con Calorimetria Differenziale a Scansione per osservare il cambiamento di comportamento della miscela eutettica di acidi grassi a contatto con i due sistemi farmaceutici.



Figura 3.11 Prodotto finale dopo rivestimento lipidico (ZIF-8@Curcumina@MAPALA)

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI ZIF-8

4.1.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

Per analizzare la stabilità termica ed eventuali transizioni di fase di ZIF-8 è stata effettuata un'analisi DSC.

Il programma termico impostato è indicato in *Tabella 4.1*.

EQUILIBRATE AT -25 °C
RAMP 10°C/min TO 300°C
RAMP 10°C/min TO -25°C
RAMP 10°C/min TO 25°C

Tabella 4.1 Programma termico DSC per analisi ZIF-8

L'analisi è stata condotta sotto flusso di Azoto (N₂) di 50ml/min.

Il termogramma ottenuto è riportato in *Figura 4.1*.

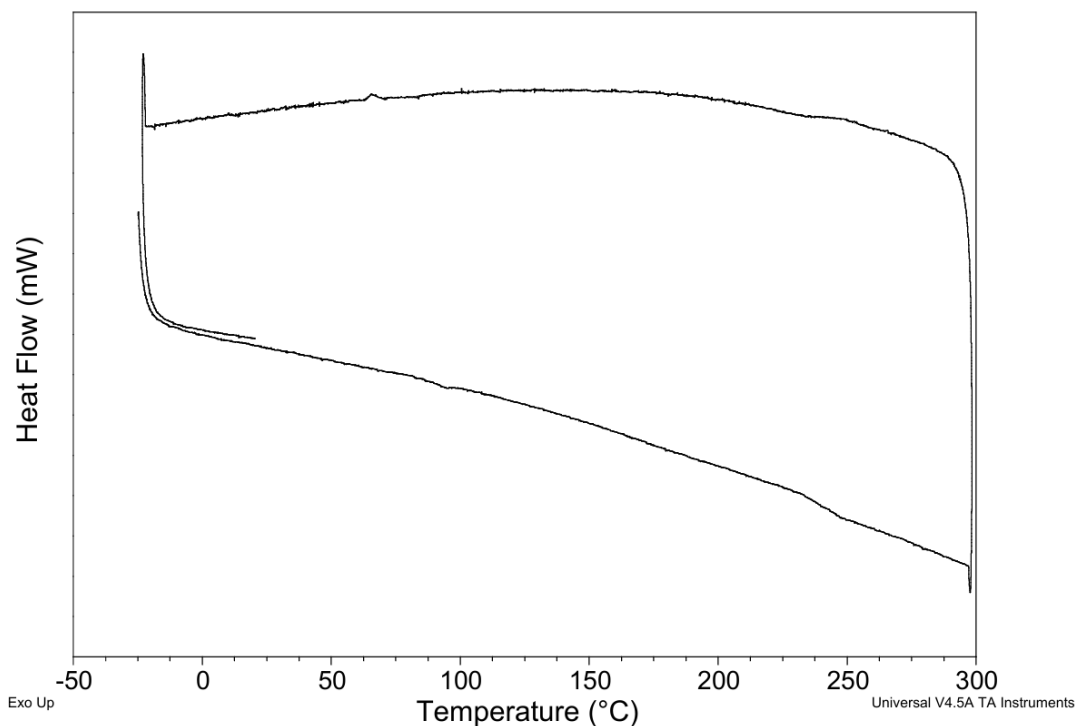


Figura 4.1 Termogramma DSC di ZIF-8

Dal termogramma ottenuto di ZIF-8 (*figura 4.1*) si possono trarre alcune conclusioni:

- **Elevata stabilità termica** nell'intervallo analizzato fino a 300 °C; non sono visibili, infatti, picchi endotermici o esotermici netti associati a fusioni o transizioni cristalline
- **Prima piccola flessione endotermica tra 50°C e 100°C (reversibile):** potrebbe essere dovuta all'evaporazione del solvente adsorbito sulla superficie esterna dei cristalli
- **Seconda piccola flessione endotermica tra 200 °C e 250 °C (reversibile):** potrebbe essere dovuta al desorbimento termico di solvente intrappolato nelle cavità di ZIF-8.

4.1.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)

Per valutare l'effettiva formazione di ZIF cristallino è stata eseguita un'analisi strutturale tramite Diffrazione a Raggi X.

L'analisi è stata condotta nell'intervallo angolare di 2θ compreso tra 5° e 40°. La scansione è stata eseguita impostando uno *step size* di 0,03° per un totale di 1152 *steps*.

Per massimizzare il rapporto segnale/rumore è stata utilizzata una fenditura di divergenza di 0,3mm ed un coltello schermante (anti-scatter knife) di 1mm.

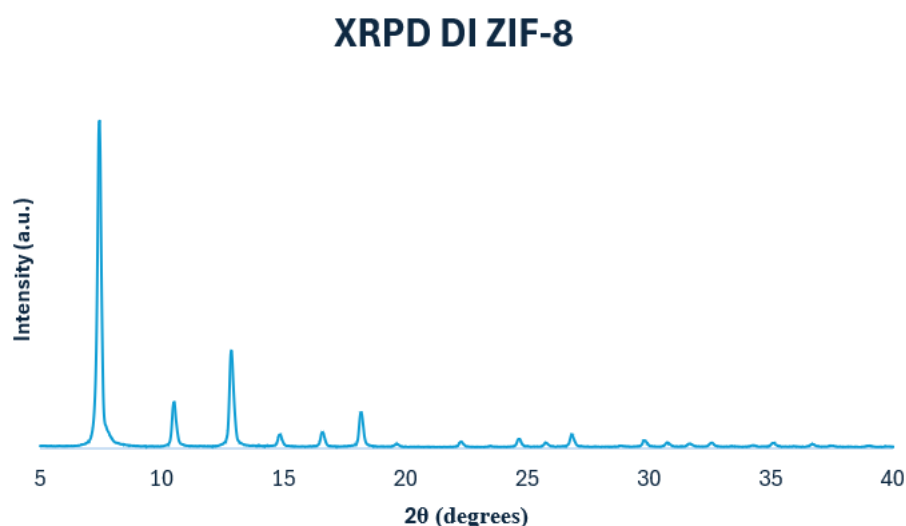


Figura 4.2 Diffattogramma di ZIF-8

In *Figura 4.2* è riportato il diffattogramma XRPD di ZIF-8; l'analisi mostra:

- **Pattern caratteristico di ZIF-8** documentato in letteratura (15). In particolare, si osserva l'intenso picco principale a circa 7.3° seguito dai riflessi secondari ben definiti a circa 10.4° , 12.7° , 14.7° , 16.4° e 18°
- **Elevata cristallinità del materiale:** i picchi sono stretti e caratterizzati da elevata intensità rispetto al rumore di fondo e questo conferma l'ottenimento di un materiale con domini cristallini definiti.

4.1.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

Al fine di individuare i gruppi funzionali specifici di ZIF-8 e i legami formati tra i “nodi” metallici e il linker organico, il campione è stato analizzato mediante Spettroscopia FT-IR.

L'analisi è stata condotta nel range di *wavenumber* tra 4000 e 400 cm^{-1} , con una risoluzione di 4 cm^{-1} e 64 scansioni e correzione atmosferica attivata per eliminare i segnali dovuti all'aria nell'ambiente.

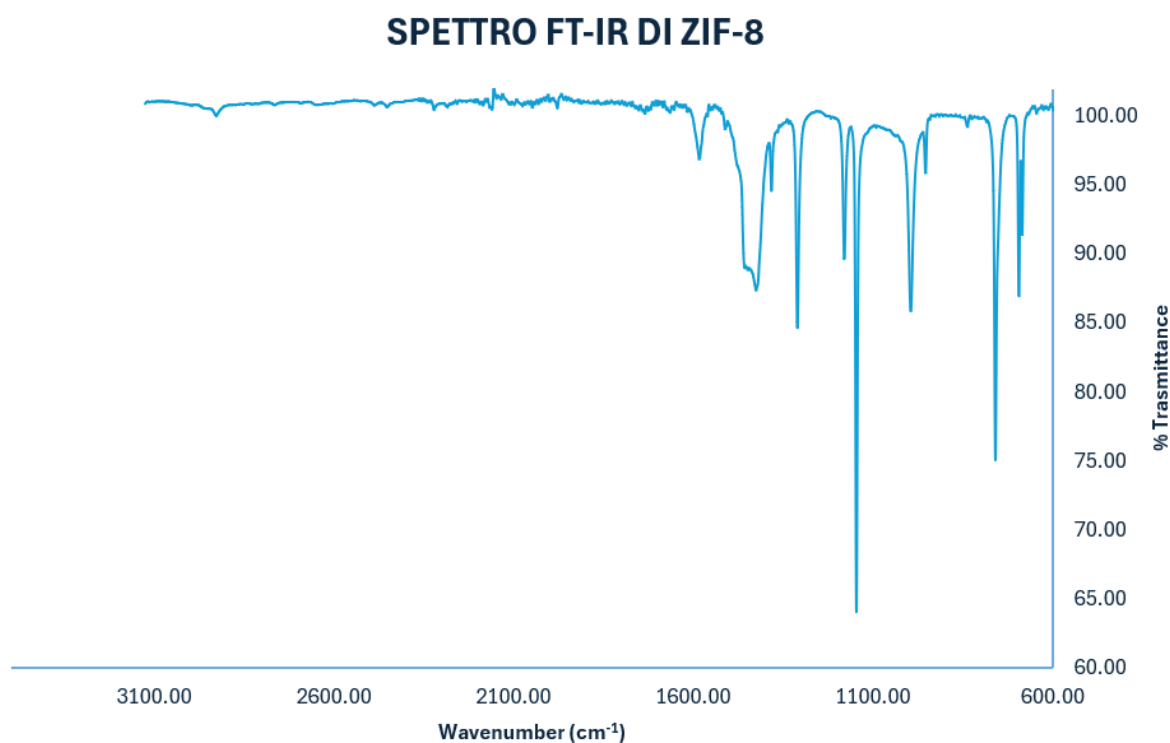


Figura 4.3 Spettro FT-IR di ZIF-8

Lo spettro FT-IR risultante (mostrato in *Figura 4.3* nell'intervallo di maggiore interesse strutturale) evidenzia le bande di assorbimento diagnostiche del framework:

- **Vibrazioni dei gruppi funzionali del linker imidazolico** ($1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$): questa zona rappresenta l'impronta digitale dello ZIF-8 ed è caratterizzata da bande intense e ben risolte. Si distingue chiaramente l'intenso picco a circa 1146 cm^{-1} (associato allo stretching del legame C – N dell'anello imidazolico), accompagnato dai segnali a circa 1310 cm^{-1} e 1425 cm^{-1} attribuiti alle vibrazioni di *bending* e *stretching* dell'intero anello eterociclico.
- **Vibrazioni del gruppo metilico**: la banda debole a circa 2930 cm^{-1} (visibile nella regione ad alti numeri d'onda) corrisponde allo stretching asimmetrico e simmetrico dei legami C – H alifatici appartenenti al gruppo metilico (-CH_3) del linker.
- **Assenza di linker libero**: l'assenza di una banda allargata e intensa nella regione tra 2500 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} (tipica del legame N – H intermolecolare del 2-metilimidazolo non coordinato) attesta l'elevata purezza del materiale e il completamento della reazione di coordinazione. (16)

L'insieme delle analisi eseguite dimostra il successo del processo di sintesi che ha portato all'ottenimento di ZIF-8 puro, cristallino e termicamente stabile.

4.2. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI KETOPROFENE

4.2.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

Per analizzare il comportamento termico di ketoprofene puro è stata effettuata un'analisi DSC con il seguente programma termico: rampa di riscaldamento da 20 °C a 140 °C ad una velocità di 5°C/min in flusso d'Azoto di 50ml/min.

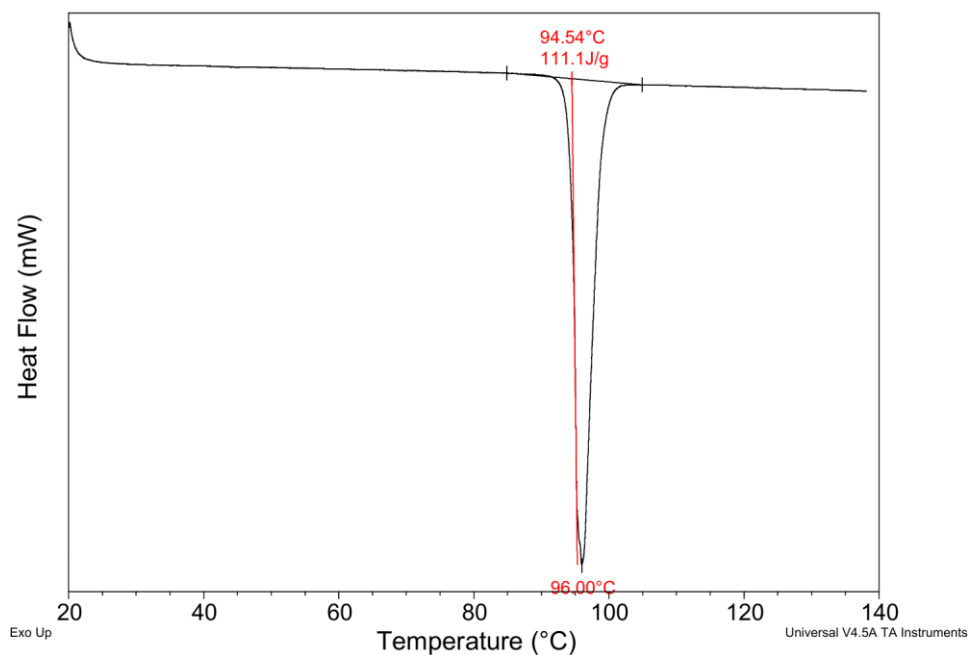


Figura 4.4 Termogramma DSC di Ketoprofene puro

Il termogramma in *Figura 4.4* evidenzia il picco nitido di fusione endotermico di ketoprofene a 96 °C con una temperatura di onset a 94.54°C ed entalpia di fusione di 111.1J/g.

L'analisi DSC eseguita dimostra che il ketoprofene si trova nella sua forma cristallina stabile, altamente pura.

4.2.2. Diffrattometria a Raggi X su polveri (XRPD)

L'analisi è stata condotta nell'intervallo angolare di 2θ compreso tra 5° e 60°. La scansione è stata eseguita impostando uno *step size* di 0,02°.

Per massimizzare il rapporto segnale/rumore è stata utilizzata una fenditura di divergenza di 0,3mm ed un coltello schermante (anti-scatter knife) di 1mm.

XRPD DI KETOPROFENE

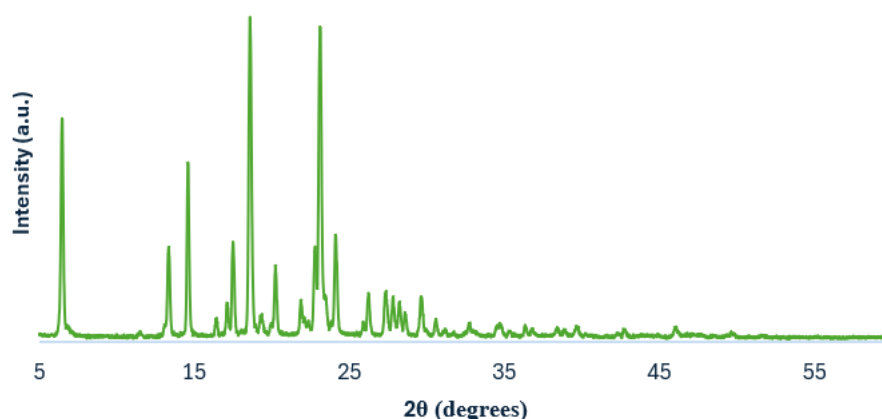


Figura 4.5 Diffrattogramma di Ketoprofene puro

Il diffrattogramma in *Figura 4.5* mostra un profilo caratterizzato da picchi estremamente intensi e netti e questo conferma, come precedentemente visto nel termogramma DSC, che il ketoprofene analizzato si trova in uno stato solido cristallino. (17)

Si possono identificare chiaramente i picchi di riferimento della specie cristallina:

- Un picco isolato e molto intenso a bassi angoli, posizionato a circa 6.4°
- Un gruppo di picchi nitidi nella regione intermedia tra 13° e 20°, con riflessi principali evidenti a circa 14.4°, 17.4° e il picco a massima intensità assoluta vicino a 18.4°.
- Un secondo picco estremamente intenso posizionato a circa 22.9°, seguito da riflessi minori ma ben risolti fino a 30°.

4.2.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

L'analisi spettroscopica è stata condotta per evidenziare i gruppi funzionali di ketoprofene puro nel range di *wavenumber* tra 4000 e 400 cm^{-1} , con una risoluzione di 4 cm^{-1} e 64 scansioni e correzione atmosferica attivata per eliminare i segnali dovuti all'aria nell'ambiente.

SPETTRO FT-IR DI KETOPROFENE

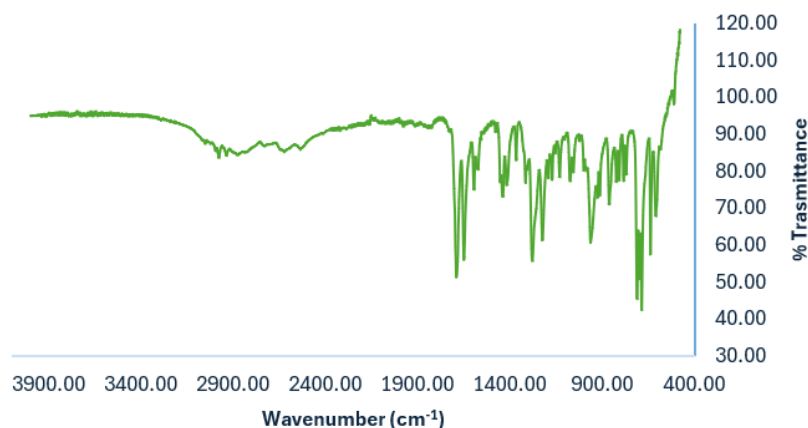


Figura 4.6 Spettro FT-IR di Ketoprofene puro

Lo spettro FT-IR di ketoprofene in *Figura 4.6* mostra i segnali caratteristici del principio attivo:

- **Regione dello stretching O – H e C – H (2500 – 3100 cm⁻¹):** la banda larga e frastagliata presente in questa zona (centrata intorno a 2900 – 3000 cm⁻¹) è dovuta alla forte interazione per legame a idrogeno dei dimeri dell'acido carbossilico (stretching O – H), parzialmente sovrapposta ai segnali dello stretching C – H sia aromatico che alifatico.
- **Regione dei carbonili (1600 1700 cm⁻¹):** si distinguono nettamente due bande di assorbimento molto intense e vicine:
 - una a circa 1695 cm⁻¹, tipica dello stretching del carbonile acido (C = O del gruppo carbossilico dimerizzato).
 - una a circa 1655 cm⁻¹, associata allo stretching del carbonile del chetone aromatico (diarilchetone).
- **Regione del "Fingerprint" (600 – 1600 cm⁻¹):** sono ben definiti i picchi relativi alle vibrazioni degli anelli aromatici (stretching C = C a circa 1595 cm⁻¹) e le deformazioni nel piano e fuori dal piano dei legami C – H e C – O. (17)

Il profilo termico DSC, il pattern XRPD e lo spettro FT-IR confermano che il ketoprofene è puro con una struttura cristallina ben organizzata.

4.3. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI ZIF-8@KETOPROFENE

4.3.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

L'analisi DSC sul sistema ZIF-8@Ketoprofene permette di valutare eventuali cambiamenti nel comportamento termico di ZIF-8 a seguito dell'incapsulamento del principio attivo.

Il programma termico impostato è indicato in *Tabella 4.2*.

EQUILIBRATE AT -25 °C
RAMP 10°C/min TO 300°C
RAMP 10°C/min TO -25°C
RAMP 10°C/min TO 25°C

Tabella 4.2 Programma termico DSC per analisi ZIF-8@Ketoprofene

L'analisi è stata condotta sotto flusso di Azoto (N₂) di 50ml/min.

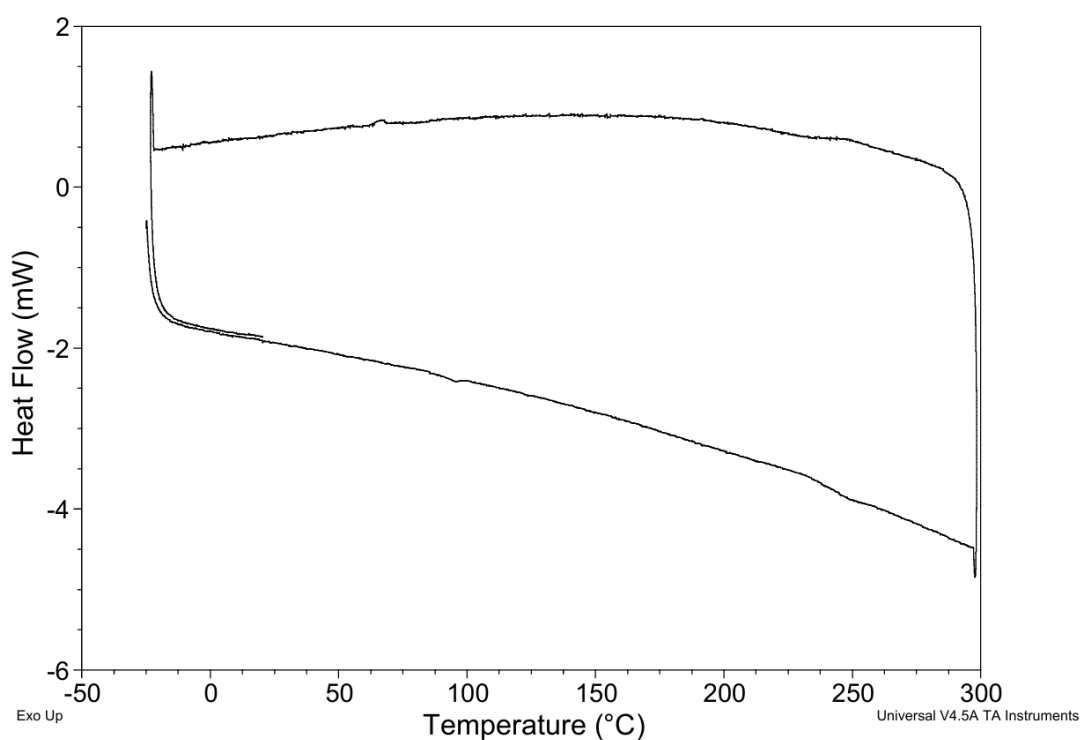


Figura 4.7 Termogramma DSC di ZIF-8@Ketoprofene

Il termogramma in *Figura 4.7* mostra un comportamento termico pressoché identico rispetto a quello del campione di ZIF-8 in *Figura 4.1*.

Inoltre, possiamo notare l'assenza del picco di fusione endotermico del ketoprofene a 96°C.

Questi due elementi possono suggerire il buon incapsulamento e/o la conseguente amorfizzazione del principio attivo nella struttura di ZIF-8.

La struttura continua a mantenere un'elevata stabilità termica anche in presenza di ketoprofene confinato all'interno dei pori.

4.3.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)

L'analisi è stata condotta nell'intervallo angolare di 2θ compreso tra 5° e 40° . La scansione è stata eseguita impostando uno *step size* di $0,03^\circ$ per un totale di 1152 *steps*.

Per massimizzare il rapporto segnale/rumore è stata utilizzata una fenditura di divergenza di $0,3\text{mm}$ ed un coltello schermante (anti-scatter knife) di 1mm .

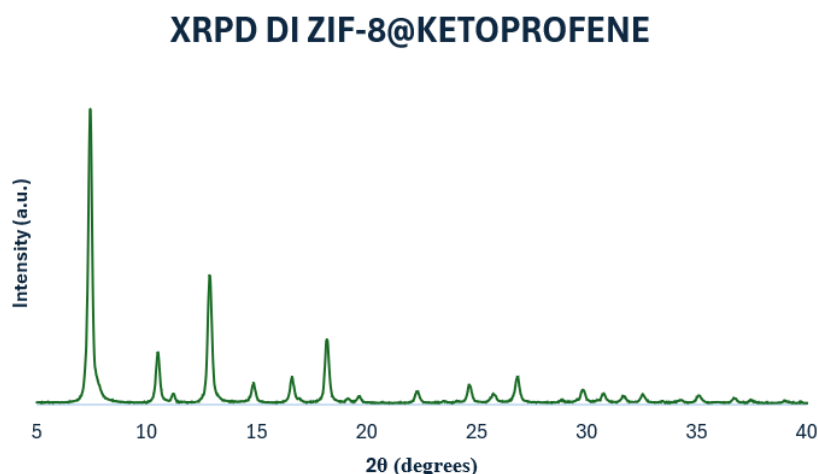


Figura 4.8 Diffrattogramma di ZIF-8@Ketoprofene

Dall'analisi del diffrattogramma in *Figura 4.8* si può notare l'assenza sia dei picchi di ketoprofene puro sia di bande amorse varianti la linea di base dei picchi caratteristici della gabbia cristallina, indice del fatto che il principio attivo si trovi all'interno della struttura reticolare dello ZIF.

XRPD SOVRAPPOSTI

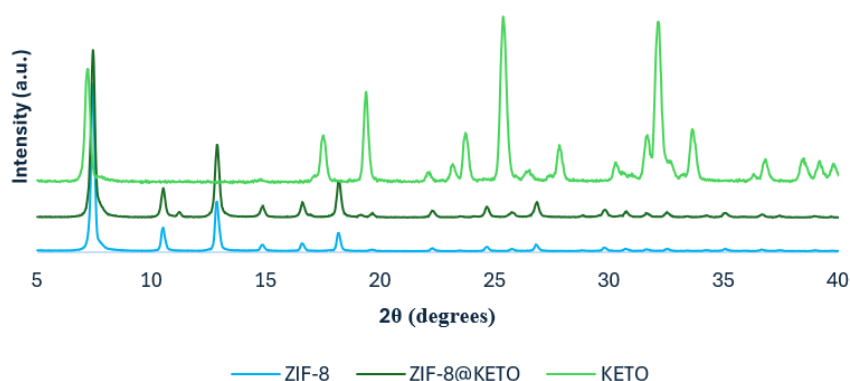


Figura 4.9 Diffrattogrammi sovrapposti di ZIF-8, ZIF-8@Ketoprofene e Ketoprofene puro

In *Figura 4.9* sono riportati i diffrattogrammi sovrapposti di ZIF-8, ZIF-8@Ketoprofene e ketoprofene puro per evidenziare il mantenimento della struttura di ZIF-8 anche in presenza dell'API; è possibile, infatti, notare che i picchi caratteristici di ZIF-8 vengono mantenuti anche nel composto ZIF-8@Ketoprofene, in particolare possono essere indicizzati i piani reticolari caratteristici (011), (002), (112), (022), (013) e (222). Inoltre, confrontando direttamente il pattern di ketoprofene puro e il pattern di ZIF-8@Ketoprofene è evidente l'assenza dei picchi del principio attivo nel composto sintetizzato.

Questo conferma ulteriormente la preparazione efficace del sistema di somministrazione ZIF-8@Ketoprofene, preservando il reticolo cristallino. (18)

4.3.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

L'analisi è stata condotta nel range di *wavenumber* tra 4000 e 400 cm^{-1} , con una risoluzione di 4 cm^{-1} e 64 scansioni e correzione atmosferica attivata per eliminare i segnali dovuti all'aria nell'ambiente.

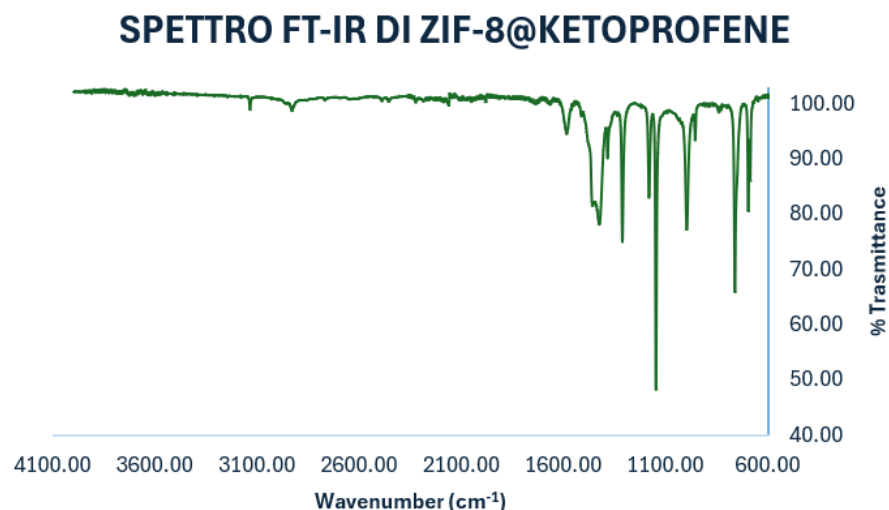


Figura 4.10 Spettro FT-IR di ZIF-8@Ketoprofene

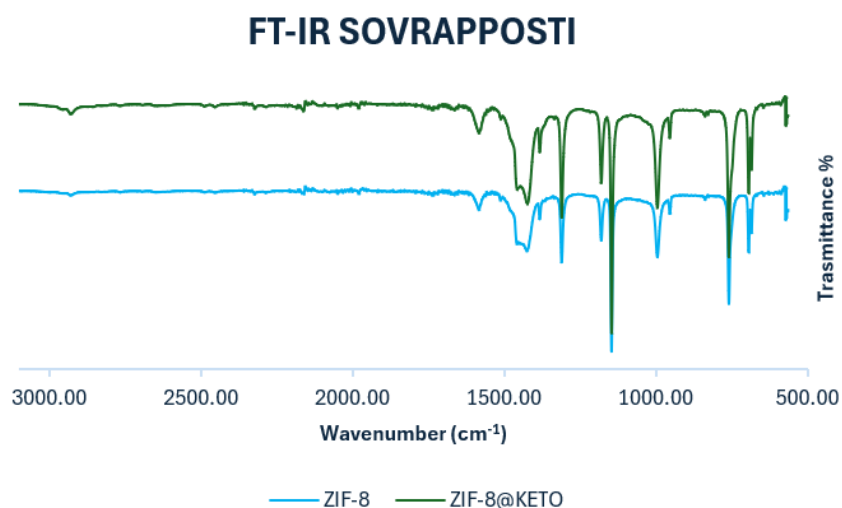


Figura 4.11 Spettri FT-IR sovrapposti di ZIF-8 e ZIF-8@Ketoprofene

Negli spettri sovrapposti di ZIF-8 e ZIF-8@Ketoprofene in *Figura 4.11* si nota che l'impronta digitale di ZIF-8 domina lo spettro, segno che la struttura portante è chimicamente intatta. Tuttavia, un'analisi più attenta rivela l'avvenuta inclusione:

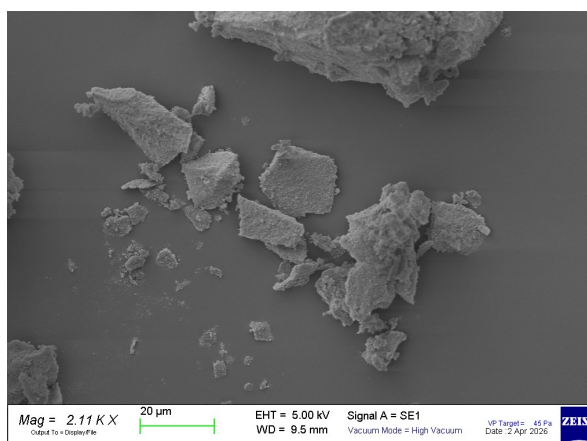
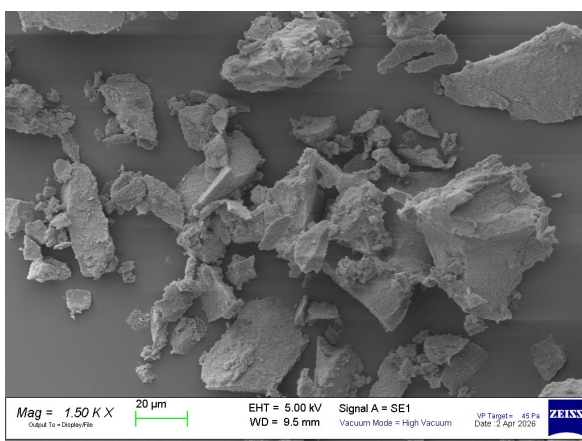
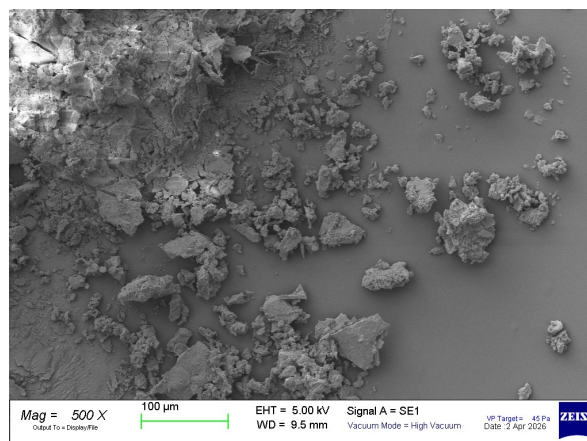
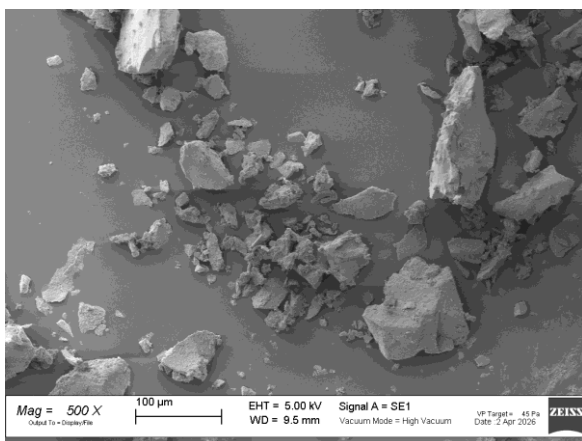
- **Regione dei carbonili e interazioni deboli:** nello spettro di *ZIF-8@Ketoprofene* (linea verde scuro) si nota la comparsa di deboli bande o spallamenti nella regione tra 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} rispetto a ZIF-8 puro (linea azzurra). Poiché il ketoprofene nei pori è altamente disperso, i suoi segnali carbonilici (C=O) risultano meno intensi rispetto al farmaco puro massivo e si presentano modificati o leggermente shiftati a causa delle interazioni non

covalenti (legami a idrogeno o interazioni deboli elettrostatiche $/\pi-\pi$) con gli anelli imidazolici della matrice.

- **Regione O-H libera:** la linea di base stabile sopra i 3000 cm^{-1} conferma che il processo di caricamento è avvenuto in condizioni controllate, mantenendo il sistema anidro e privo di solventi residui nei pori.

4.3.4. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Per indagare la morfologia del sistema ZIF-8@Ketoprofene è stata effettuata un'analisi al Microscopio Elettronico a Scansione.



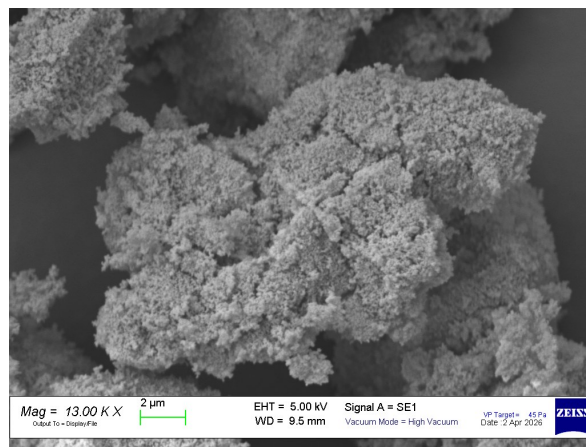
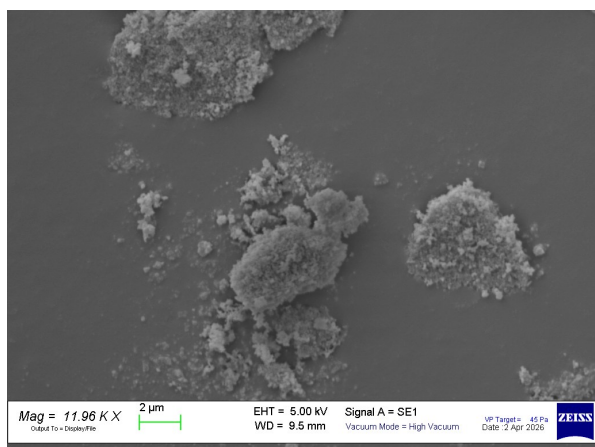
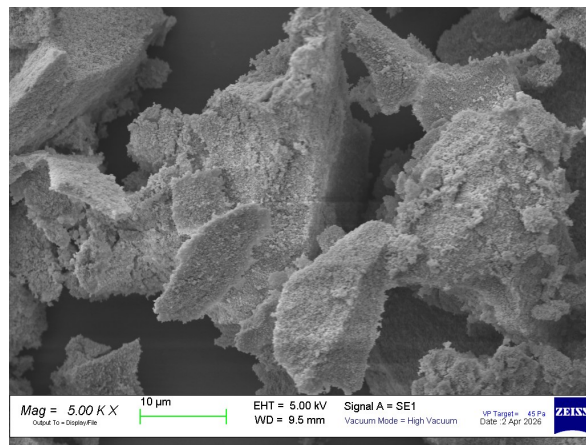
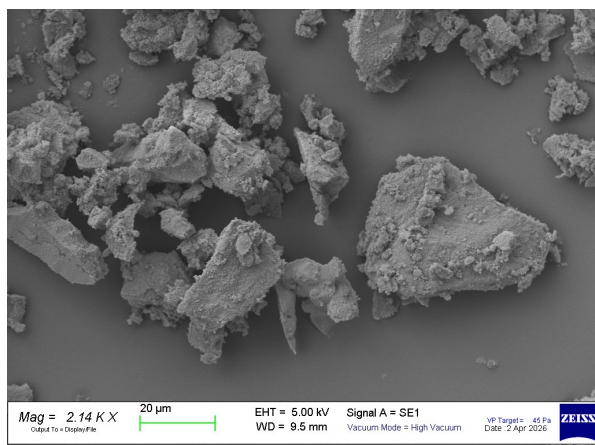


Figura 4.12 Immagini SEM di ZIF-8@Ketoprofene a diversi ingrandimenti

Dalle immagini SEM in *Figura 4.12* è possibile trarre alcune conclusioni morfologiche dei cristalli sulla base degli ingrandimenti:

- A bassi ingrandimenti (500x): si osserva una distribuzione granulometrica eterogenea; gli agglomerati tendono a separarsi in singole unità mantenendo comunque un carattere di aggregazione irregolare
- A medi ingrandimenti (1.50K x - 2.11K x – 2.14K x): si nota una struttura spigolosa e a scaglie. La superficie dei frammenti sembra formata da una texture ruvida o nanoparticellare
- Ad alti ingrandimenti (11.96K x – 13.00K x): non sono visibili i classici cristalli dodecaedrici e lisci di ZIF-8 ideale. Sono presenti invece nano-agglomerati piccoli interconnessi che conferiscono un aspetto “a spugna”. La presenza del ketoprofene durante la sintesi può agire come modulatore di crescita

interagendo con i precursori; il farmaco potrebbe limitare la crescita ordinata dei cristalli di ZIF-8.

Dal punto di vista macroscopico il sistema host-guest risulta quindi una polvere eterogenea formata da frammenti irregolari con una struttura microporosa. La deviazione dalla forma cristallina standard può essere dovuta all'interazione con il ketoprofene che ha modificato la crescita del network metallo-organico.

Le analisi combinate dimostrano il successo dell'incapsulamento (loading): ZIF-8 agisce da ottima struttura ospitante, restando cristallino e stabile anche con ketoprofene incorporato.

Il ketoprofene, invece, è stato efficacemente incapsulato nei pori, subendo probabilmente anche una transizione da stato cristallino a forma amorfa.

4.4. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI CURCUMINA

4.4.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

L'analisi è stata condotta in flusso di Azoto a 50ml/min con il programma termico indicato in *Tabella 4.3*.

<i>EQUILIBRATE AT -25 °C</i>
<i>RAMP 10°C/min TO 350 °C</i>
<i>RAMP 10°C/min TO -25 °C</i>
<i>RAMP 10°C/min TO 25 °C</i>

Tabella 4.3 Programma termico DSC per analisi Curcumina pura

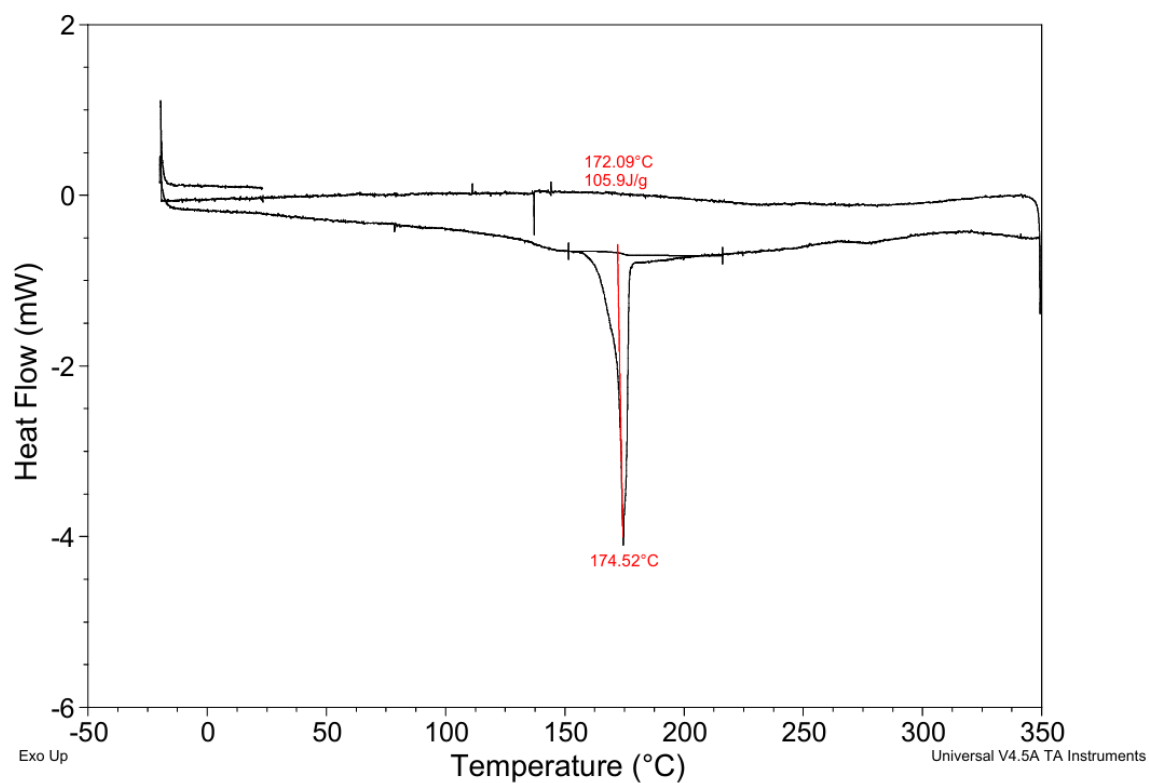


Figura 4.13 Termogramma DSC di Curcumina pura

Il termogramma in *Figura 4.13* mostra il picco endotermico di fusione della curcumina pura a 174.52 °C con una temperatura di onset pari a 172.09 °C e un'entalpia di fusione di 105.9 J/g, in linea con quanto atteso (il punto di fusione della curcumina pura si attesta tra 170 °C e 175 °C). Questo segnale è indice della purezza della curcumina come documentato in letteratura (19)

4.4.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)

L'analisi è stata condotta nell'intervallo angolare di 2θ compreso tra 5° e 70°. La scansione è stata eseguita impostando uno *step size* di 0,03°.

Per massimizzare il rapporto segnale/rumore è stata utilizzata una fenditura di divergenza di 0,3mm ed un coltello schermante (anti-scatter knife) di 1mm.

XRPD DI CURCUMINA

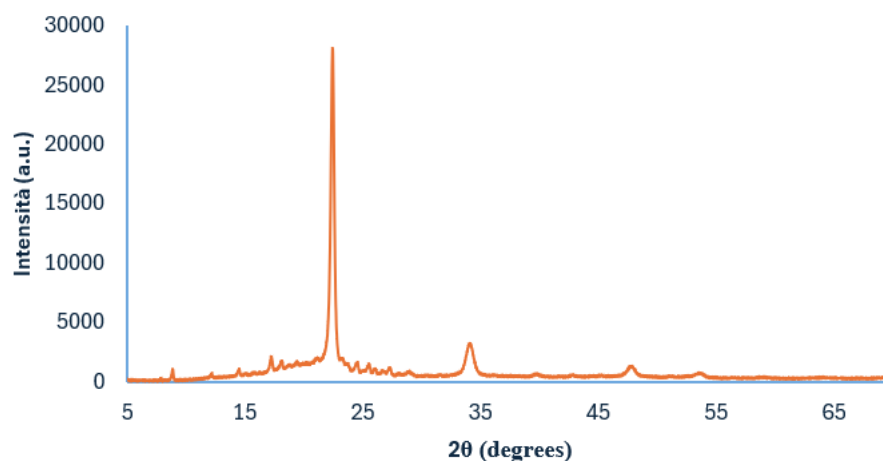


Figura 4.14 Diffrattogramma di Curcumina pura

Il diffrattogramma di curcumina in *Figura 4.14* mostra un picco dominante e intenso a circa 22.3°; si distinguono anche altri picchi di minore intensità a circa 8°, 17°, 18° e un picco isolato a circa 34°.

La presenza di picchi definiti e basso rumore di fondo conferma la natura altamente cristallina della polvere.

4.4.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

L'analisi è stata condotta nel range di *wavenumber* tra 4000 e 400 cm^{-1} , con una risoluzione di 4 cm^{-1} e 64 scansioni e correzione atmosferica attivata per eliminare i segnali dovuti all'aria nell'ambiente.

SPETTRO FT-IR DI CURCUMINA

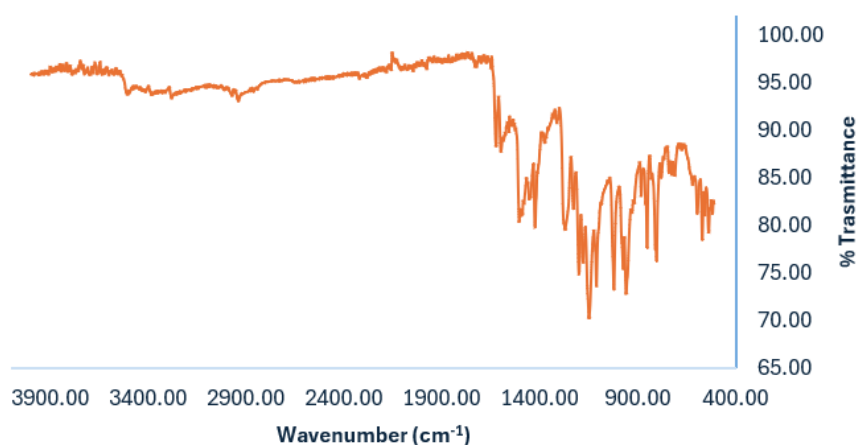


Figura 4.15 Spettro FT-IR di Curcumina pura

Lo spettro FT-IR di curcumina in *Figura 4.15* evidenzia i gruppi funzionali della molecola (sistema tautomerico cheto-enolico e due anelli fenolici):

- **Vibrazioni dei gruppi O-H ($3200 - 3500\text{ cm}^{-1}$):** si nota una banda d'assorbimento non eccessivamente profonda ma visibile attribuibile allo stretching dei gruppi ossidrilici fenolici (-OH).
- **Regione del sistema cheto-enolico coniugato ($1500 - 1650\text{ cm}^{-1}$):** è una delle zone più affollate e tipiche della curcumina:
 - Il picco acuto a circa 1626 cm^{-1} è associato alla vibrazione mista dello stretching del carbonile coniugato $\text{C}=\text{O}$ e del doppio legame $\text{C}=\text{C}$.
 - Il picco a circa 1602 cm^{-1} riflette lo stretching dell'anello aromatico.
 - Il forte segnale a circa 1510 cm^{-1} è legato alle vibrazioni miste di stretching $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}-\text{C}$.
- **Regione del "Fingerprint" ($1000 - 1450\text{ cm}^{-1}$):** sono chiaramente visibili i picchi del bending dei legami $\text{C}-\text{H}$ olefinici e lo stretching asimmetrico del legame etero $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ del gruppo metossilico (-OCH₃).

Anche in questo caso le analisi confermano che il campione di partenza di curcumina è puro ed in forma cristallina. (19)

4.5. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI ZIF-8@CURCUMINA

4.5.1. Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

L'analisi DSC sul sistema ZIF-8@Curcumina permette di valutare eventuali cambiamenti nel comportamento termico di ZIF-8 a seguito dell'incapsulamento della molecola bioattiva.

Il programma termico impostato è indicato in *Tabella 4.4*.

RAMP $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ TO 250°C
RAMP $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ TO 25°C

Tabella 4.4 Programma termico DSC per analisi ZIF-8@Curcumina

L'analisi è stata condotta sotto flusso di Azoto (N₂) di 50ml/min.

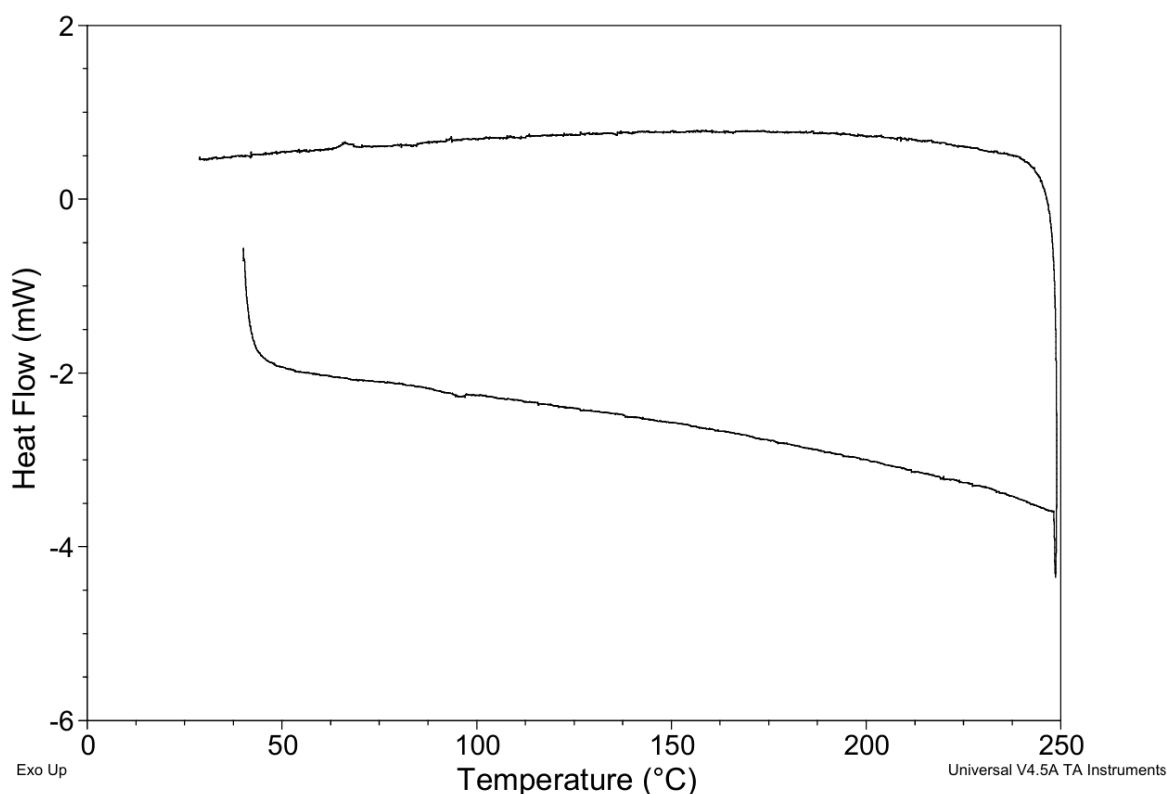


Figura 4.16 Termogramma DSC di ZIF-8@Curcumina

Il termogramma in *Figura 4.16* mostra un comportamento termico pressoché identico a quello del campione di ZIF-8 in *Figura 4.1*.

Inoltre, possiamo notare l'assenza del picco di fusione endotermico della curcumina a 174.52 °C.

Questi due elementi possono suggerire il buon incapsulamento e/o la conseguente amorfizzazione della molecola bioattiva nella struttura di ZIF-8.

La struttura continua a mantenere un'elevata stabilità termica anche in presenza di curcumina confinata all'interno dei pori.

4.5.2. Diffrazione a Raggi X su polveri (XRPD)

L'analisi è stata condotta nell'intervallo angolare di 2θ compreso tra 5° e 40°. La scansione è stata eseguita impostando uno *step size* di 0,03° per un totale di 1152 *steps*.

Per massimizzare il rapporto segnale/rumore è stata utilizzata una fenditura di divergenza di $0,3\text{mm}$ ed un coltello schermante (anti-scatter knife) di 1mm .

XRPD DI ZIF-8@CURCUMINA

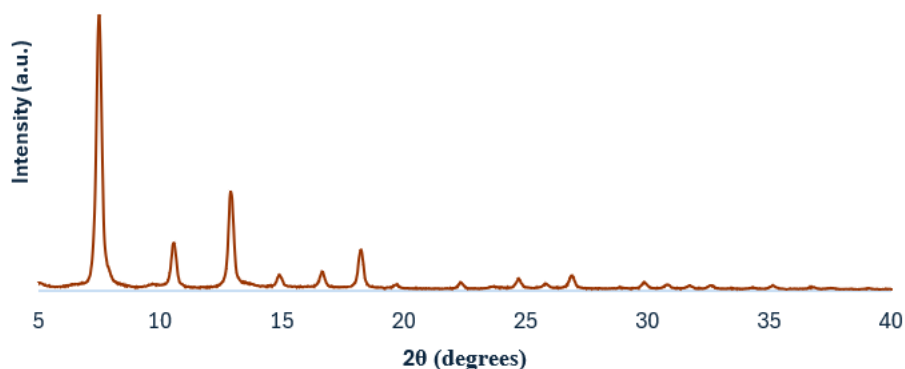


Figura 4.17 Diffrattogramma di ZIF-8@Curcumina

XRPD SOVRAPPOSTI

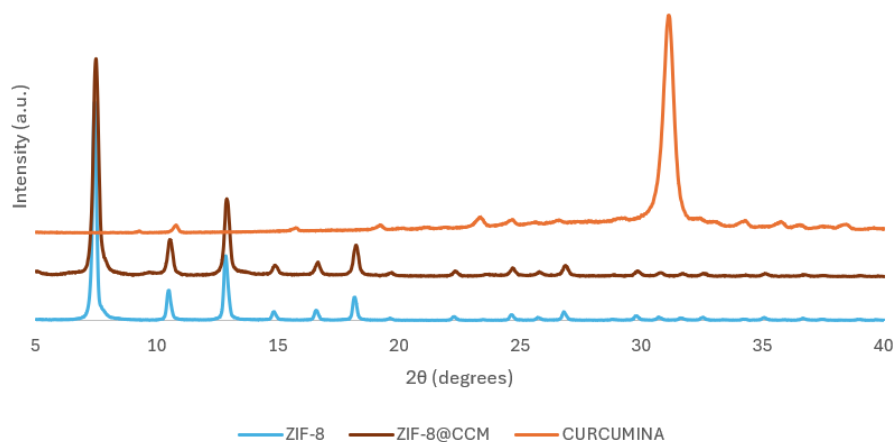


Figura 4.18 Diffrattogrammi sovrapposti di ZIF-8, ZIF-8@Curcumina e Curcumina pura

In *Figura 4.18* sono riportati i diffrattogrammi sovrapposti di ZIF-8, ZIF-8@Curcumina e curcumina pura; anche in questo caso si può notare il mantenimento della struttura di ZIF-8 anche in seguito a incapsulamento dell'API; è possibile, infatti, notare che i picchi caratteristici di ZIF-8 (7.3° , 10.4° , 12.7°) vengono mantenuti anche nel composto ZIF-8@Curcumina e si possono attribuire ai piani reticolari caratteristici (011), (002), (112), (022), (013) e (222).

Inoltre, confrontando direttamente il pattern di curcumina pura e il pattern di ZIF-8@Curcumina è evidente l'assenza dei picchi del principio attivo nel composto sintetizzato.

Questo conferma ulteriormente che la curcumina si trova per la maggior parte intrappolata nei pori e che la struttura dello ZIF non ha risentito chimicamente dell'incapsulamento. (18)

4.5.3. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

L'analisi è stata condotta nel range di *wavenumber* tra 4000 e 400 cm^{-1} , con una risoluzione di 4 cm^{-1} e 64 scansioni e correzione atmosferica attivata per eliminare i segnali dovuti all'aria nell'ambiente.

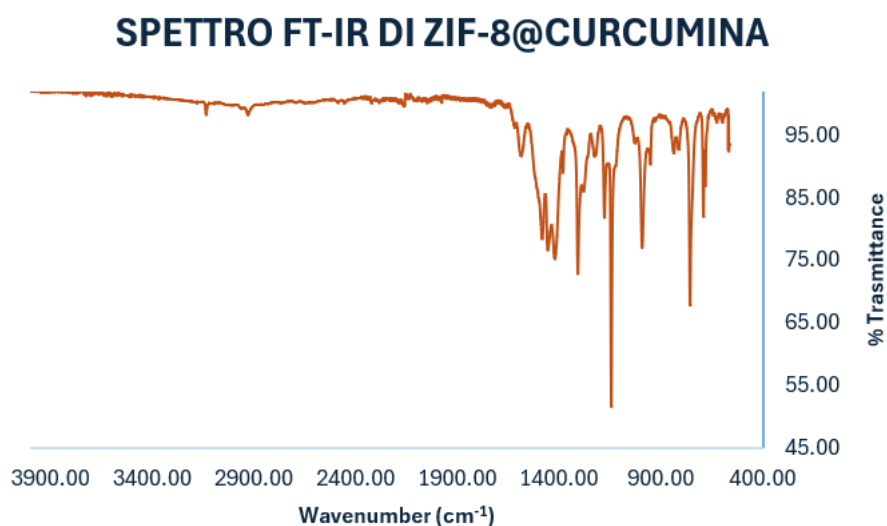


Figura 4.19 Spettro FT-IR di ZIF-8@Curcumina

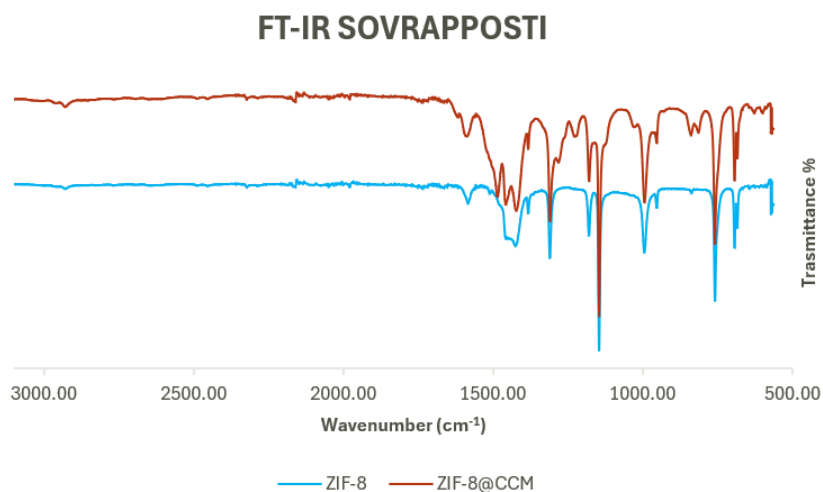


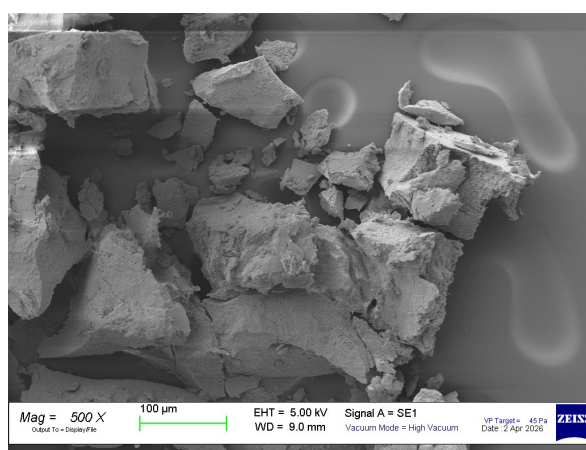
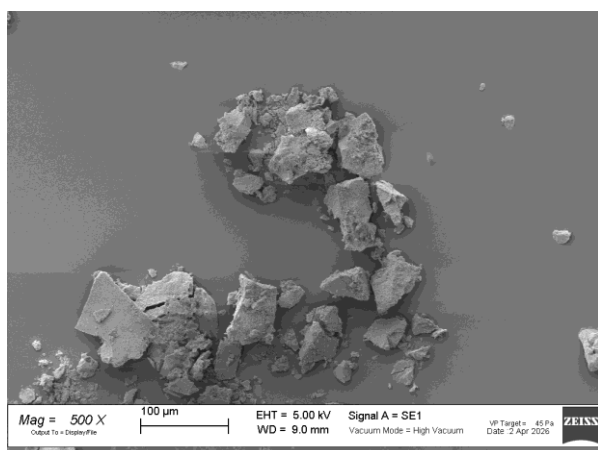
Figura 4.20 Spettri FT-IR sovrapposti di ZIF-8 e ZIF-8@Curcumina

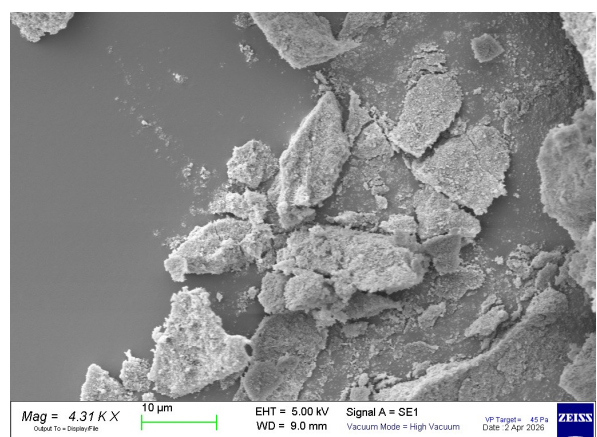
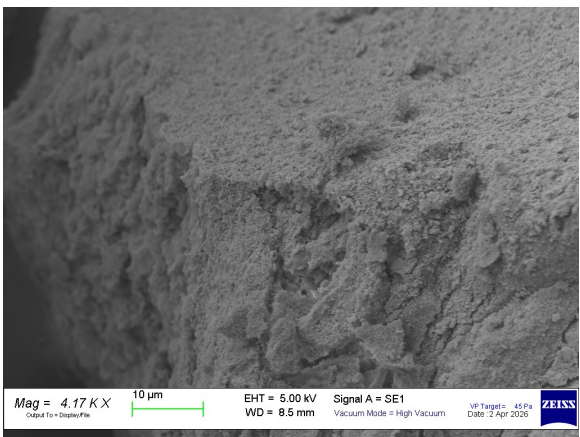
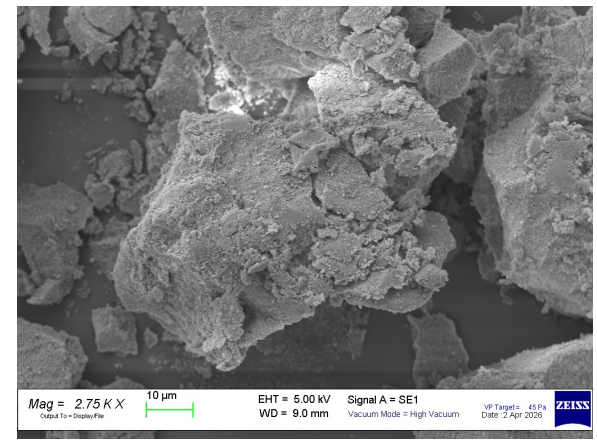
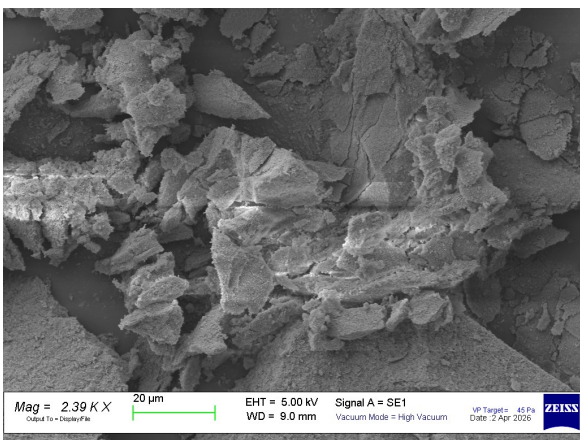
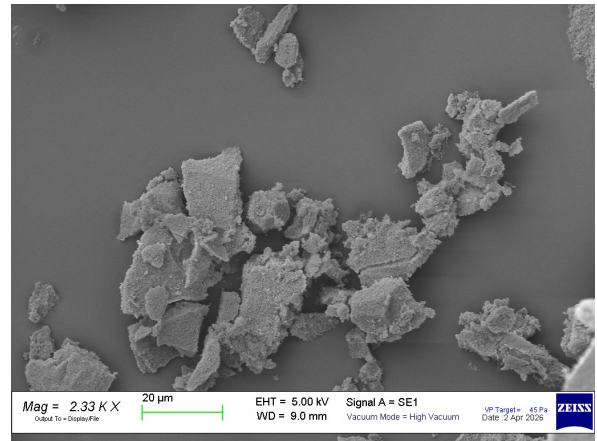
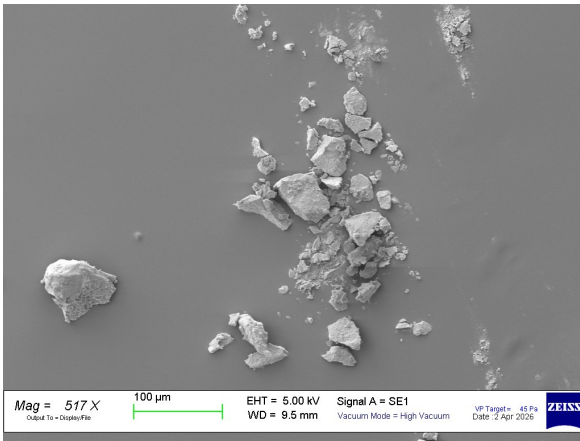
Come si nota in *Figura 4.20* lo spettro FT-IR di ZIF-8@Curcumina evidenzia deboli variazioni nella regione $1000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ rispetto allo spettro FT-IR di ZIF-8, dovuti alla presenza dei gruppi aromatici e cheto-enolici della curcumina.

Essendo intrappolata nel reticolo i suoi moti vibrazionali risultano influenzati dalla formazione di legami intermolecolari deboli con le pareti organiche della struttura.

4.5.4. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Per indagare la morfologia del sistema ZIF-8@Curcumina è stata effettuata un'analisi al Microscopio Elettronico a Scansione.





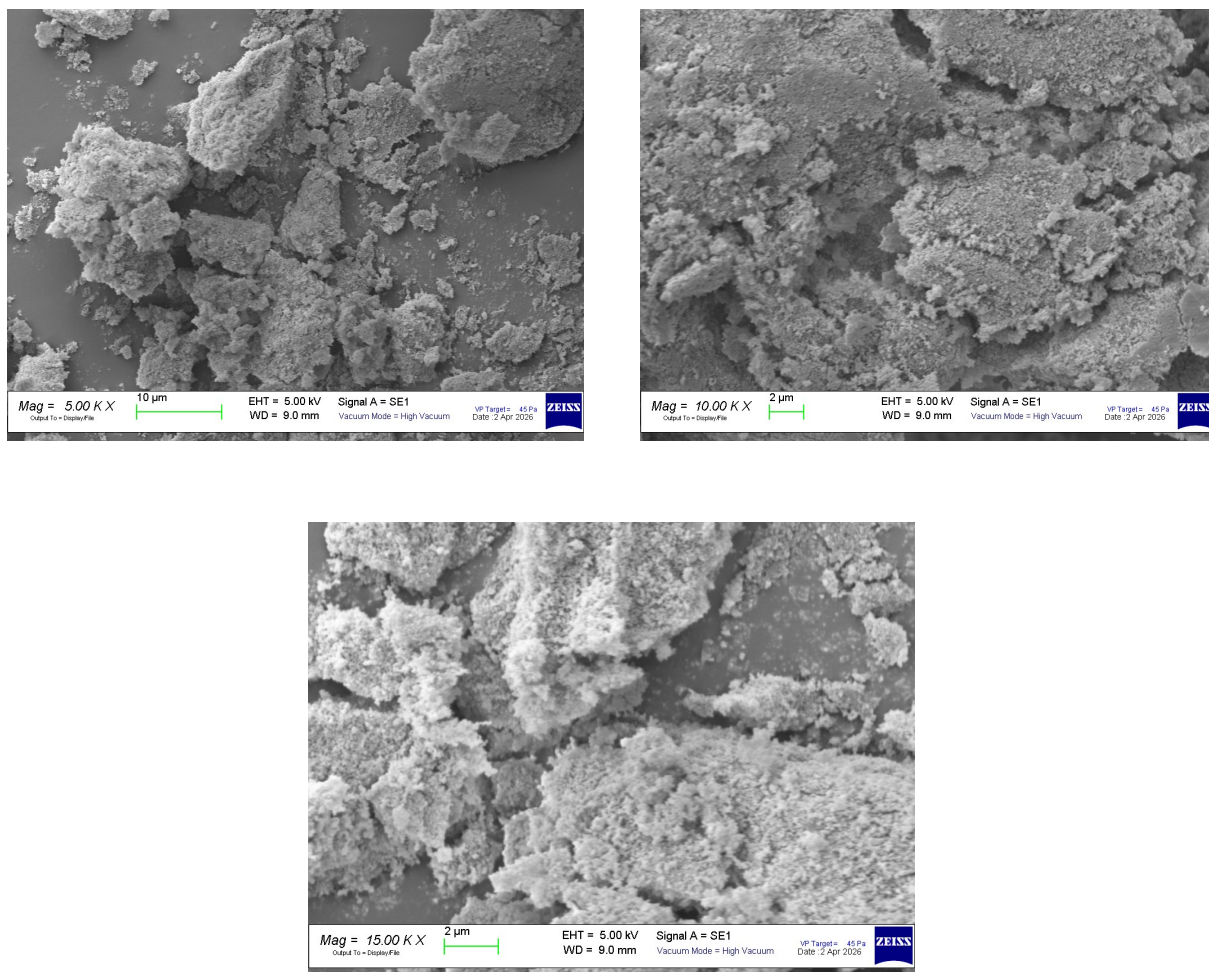


Figura 4.21 Immagini SEM di ZIF-8@Curcumina a diversi ingrandimenti

Dalle immagini SEM in *Figura 4.21* si possono notare diverse caratteristiche morfologiche:

- A bassi ingrandimenti (550x – 517x): si notano macro-agglomerati irregolari, non si osserva una polvere fine e ben dispersa ma una morfologia a scaglie compatte. Questo comportamento può essere dovuto all'incorporazione e interazione con una molecola organica ingombrante e idrofobica come la curcumina che altera il processo di crescita di ZIF-8
- A medi ingrandimenti (2.75K x – 4.17K x – 4.31K x – 5.00K x): si nota che la superficie degli agglomerati non è liscia ma presenta un'elevata rugosità e una texture porosa. I blocchi più grandi sono in realtà formati da unità più piccole. Si possono notare anche fratture superficiali probabilmente dovute alle interazioni particellari guidate dalla curcumina.
- Ad alti ingrandimenti (15.00K x): qui emerge la vera natura del composito ovvero la perdita della struttura cristallina dello ZIF-8 puro e la presenza di

nanosfere irregolari e interconnesse. Questo cambiamento morfologico potrebbe essere dovuto dalla presenza di curcumina durante la crescita del network che ha ostacolato l'accrescimento delle facce cristalline.

Siamo di fronte ad una struttura molto agglomerata formata da un'unione di nanoparticelle irregolari. L'assenza dei cristalli dodecaedrici di ZIF-8 suggerisce che la curcumina ha influenzato il processo di crescita del reticolo cristallino della matrice.

4.6. ANALISI DSC DI ACIDO LAURICO, ACIDO MIRISTICO E ACIDO PALMITICO

Prima di caratterizzare le miscele eutettiche ottenute è stato valutato il comportamento termico degli acidi grassi di partenza utilizzati per valutarne la purezza e i punti di fusione.

Le analisi DSC per i tre acidi grassi sono state condotte in flusso d'Azoto a 50ml/min con impostato il programma termico indicato in *Tabella 4.5*.

EQUILIBRATE AT -20°C
RAMP 10°C/min TO 80°C
RAMP 10°C/min TO -20°C
EQUILIBRATE AT 20°C

Tabella 4.5 Programma termico DSC per analisi acidi grassi puri

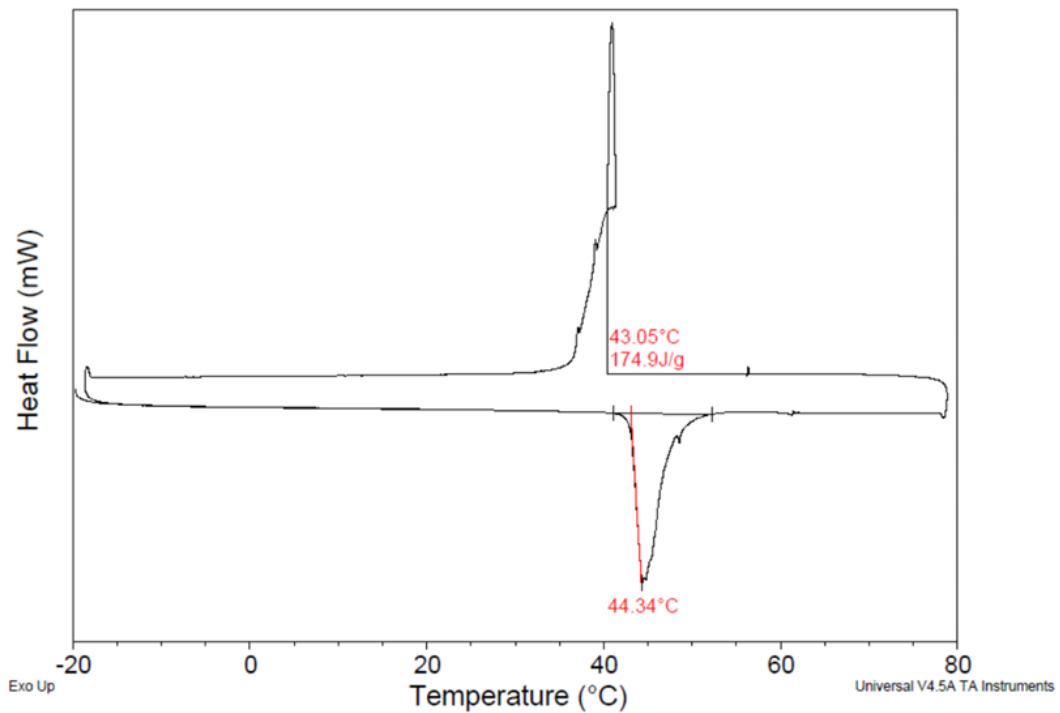


Figura 4.22 Termogramma DSC di Acido Laurico puro

Il termogramma di Acido Laurico in *Figura 4.22* presenta una temperatura di picco a 44.34 °C. Il picco è ben definito e stretto, tipico di una sostanza pura con transizione di fase netta.

Mostra una temperatura di *onset* valutata a 43.05 °C con un'entalpia di solidificazione associata pari a 174.9 J/g.

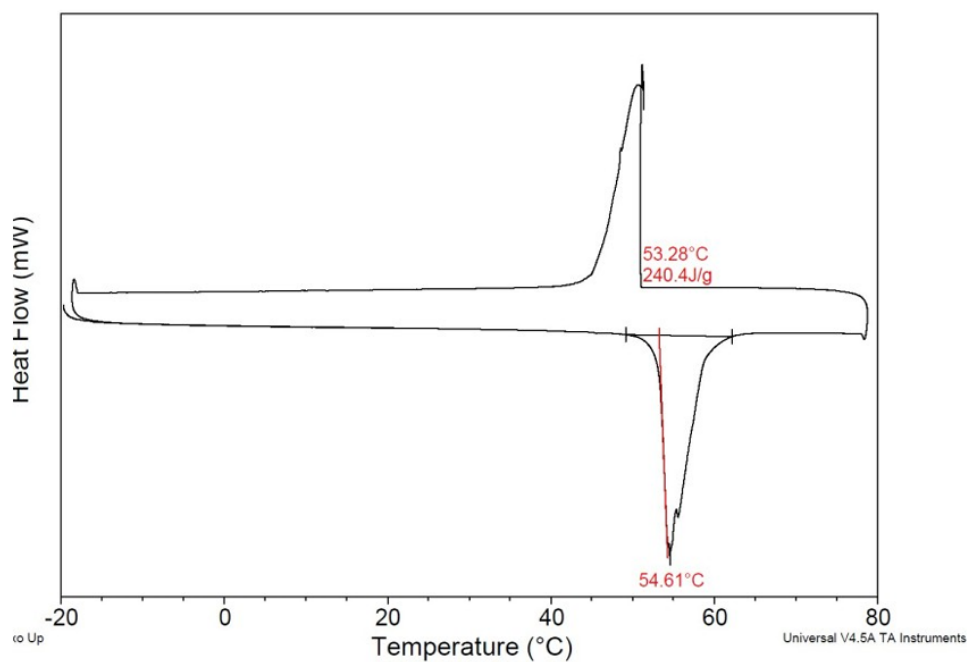


Figura 4.23 Termogramma DSC di Acido Miristico puro

Il termogramma di Acido Miristico in *Figura 4.23* indica una temperatura di picco a 54.61°C.

L'onset di cristallizzazione è a 53.28 °C con un calore latente rilasciato nettamente superiore, pari a 240.4 J/g.

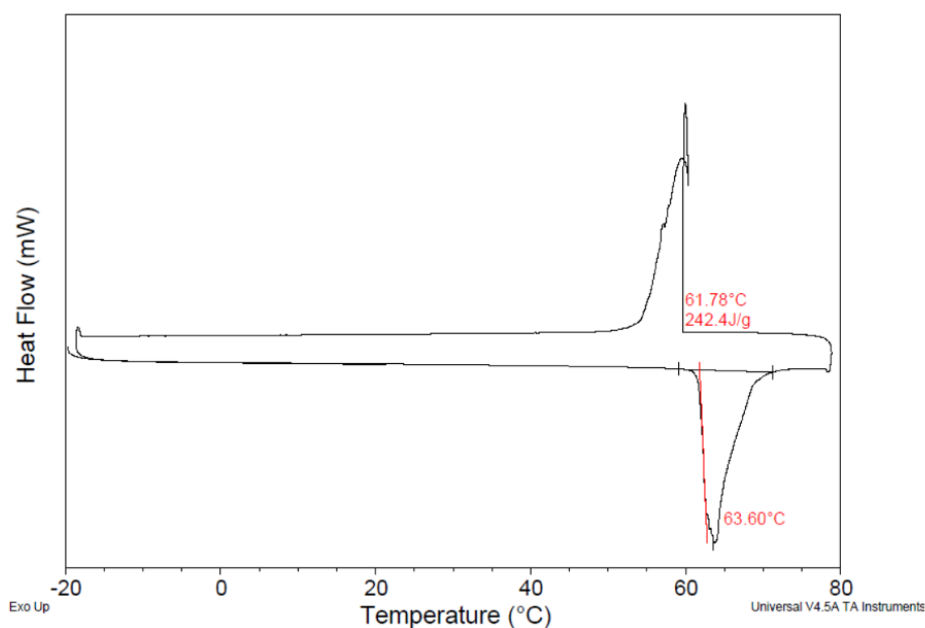


Figura 4.24 Termogramma DSC di Acido Palmitico puro

Il termogramma di Acido Palmitico rappresentato in *Figura 4.24* Mostra un picco di fusione a 63.60 °C e una temperatura di onset è a 61.78 °C con un'entalpia di cristallizzazione pari a 242.4 J/g.

L'analisi DSC dei 3 acidi grassi di partenza ha dimostrato la loro purezza.

4.7. ANALISI DSC DI MISCELE EUTETTICHE DI ACIDI GRASSI (PCM)

4.7.1. Miscele Binarie di Acidi Grassi

L'analisi DSC per tutte le miscele binarie di acidi grassi realizzate è stata condotta sotto flusso di Azoto di 50ml/min e impostando il programma termico indicato in Tabella 4.6.

EQUILIBRATE AT 20°C
RAMP 5°C/min TO 80°C
RAMP 5°C/min TO 20°C

Tabella 4.6 Programma termico utilizzato per analisi DSC di miscele binarie

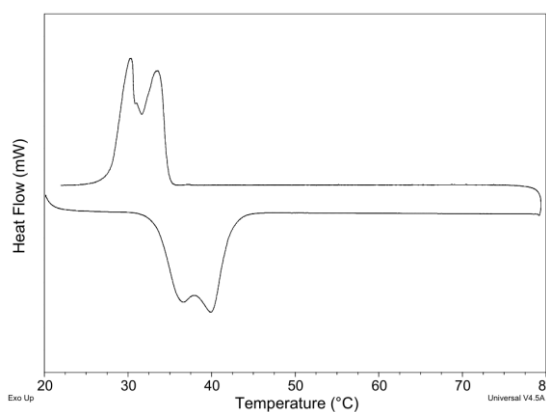


Figura 4.25 (a) Termogramma miscela LA/PA 60/40
PROVA1

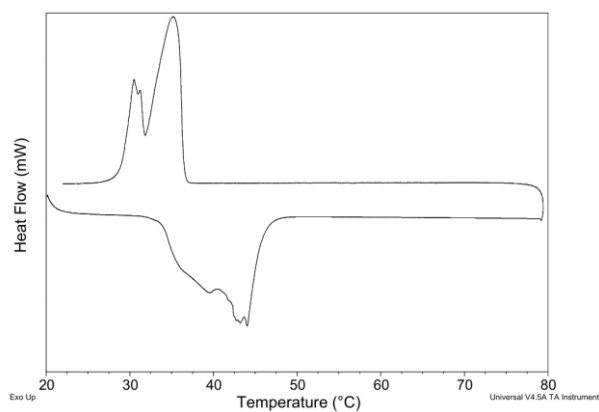


Figura 4.25 (b) Termogramma miscela LA/PA 55/45
PROVA2

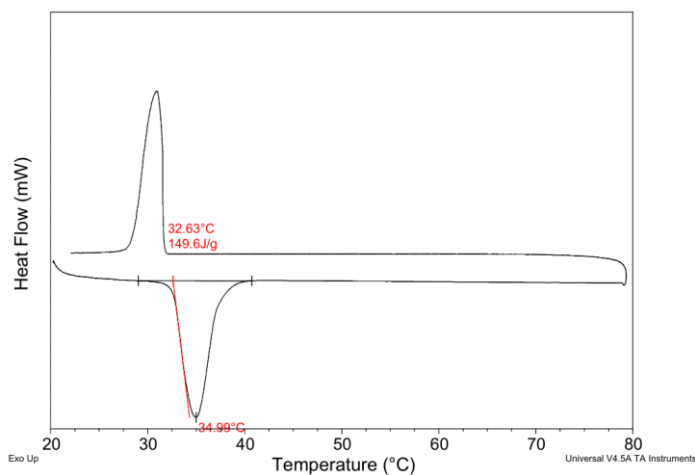


Figura 4.25 (c) Termogramma miscela LA/MA 66/34
PROVA3

In *Figura 4.25 (a), (b) e (c)* sono riportati i termogrammi delle miscele binarie che non si sono rivelate idonee allo scopo previsto.

Il profilo termico della miscela LA/MA 66/34, in *figura 4.25 (c)*, sembra rappresentare un'ottima miscela eutettica data la presenza di un singolo e nitido picco di fusione, ma la temperatura di picco a 34.99°C risulta troppo bassa per lo scopo prefissato. Inoltre, la nitidezza del picco suggerisce che la proporzione ideale tra i 2 acidi grassi sia già stata raggiunta e che quindi non sia possibile effettuare modifiche cercando di aumentare il punto di fusione alla temperatura voluta.

L'ultima miscela binaria preparata è stata quella formata da Acido Miristico e Acido Palmitico in proporzione 63/37, il cui termogramma è rappresentato in *Figura 4.26*.

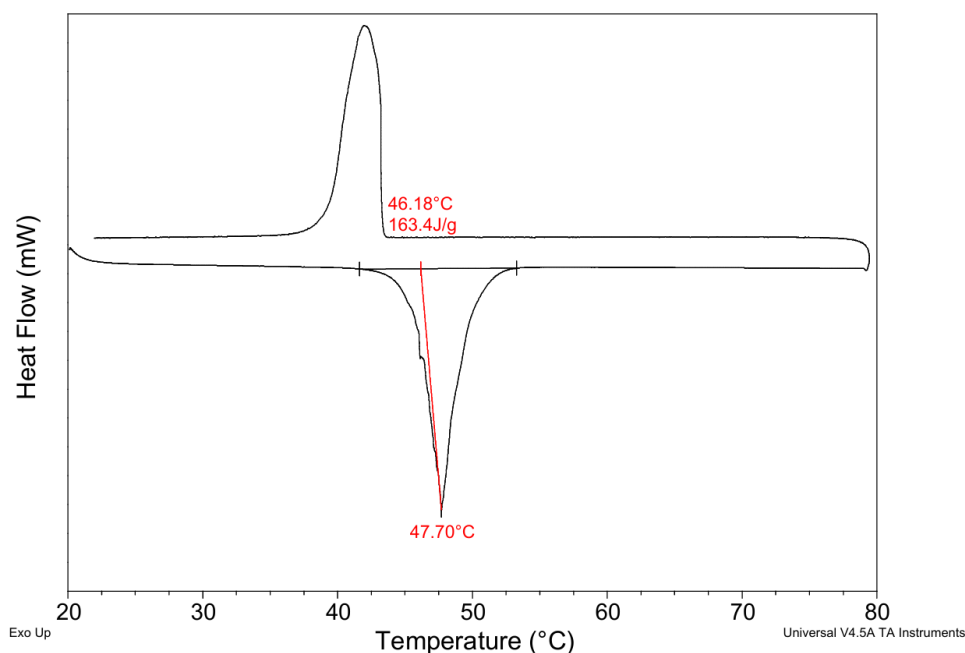


Figura 4.26 Termogramma miscela MA/PA 63/37 PROVA4

Il termogramma in *Figura 4.26* mostra un unico picco di fusione segno che si è formata una miscela eutettica di acido miristico e acido palmitico. La temperatura di picco a 47.70°C risulta però ancora troppo alta per il rivestimento lipidico voluto ed inoltre, la presenza di piccole spalle laterali a sinistra sul picco, fa pensare che non si sia ancora raggiunta la proporzione ideale di acidi grassi. Si è pensato così di provare ad abbassare il punto di fusione della miscela aggiungendo progressivamente acido laurico, che fonde ad una temperatura inferiore rispetto agli altri due acidi grassi, formando così una miscela ternaria.

4.7.2. Miscele Ternarie di Acidi Grassi

L'analisi DSC per tutte le miscele ternarie di acidi grassi realizzate è stata condotta sotto flusso di Azoto di 50ml/min e impostando il programma termico indicato in Tabella 4.7.

EQUILIBRATE AT 20°C
RAMP 5°C/min TO 80°C
RAMP 5°C/min TO 20°C
RAMP 5°C/min TO 80°C
RAMP 5°C/min TO 20°C

Tabella 4.7 Programma termico utilizzato per analisi DSC di miscele ternarie

Si sono quindi effettuati 2 cicli di riscaldamento intervallati da un ciclo di raffreddamento controllato, questo programma permette di cancellare la storia termica del campione durante il primo riscaldamento ed ottenere una migliore omogeneizzazione del campione che si traduce in una migliore miscelazione a livello molecolare degli acidi grassi.

È stato analizzato il cambiamento del profilo termico della miscela ternaria realizzata con aggiunte progressive di acido laurico alla miscela binaria MA/PA 63/37.

Aggiunta di 5% di acido laurico → Miscela ternaria MA/PA/LA 60/35/5:

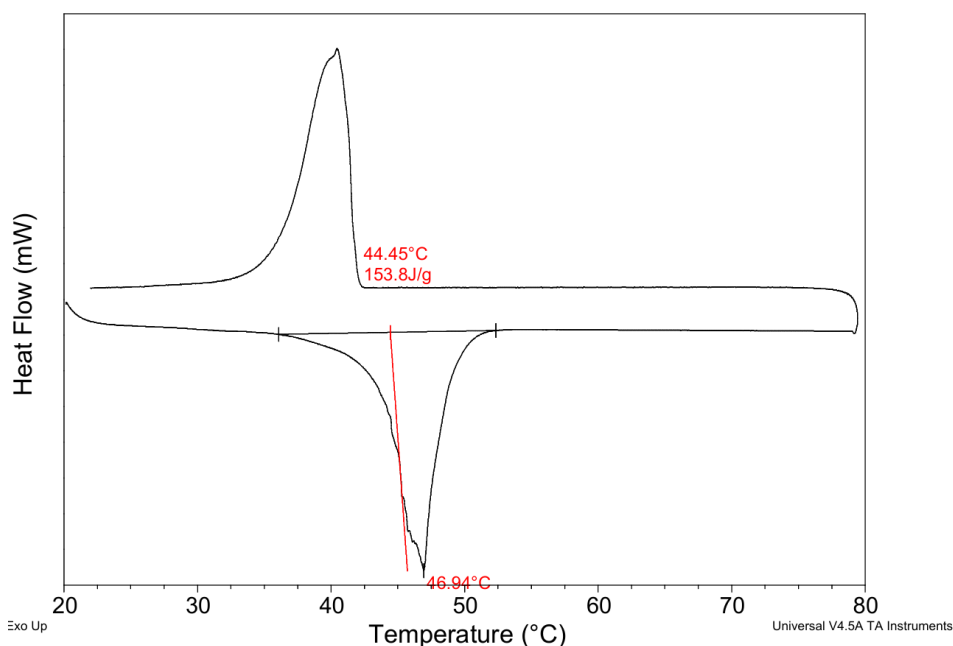


Figura 4.27 Termogramma miscela MA/PA/LA 60/35/5 Ciclo 1

Dal termogramma in *Figura 4.27* è possibile notare che l'aggiunta di 5% di acido laurico ha abbassato leggermente il punto di fusione da 47.70°C (*figura 4.26*) a 46.94 °C.

Aggiunta di 8% di acido laurico → Miscela ternaria MA/PA/LA 58/34/8

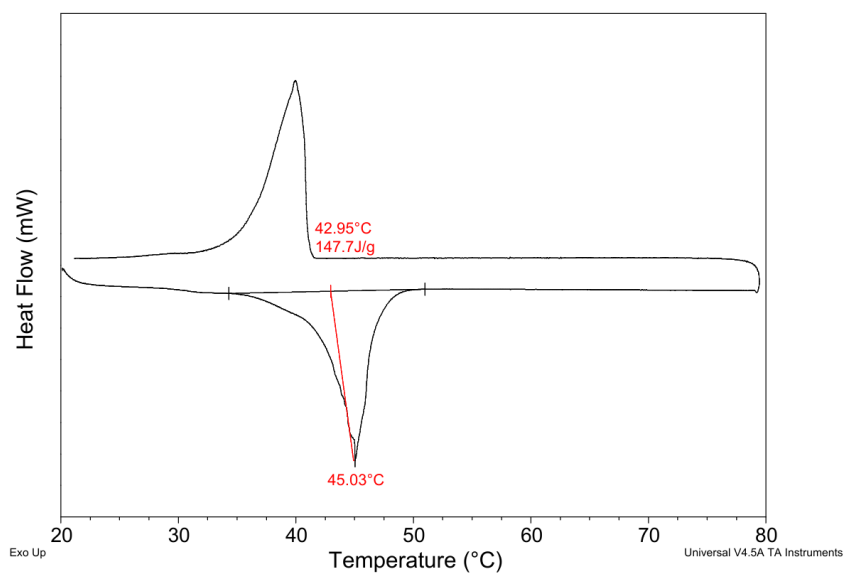


Figura 4.28 (a) Termogramma miscela MA/PA/LA 58/34/8 Ciclo 1

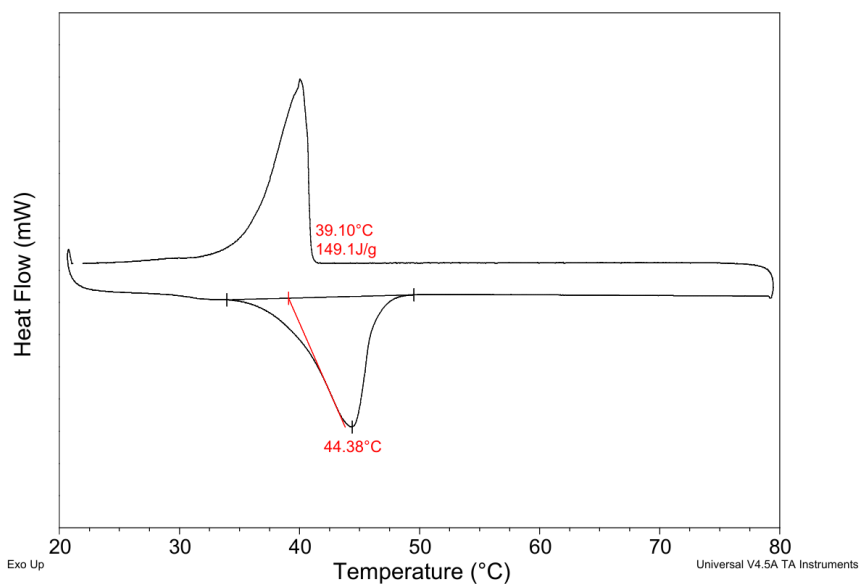


Figura 4.28 (b) Termogramma miscela MA/PA/LA 58/34/8 Ciclo 2

I termogrammi in *Figura 4.28* mostrano il primo ciclo (a) e il secondo ciclo (b) di riscaldamento della miscela ottenuta aggiungendo 8% di acido laurico.

Anche qui è possibile notare che l'aumento di acido laurico provoca l'ulteriore abbassamento del punto di fusione da 46.94°C (*Figura 4.27*) a 44.38°C.

È anche visibile la migliore definizione del picco nel secondo ciclo rispetto al primo indice della migliore omogeneizzazione del campione.

Aggiunta di 10% di acido laurico → Miscela ternaria MA/PA/LA 57/33/10

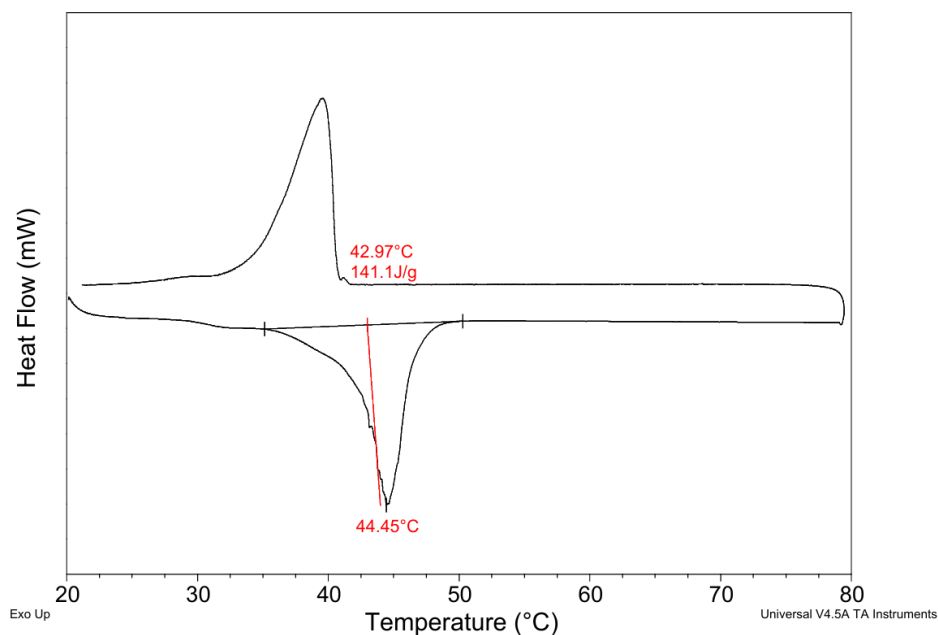


Figura 4.29 (a) Termogramma miscela MA/PA/LA 57/33/10 Ciclo 1

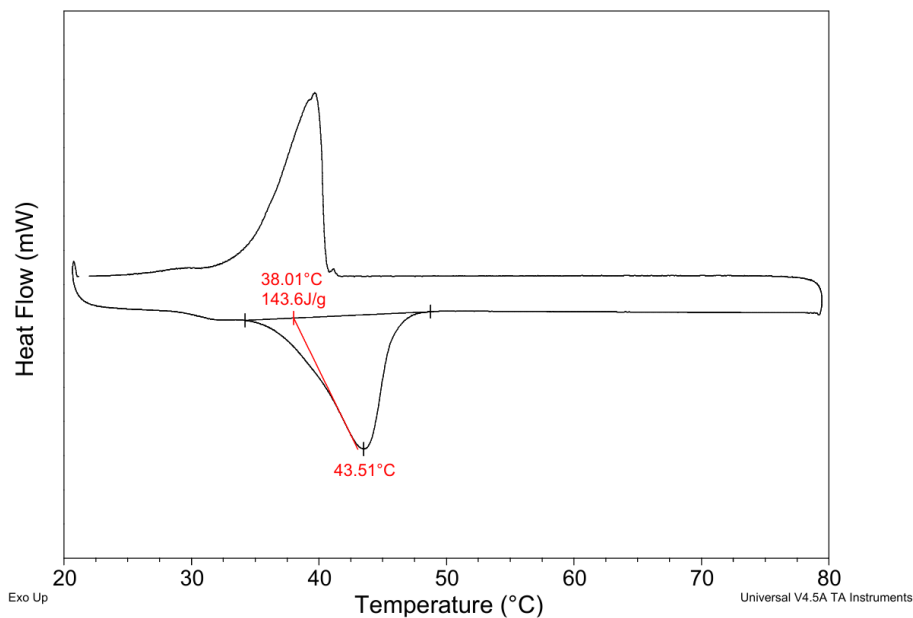


Figura 4.29 (b) Termogramma miscela MA/PA/LA 57/33/10 Ciclo 2

I termogrammi in *Figura 4.29* mostrano il primo ciclo (a) e il secondo ciclo (b) di riscaldamento della miscela ottenuta aggiungendo 10% di acido laurico.

Si nota l'ulteriore abbassamento del punto di fusione da 44.38°C [Figura 4.28 (b)] a 43.51°C.

Aggiunta di 11% di acido laurico ➡ Miscela ternaria MA/PA/LA 56/33/11

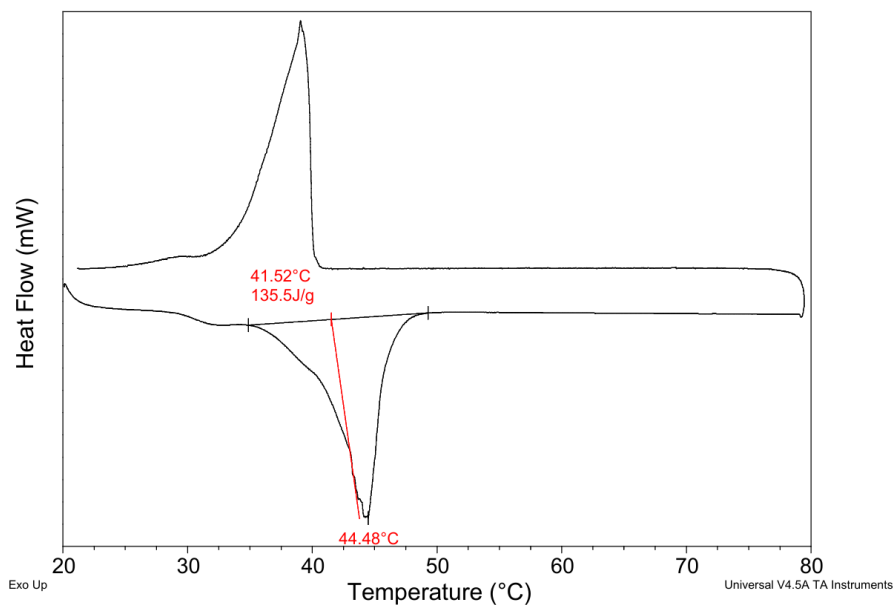


Figura 4.30 (a) Termogramma miscela MA/PA/LA 56/33/11 Ciclo 1

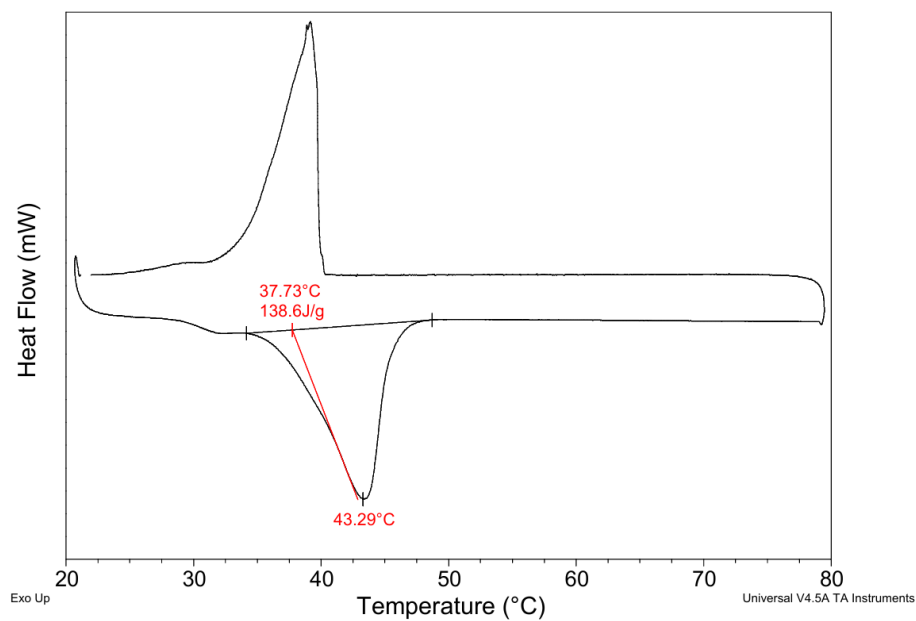


Figura 4.30 (b) Termogramma miscela MA/PA/LA 56/33/11 Ciclo 2

I termogrammi in *Figura 4.30* mostrano il primo ciclo (a) e il secondo ciclo (b) di riscaldamento della miscela ottenuta aggiungendo 11% di acido laurico.

Si nota l'ulteriore abbassamento del punto di fusione da 43.51°C [*Figura 4.29 (b)*] a 43.29°C.

Aggiunta di 30% di acido laurico ➡ Miscela ternaria MA/PA/LA 44/26/30

Aggiunta di 50% di acido laurico ➡ Miscela ternaria MA/PA/LA 32/18/50

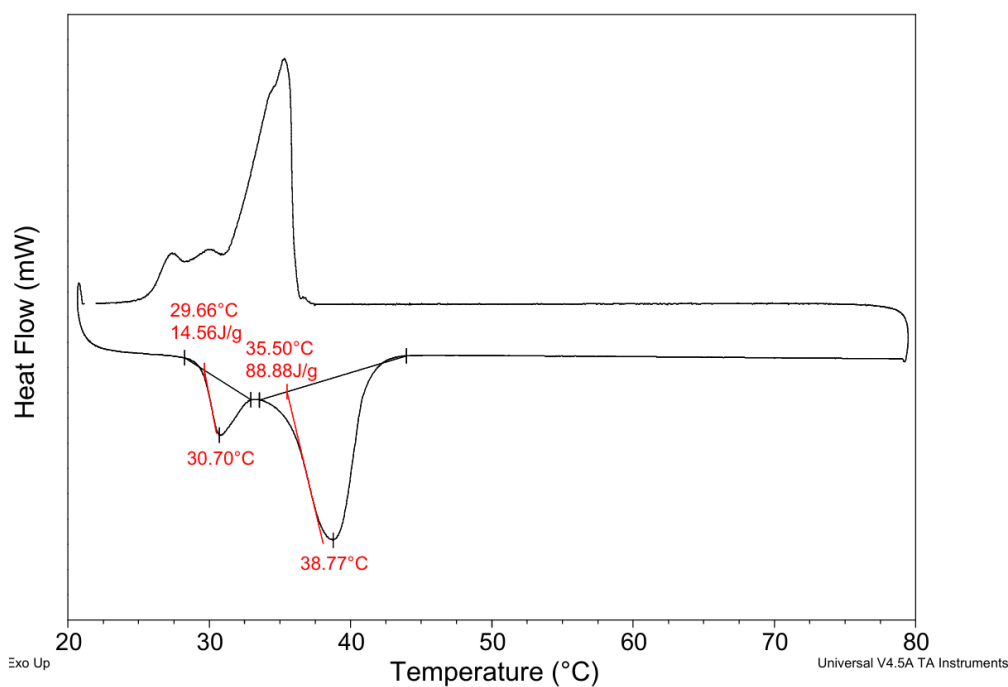


Figura 4.31 Termogramma miscela MA/PA/LA 44/26/30 Ciclo 2

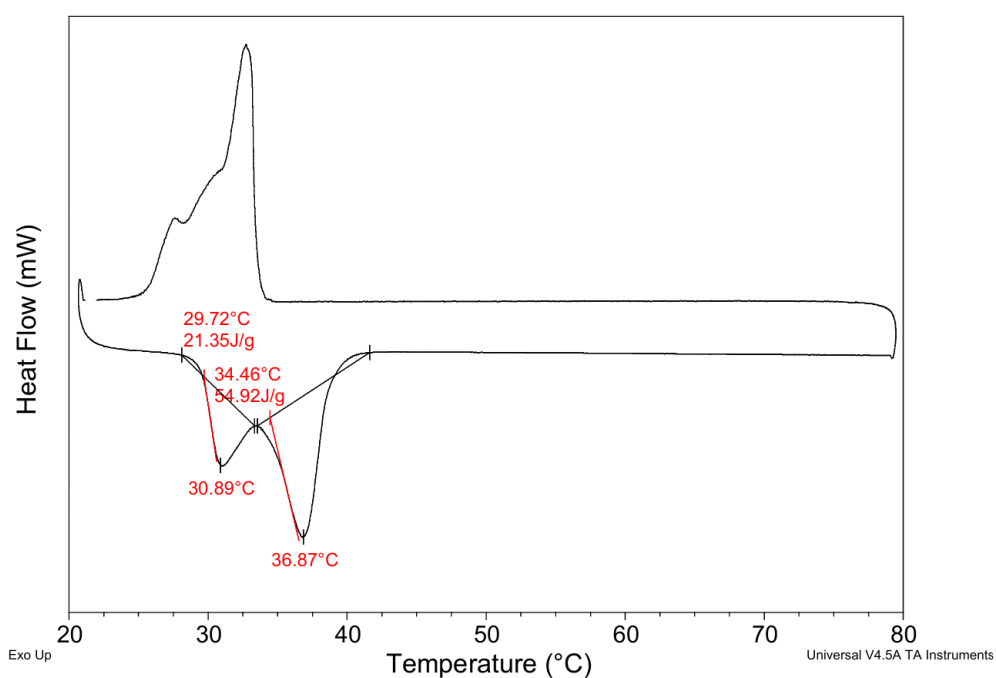


Figura 4.32 Termogramma miscela MA/PA/LA 32/18/50 Ciclo 2

L'aggiunta del 30% di acido laurico (*Figura 4.31*) e del 50% dello stesso (*Figura 4.32*) mostra la separazione del picco di fusione in 2 picchi distinti indice del fatto che si sia superata la composizione ideale della miscela eutettica e che i componenti non siano più miscelati omogeneamente a formare una miscela eutettica ternaria ideale con un unico picco di fusione endotermico.

Grazie all'analisi DSC delle miscele eutettiche preparate è stato possibile individuare quella che maggiormente si avvicinava all'ideale per lo scopo di questo progetto ovvero il rivestimento lipidico dei sistemi farmaceutici ZIF-8@Ketoprofene e ZIF-8@Curcumina per ottenere nanocarriers termoresponsivi.

È stata quindi ripreparata e caratterizzata la miscela eutettica ternaria ottimale:
MA/PA/LA 56,57/33,02/10,41

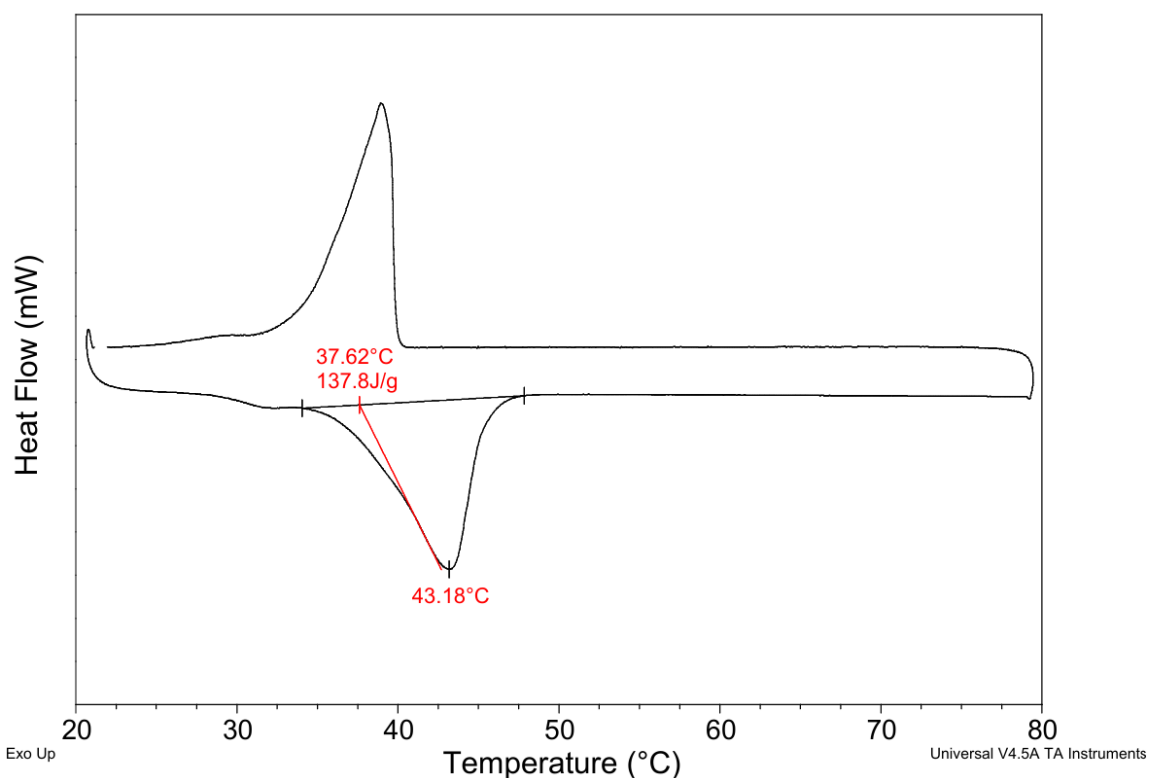


Figura 4.33 Termogramma Miscela eutettica ternaria MA/PA/LA 56,57/33,02/10,41 utilizzata come rivestimento lipidico dei sistemi farmaceutici (Ciclo 2)

Dall'analisi DSC in *Figura 4.33* si nota che la miscela eutettica ternaria presenta un intervallo di fusione che va da circa 35°C a circa 49°C con una temperatura di picco a 43.18°C e una temperatura di onset a 37.62°C. Questo intervallo di fusione rientra nell'intervallo di temperatura corporea e di stati febbrili o infiammatori quindi è idonea per il rivestimento dei nanocarriers farmaceutici.

4.8 ANALISI DSC DEI SISTEMI FINALI ZIF-8@KETOPROFENE@PCM E ZIF-8@CURCUMINA@PCM

È stata utilizzata l'analisi DSC per valutare l'avvenuto rivestimento dei sistemi nanostrutturati e per comprendere lo stato fisico dei componenti e le loro interazioni termiche.

L'analisi DSC per i sistemi farmaceutici finali è stata condotta sotto flusso di Azoto di 50ml/min e impostando il programma termico indicato in *Tabella 4.8*.

EQUILIBRATE AT 20°C
RAMP 5°C/min TO 80°C
RAMP 5°C/min TO 20°C
EQUILIBRATE AT 0°C
RAMP 5°C/min TO 350°C
RAMP 5°C/min TO 0°C
EQUILIBRATE AT 25°C

Tabella 4.8 Programma termico utilizzato per analisi DSC dei sistemi farmaceutici finali ottenuti dopo rivestimento con miscela eutettica

4.8.1. Analisi DSC di ZIF-8@KETOPROFENE@PCM

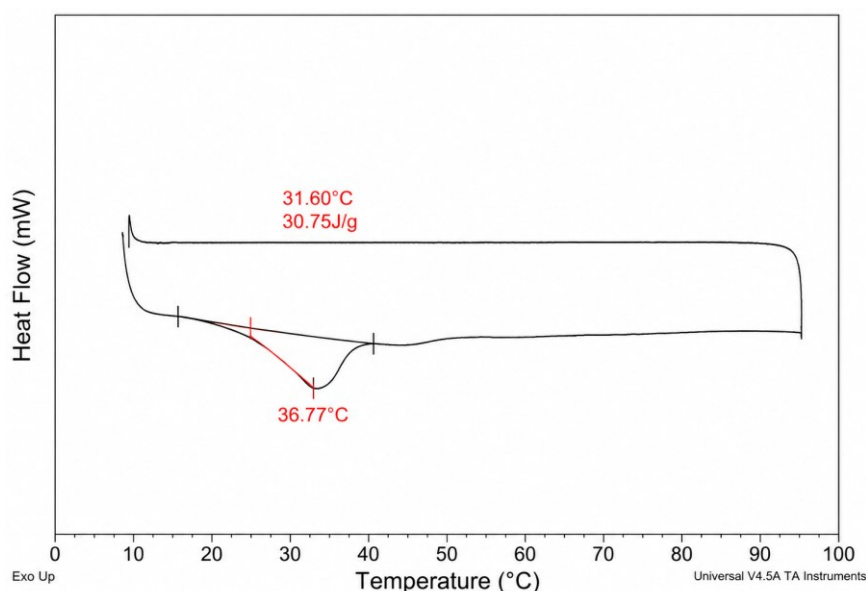


Figura 4.34 (a) Termogramma sistema ZIF-8@Ketoprofene@MAPALA Ciclo 1

Durante il primo ciclo di riscaldamento e raffreddamento DSC in *figura 4.34 (a)* del sistema ZIF-8@Ketoprofene@PCM è subito visibile l'abbassamento del punto di fusione rispetto alla miscela eutettica pura; infatti, è presente una temperatura di picco di 36.77°C.

Questo effetto è la prova dell'avvenuta interazione tra il rivestimento lipidico e il core di ZIF-8 perché la struttura preformata di ZIF-8+ketoprofene disturba l'impaccamento cristallino ideale dell'eutettico, abbassandone la temperatura di fusione.

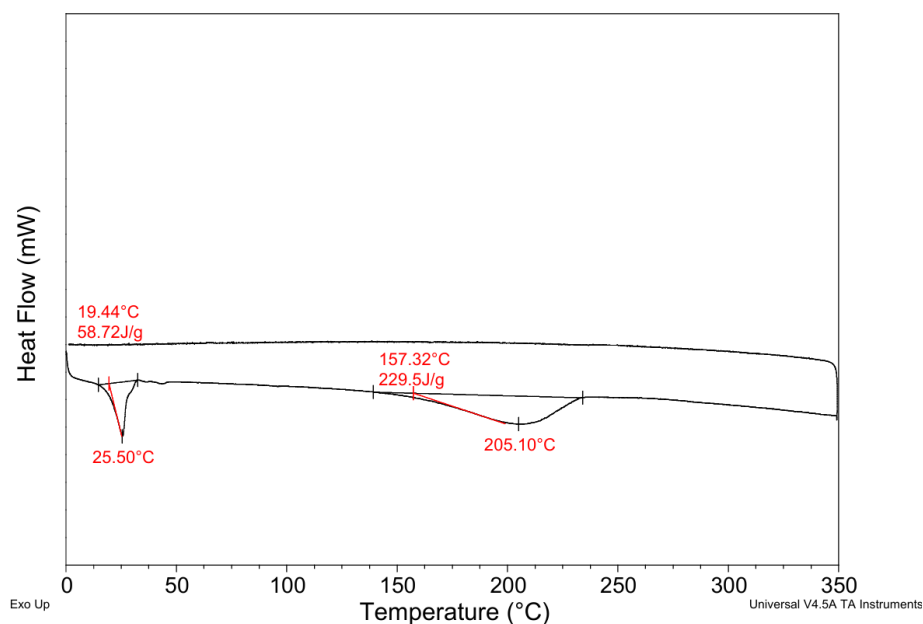


Figura 4.34 (b) Termogramma sistema ZIF-8@Ketoprofene@MAPALA Ciclo 2

Nel secondo ciclo di riscaldamento e raffreddamento in *figura 4.34 (b)* si può notare l'ulteriore abbassamento della temperatura di picco fino a 25.50 °C, questo comportamento suggerisce che il ketoprofene ostacola la riorganizzazione dell'eutettico intrappolandolo in uno stato disordinato che richiede un apporto termico inferiore per rifondere nel secondo ciclo. La presenza di una curva di transizione a 205.10°C può essere dovuta alla degradazione termica di uno o più componenti della miscela eutettica.

Da notare anche l'assenza del picco di fusione del ketoprofene puro a 96 °C, indice che il principio attivo è efficacemente inglobato.

4.8.2. Analisi DSC di ZIF-8@CURCUMINA@PCM

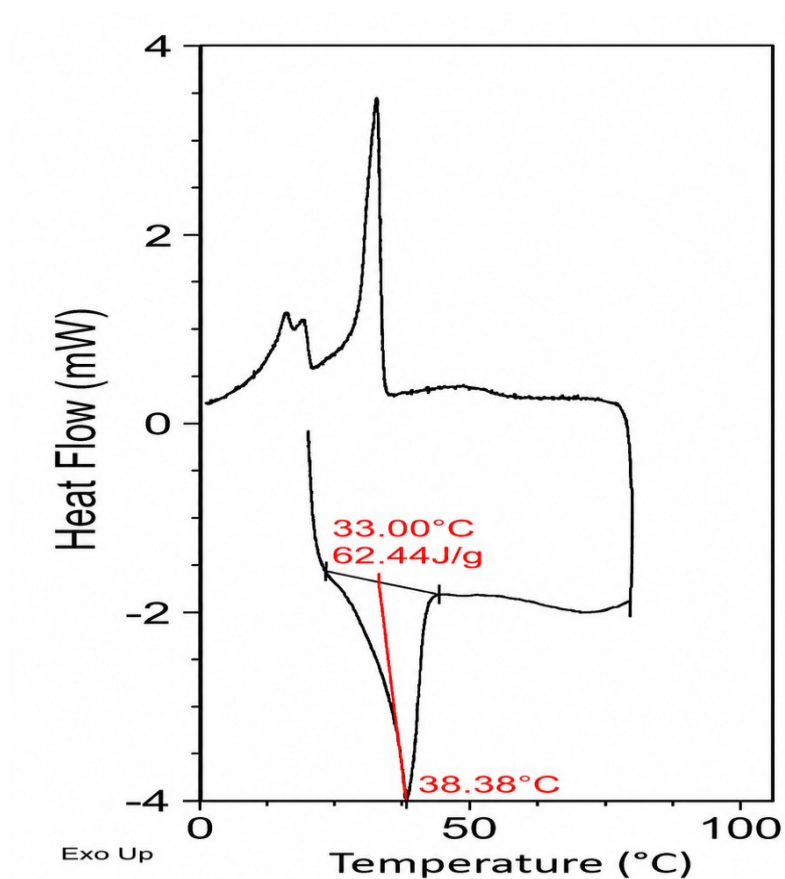


Figura 4.35 (a) Termogramma sistema ZIF-8@Curcumina@MAPALA Ciclo 1

Durante il primo ciclo di riscaldamento e raffreddamento in *figura 4.35 (a)* del sistema rivestito ZIF-8@Curcumina@PCM si può notare un picco di fusione con temperatura di picco a 38.38 °C e temperatura di onset a 33.00°C. Anche in questo caso si nota l'abbassamento del punto di fusione rispetto ai 43.18°C della miscela eutettica pura, effetto dovuto all'interazione della miscela a contatto con una matrice come ZIF-8.

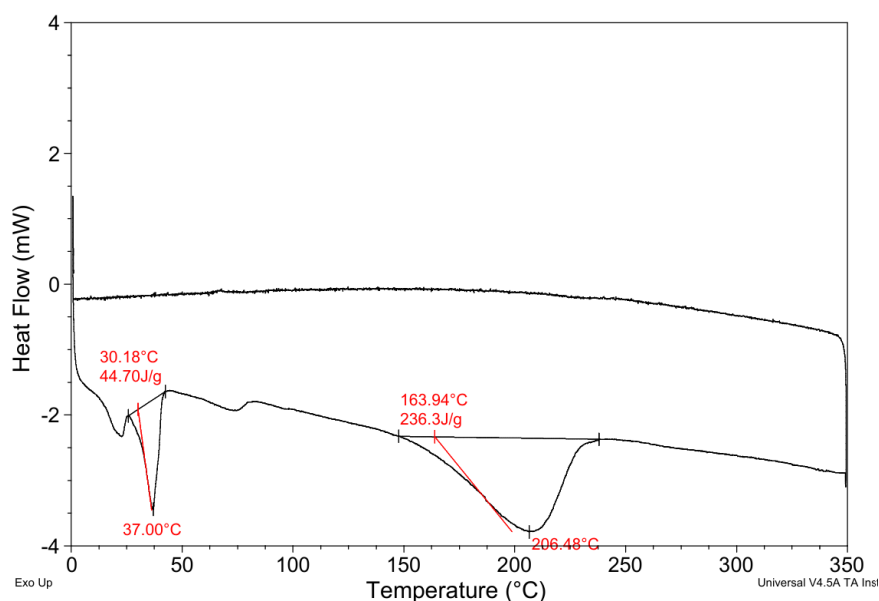


Figura 4.35 (b) Termogramma sistema ZIF-8@Curcumina@MAPALA Ciclo 2

Durante il secondo ciclo di riscaldamento e raffreddamento del sistema in *figura 4.35 (b)* si nota un leggero abbassamento della temperatura di fusione della miscela eutettica a 37.00°C con una temperatura di onset a 30.18°C e la comparsa di una curva di transizione a 206.48°C dovuta probabilmente alla degradazione termica di uno o più componenti della miscela eutettica oppure allo slittamento termico della fusione di curcumina.

Nel sistema con curcumina il fatto che la temperatura di fusione rimane praticamente invariata tra primo [*figura 4.35 (a)*] e secondo ciclo [*figura 4.35 (b)*] indica che la curcumina, a differenza del ketoprofene, interagisce meno con il rivestimento di acidi grassi e ne altera poco la cristallizzazione, favorisce, al contrario, una ricristallizzazione ordinata dell'eutettico.

4.8.3. CONFRONTO TRA ZIF-8@KETOPROFENE@PCM E ZIF-8@CURCUMINA@PCM

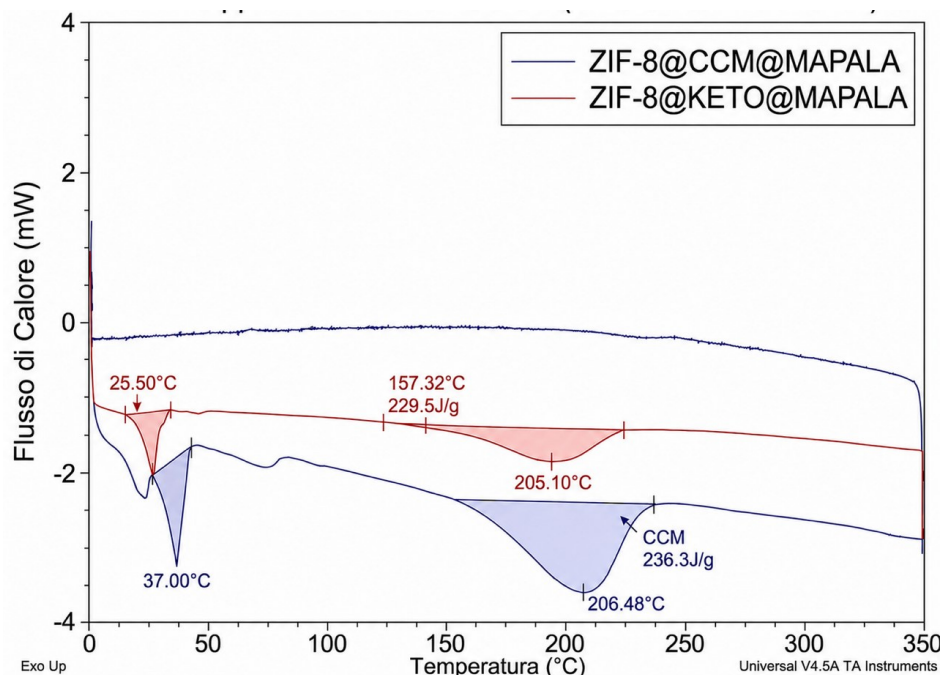


Figura 4.36 Confronto profilo DSC dei due sistemi farmaceutici ottenuti

In Figura 4.36 è possibile osservare il confronto diretto tra i profili termici dei due sistemi farmaceutici, si osserva la differente temperatura di fusione del rivestimento lipidico.

I risultati sembrano indicare che:

- **CURCUMINA:** molecola polifenolica, rigida, planare, favorisce una ricristallizzazione rapida ed ordinata della miscela eutettica mantenendo stabile il comportamento termico del PCM; la fusione rimane intorno a 37-38°C
- **KETOPROFENE:** induce una riorganizzazione della miscela eutettica durante il primo ciclo di riscaldamento con conseguente abbassamento della temperatura di fusione a circa 25°C.

Questa differenza è in linea con le diverse proprietà chimico-fisiche delle due molecole e ciò suggerisce che il tipo di principio attivo incapsulato influenza la struttura del rivestimento eutettico e che quindi durante la formulazione è importante considerare anche le interazioni farmaco-matrice al fine di ottenere veicoli farmaceutici che soddisfino tutti i requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia.

5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati preparati e caratterizzati con successo due sistemi innovativi di rilascio controllato basati su strutture metallo-organiche (ZIF-8) caricate rispettivamente con ketoprofene e curcumina tramite sintesi one-pot e successivamente rivestiti con una miscela eutettica di acidi grassi ottenendo così un rilascio a doppio stimolo di pH (degradazione ZIF-8) e temperatura (miscela eutettica termoresponsiva).

Le analisi XRPD e FT-IR hanno confermato la stabilità strutturale del framework dopo il caricamento dei principi attivi.

Dalle analisi DSC si può concludere che il sistema rivestito contenente ketoprofene ha mostrato un picco di fusione dell'eutettico a 25.50°C che risultando troppo prossimo alla temperatura ambiente, rende il sistema suscettibile a fasi di stoccaggio o manipolazione.

Al contrario, il sistema finale ZIF-8@Curcumina@PCM ha mostrato un profilo termico promettente, con un picco di fusione a 37.00°C, per applicazioni farmaceutiche.

6. PROSPETTIVE FUTURE

Le prospettive future sono indirizzate sia all'ottimizzazione dei formulati esistenti sia alla validazione funzionale dei sistemi preparati, in particolare riguardo a:

- Rimodulazione della miscela eutettica per il ketoprofene: per superare il limite della fusione prematura è necessaria una variazione nei rapporti stechiometrici degli acidi grassi per innalzare la temperatura di onset.
- Studi di rilascio in vitro a diverse temperature per verificare l'effettivo potere del rivestimento lipidico e quantificare il rilascio in particolare per il sistema con curcumina
- Saggi di biocompatibilità per valutare la citotossicità e la tollerabilità di ZIF-8

BIBLIOGRAFIA

1. Al Sharabati M, Sabouni R, Husseini GA. Biomedical Applications of Metal–Organic Frameworks for Disease Diagnosis and Drug Delivery: A Review. *Nanomaterials*. 16 gennaio 2022;12(2):277. doi:10.3390/nano12020277
2. Wei W, Lu P. Engineering pH and Temperature-Triggered Drug Release with Metal-Organic Frameworks and Fatty Acids. *Molecules*. 8 novembre 2024;29(22):5291. doi:10.3390/molecules29225291
3. Bunzen H. Chemical Stability of Metal-organic Frameworks for Applications in Drug Delivery. *ChemNanoMat*. settembre 2021;7(9):998–1007. doi:10.1002/cnma.202100226
4. Wei W, Lu P. Designing Dual-Responsive Drug Delivery Systems: The Role of Phase Change Materials and Metal–Organic Frameworks. *Materials*. 22 giugno 2024;17(13):3070. doi:10.3390/ma17133070
5. Fatima SF, Sabouni R, Garg R, Gomaa H. Recent advances in Metal-Organic Frameworks as nanocarriers for triggered release of anticancer drugs: Brief history, biomedical applications, challenges and future perspective. *Colloids Surf B Biointerfaces*. maggio 2023;225:113266. doi:10.1016/j.colsurfb.2023.113266
6. Kumar B, Sahani V, Patil S. Review on Ketoprofen (Anti-Inflammatory Drug). *J Res Appl Sci Biotechnol*. 21 dicembre 2024;3(6):41–50. doi:10.55544/jrasb.3.6.6
7. Paolino D, Pignatello R. Improvement of Oral Bioavailability of Curcumin Upon Microencapsulation With Methacrylic Copolymers.
8. Sokołowska P, Bleibel L, Owczarek J, Wiktorowska-Owczarek A. PPAR γ , NF- κ B and the UPR pathway as new molecular targets in the anti-inflammatory actions of NSAIDs: Novel applications in cancers and central nervous system diseases? *Adv Clin Exp Med*. 5 gennaio 2024;33(9):1007–22. doi:10.17219/acem/174243
9. Sharifi-Rad J, Rayess YE, Rizk AA, Sadaka C, Zgheib R, Zam W, et al. Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. *Front Pharmacol*. 15 settembre 2020;11:01021. doi:10.3389/fphar.2020.01021
10. Wildy M, Wei W, Xu K, Schossig J, Hu X, La Cruz DS de, et al. Exploring temperature-responsive drug delivery with biocompatible fatty acids as phase change materials in ethyl cellulose nanofibers. *Int J Biol Macromol*. maggio 2024;266:131187. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.131187
11. Ghaffari F, Shekaari H. Application of fatty acid-based eutectic mixture as a phase change material in microencapsulation of drugs: preparation, characterization and release behavior. *BMC Chem*. 17 febbraio 2025;19(1):42. doi:10.1186/s13065-025-01406-4
12. Pan P, Ding S, Yang W, Wang Y, Qian H, Zhao A, et al. Flurbiprofen@ZIF-8 nanoformulation with potential for analgesia. *BMC Anesthesiol*. 2 dicembre 2025;26(1):19. doi:10.1186/s12871-025-03467-3

13. Ohshima K, Hirohata M, Ohsaki S, Nakamura H, Nomura T, Watano S. Curcumin-loaded ZIF-8 nanoparticles for pulmonary administration: Investigating one-pot synthesis mechanism in water-ethanol system and intracellular uptake amount. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* marzo 2026;733:139222. doi:10.1016/j.colsurfa.2025.139222
14. Bazzo GC. Eutectic mixtures as an approach to enhance solubility, dissolution rate and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. 2020.
15. Park KS, Ni Z, Côté AP, Choi JY, Huang R, Uribe-Romo FJ, et al. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Proc Natl Acad Sci.* 5 luglio 2006;103(27):10186–91. doi:10.1073/pnas.0602439103
16. Wu W, Su J, Jia M, Li Z, Liu G, Li W. Vapor-phase linker exchange of metal-organic frameworks. *Sci Adv.* 2020.
17. Bertoni S. Investigating the physicochemical properties of solid dispersions based on semicrystalline carriers: A case study with ketoprofen. *Int J Pharm.* 2023.
18. Lu C, Weng M, Lu J, Kong S, Shen J. A dual drug delivery system based on pH-sensitive metal-organic frameworks: Synthesis, characterization, in vitro release and anticancer effect. *Results Chem.* novembre 2025;18:102793. doi:10.1016/j.rechem.2025.102793
19. Vardhini NM, Punia J, Jat S, Pawar SD, Devi N, Radhakrishnanand P, et al. Purification and characterization of pure curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from North-East India Lakadong turmeric (*Curcuma longa*). *J Chromatogr A.* ottobre 2023;1708:464358. doi:10.1016/j.chroma.2023.464358

Elenco delle figure

Figura 1.1 Esempi di tipici metal-organic frameworks (1).....	3
Figura 1.2 Rappresentazione schematica del processo di sintesi di ZIF-8 (2)	5
Figura 1.3 Schema di sintesi one-pot (Immagine creata con Gemini-AI).....	5
Figura 1.4 Formula di struttura di ketoprofene	6
Figura 1.5 Meccanismo d'azione dei FANS (da [8] modificata con AI).....	8
Figura 1.6 Formula di struttura di curcumina [9]	9
Figura 1.7 Schema illustrativo delle attività biologiche di Curcumina [9].....	10
Figura 1.8 Meccanismo antinfiammatorio di curcumina [9]	11
Figura 1.9 Target molecolari di curcumina nelle cellule tumorali [9]	11
Figura 1.10 Formula di struttura di Acido Laurico	13
Figura 1.11 Formula di struttura di Acido Miristico	13
Figura 1.12 Formula di struttura di Acido Palmitico	14
Figura 2.1 Schema cella di misura DSC.....	15
Figura 2.2 Strumento utilizzato per analisi DSC	16
Figura 2.3 Dettaglio interno alloggiamenti crogioli.....	16
Figura 2.5 Dettaglio interno dello strumento.....	18
Figura 2.4 Strumento utilizzato per analisi XRPD	18
Figura 2.6 Strumento utilizzato per analisi FT-IR.....	20
Figura 2.7 Dettaglio cristallo ATR	20

Figura 2.8 Strumento utilizzato per analisi SEM.....	21
Figura 2.9 Dettaglio interno dello strumento visibile da computer.....	22
Figura 3.1 Cristalli di ZIF-8 in formazione	25
Figura 3.2 Prodotto ottenuto (ZIF-8)	26
Figura 3.3 Prodotto della seconda sintesi dopo essiccamento (ZIF-8@Ketoprofene2).....	27
Figura 3.4 Soluzione di 2-mim+curcumina in EtOH	28
Figura 3.5 Sospensione finale di ZIF-8@Curcumina prima della centrifugazione.....	28
Figura 3.6 Prodotto della sintesi dopo essiccamento (ZIF-8@curcumina)	29
Figura 3.8 Miscela binaria LAMA dopo cristallizzazione	30
Figura 3.7 Miscela binaria LAMA dopo fusione	30
Figura 3.9 Miscela binaria MAPA dopo cristallizzazione	31
Figura 3.10 Miscela ternaria MAPALA durante la fusione	33
Figura 3.11 Prodotto finale dopo rivestimento lipidico (ZIF-8@Curcumina@MAPALA)	34
Figura 4.1 Termogramma DSC di ZIF-8	35
Figura 4.2 Diffrattogramma di ZIF-8	36
Figura 4.3 Spettro FT-IR di ZIF-8	37
Figura 4.4 Termogramma DSC di Ketoprofene puro	39
Figura 4.5 Diffrattogramma di Ketoprofene puro	40
Figura 4.6 Spettro FT-IR di Ketoprofene puro	41
Figura 4.7 Termogramma DSC di ZIF-8@Ketoprofene	42
Figura 4.8 Diffrattogramma di ZIF-8@Ketoprofene	43
Figura 4.9 Diffrattogrammi sovrapposti di ZIF-8, ZIF-8@Ketoprofene e Ketoprofene puro ...	44
Figura 4.10 Spettro FT-IR di ZIF-8@Ketoprofene	45
Figura 4.11 Spettri FT-IR sovrapposti di ZIF-8 e ZIF-8@Ketoprofene.....	45
Figura 4.12 Immagini SEM di ZIF-8@Ketoprofene a diversi ingrandimenti.....	47
Figura 4.13 Termogramma DSC di Curcumina pura	49
Figura 4.14 Diffrattogramma di Curcumina pura	50
Figura 4.15 Spettro FT-IR di Curcumina pura	50
Figura 4.16 Termogramma DSC di ZIF-8@Curcumina.....	52
Figura 4.17 Diffrattogramma di ZIF-8@Curcumina.....	53
Figura 4.18 Diffrattogrammi sovrapposti di ZIF-8, ZIF-8@Curcumina e Curcumina pura	53
Figura 4.19 Spettro FT-IR di ZIF-8@Curcumina	54
Figura 4.20 Spettri FT-IR sovrapposti di ZIF-8 e ZIF-8@Curcumina.....	55
Figura 4.21 Immagini SEM di ZIF-8@Curcumina a diversi ingrandimenti.....	57
Figura 4.22 Termogramma DSC di Acido Laurico puro	59
Figura 4.23 Termogramma DSC di Acido Miristico puro	60
Figura 4.24 Termogramma DSC di Acido Palmitico puro	61
Figura 4.25 (a) Termogramma miscela LA/PA 60/40 PROVA1	62
Figura 4.25 (b) Termogramma miscela LA/PA 55/45 PROVA2.....	62
Figura 4.25 (c) Termogramma miscela LA/MA 66/34 PROVA3	62
Figura 4.26 Termogramma miscela MA/PA 63/37 PROVA4	63
Figura 4.27 Termogramma miscela MA/PA/LA 60/35/5 Ciclo 1	64
Figura 4.28 (a) Termogramma miscela MA/PA/LA 58/34/8 Ciclo 1	65
Figura 4.28 (b) Termogramma miscela MA/PA/LA 58/34/8 Ciclo 2.....	65
Figura 4.29 (a) Termogramma miscela MA/PA/LA 57/33/10 Ciclo 1.....	66
Figura 4.29 (b) Termogramma miscela MA/PA/LA 57/33/10 Ciclo 2.....	66
Figura 4.30 (a) Termogramma miscela MA/PA/LA 56/33/11 Ciclo 1.....	67
Figura 4.30 (b) Termogramma miscela MA/PA/LA 56/33/11 Ciclo 2.....	67
Figura 4.31 Termogramma miscela MA/PA/LA 44/26/30 Ciclo 2	68

Figura 4.32 Termogramma miscela MA/PA/LA 32/18/50 Ciclo 2	69
Figura 4.33 Termogramma Miscela eutettica ternaria MA/PA/LA 56,57/33,02/10,41 utilizzata come rivestimento lipidico dei sistemi farmaceutici (Ciclo 2)	70
Figura 4.34 (a) Termogramma sistema ZIF-8@Ketoprofene@MAPALA Ciclo 1	71
Figura 4.34 (b) Termogramma sistema ZIF-8@Ketoprofene@MAPALA Ciclo 2.....	72
Figura 4.35 (a) Termogramma sistema ZIF-8@Curcumina@MAPALA Ciclo 1	73
Figura 4.35 (b) Termogramma sistema ZIF-8@Curcumina@MAPALA Ciclo 2.....	74
Figura 4.36 Confronto profilo DSC dei due sistemi farmaceutici ottenuti.....	75

Elenco delle tabelle

Tabella 3.1 Rapporti usati per la miscela binaria LAPA (Laurico + Palmitico)	30
Tabella 3.2 Rapporti usati per la miscela binaria LAMA (Laurico + Miristico).....	30
Tabella 3.3 Rapporti usati per la miscela binaria MAPA (Miristico + Palmitico)	31
Tabella 3.4 Aggiunte progressive di Acido Laurico alla miscela binaria MAPA.....	32
Tabella 3.5 Quantità utilizzate nella preparazione della miscela ternaria MAPALA (Miristico + Palmitico + Laurico)	32
Tabella 4.1 Programma termico DSC per analisi ZIF-8	35
Tabella 4.2 Programma termico DSC per analisi ZIF-8@Ketoprofene	42
Tabella 4.3 Programma termico DSC per analisi Curcumina pura	48
Tabella 4.4 Programma termico DSC per analisi ZIF-8@Curcumina	51
Tabella 4.5 Programma termico DSC per analisi acidi grassi puri	58
Tabella 4.6 Programma termico utilizzato per analisi DSC di miscele binarie	61
Tabella 4.7 Programma termico utilizzato per analisi DSC di miscele ternarie	63
Tabella 4.8 Programma termico utilizzato per analisi DSC dei sistemi farmaceutici finali ottenuti dopo rivestimento con miscela eutettica.....	71

RINGRAZIAMENTI

Alla mia relatrice, Prof.ssa Chiara Milanese, che mi ha accolta nel suo laboratorio e mi ha permesso di sperimentare essendomi di supporto in ogni momento io ne avessi bisogno.

A Mamma e Papà, la mia forza persistente in questi anni impegnativi, sapere di tornare a casa e trovare voi era avere la certezza di essere nel mio posto sicuro. Siete il mio posto sicuro nel mondo.

A Chiara e Stefania, le mie costanti da sempre e per sempre, la vita ci ha portato a vivere lontane ma questo ha rafforzato ulteriormente il nostro legame perché non è necessario sentirsi tutti i giorni, l'importante è sapere di esserci sempre l'una per l'altra ed io ho la certezza che voi ci sarete sempre per me.

A Enea e Agnese, siete arrivati durante questo mio percorso, mi avete reso zia e avete portato luce, allegria e gioia nella mia vita; corrervi dietro è sicuramente impegnativo ma è anche impagabile ed esservi zia credo mi abbia migliorato come persona.

A Peppe e Save, le mie sorelle non potevano trovare compagni migliori ed io cognati più speciali di voi.

Ai miei zii e cugini tutti che con una parola, un gesto, un abbraccio mi hanno fatto sempre sentire la loro vicinanza e il loro supporto.

A Chiara e Sara che ci sono state, ci sono e spero sempre ci saranno.

A tutte le mie compagne del gruppo "Grandi" di Spazio...Danza in particolare a Chiara, Vale, Gaia e Giada ed ai miei maestri molto più che maestri Sara e Mirko, la mia seconda famiglia in questi anni, siete stati per me ventata d'aria fresca e sorrisi (e anche qualche arrabbiatura) alla fine di ogni giornata impegnativa passata sui libri o in università; avete rappresentato molto più di quello che pensate e non potevo trovare compagnia migliore per fuggire dalla mia quotidianità.

A tutti coloro che ho incontrato nel mio percorso universitario e che mi hanno lasciato qualcosa indistintamente, in particolar modo ad Alessia G., ci siamo supportate e sopportate a vicenda e questo mio traguardo è sicuramente anche un po' tuo.

A tutte le mie Stelle che non possono essere fisicamente qui, ma sono nel mio cuore a vivere ogni momento speciale con me.

Infine, un ringraziamento a me stessa lo devo perché quando era più facile mollare ho scelto di non arrendermi e continuare ad inseguire il mio sogno.

Non sono brava ad esprimere le mie emozioni ma se oggi sono qui a vivere uno dei giorni più belli della mia vita è perché ho avuto a fianco persone speciali come tutti voi, siete stati fondamentali per me. *GRAZIE*

Sabri