

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

## **Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale



## **Particelle sferiche di silice mesoporosa come carrier di arginina**

### **Relatori**

Prof.ssa Barbara Onida

Prof. Mauro Banchero

Sara Saber Younes Mohamed

**Candidato**

Sonia Martinez

Marzo 2020



# INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ACRONIMI .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUZIONE .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1 Wound healing .....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1 Arginina .....  | 10        |
| 1.1.1 Principali caratteristiche dell'arginina .....                        | 11        |
| <b>2 Drug Delivery System (DDS) .....</b>                                   | <b>13</b> |
| 2.1 Particelle come Drug Delivery System .....                              | 13        |
| 2.2 Silici Mesoporose .....   | 18        |
| 2.2.1 Tipologie e sintesi di silice a mesoporosità ordinata.....            | 18        |
| 2.2.2 Silici mesoporose in campo biomedicale .....                          | 21        |
| <b>3 Materiali e Metodi.....</b>  | <b>23</b> |
| 3.1 Materiali utilizzati.....   | 23        |
| 3.2 Impregnazione con arginina .....  | 23        |
| 3.3 Caratterizzazione dei materiali .....                                   | 24        |
| 3.3.1 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)..... | 24        |
| 3.3.2 Analisi di fisisorbimento di azoto .....                              | 24        |
| 3.3.3 Diffratometria a Raggi X (XRD) .....                                  | 25        |
| 3.3.4 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR) .....       | 25        |
| 3.4 Analisi dell'arginina .....   | 26        |
| 3.4.1 Spettroscopia Ultravioletta-Visibile.....                             | 27        |
| 3.5 Rette di taratura e rilasci .....                                       | 28        |
| <b>4 Sintesi e Caratterizzazione del Carrier .....</b>                      | <b>31</b> |
| 4.1 Sintesi della silice mesoporosa .....                                   | 31        |
| 4.2 Caratterizzazione della Silice .....                                    | 32        |
| <b>5 Silice mesoporosa contenente arginina .....</b>                        | <b>37</b> |
| 5.1 Impregnazione della Silice .....  | 37        |
| 5.2 Caratterizzazioni della silice contenente arginina .....                | 38        |
| 5.2.1 Campioni impregnati in ambiente acido .....                           | 38        |
| 5.2.2 Campioni impregnati in ambiente basico .....                          | 43        |
| 5.2.3 Confronto tra campioni impregnati con acqua.....                      | 47        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 5.2.4    | Campione impregnato con soluzione di etanolo ..... | 52        |
| <b>6</b> | <b>Rilascio .....</b>                              | <b>57</b> |
| <b>7</b> | <b>Conclusione e sviluppi futuri .....</b>         | <b>61</b> |
|          | <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                           | <b>65</b> |

## ACRONIMI

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Drug Delivery System   | DDS                       |
| Bromuro di cetil trimetilammonio                             | CTAB                      |
| Ortosilicato tetraetile                                      | TEOS                      |
| Tampone fosfato salino                                       | PBS                       |
| Incipient wetness impregnation                               | IWI                       |
| Modello di Brauner-Emmet-Teller                              | BET                       |
| Area superficiale specifica                                  | SSA <sub>BET</sub>        |
| Modello di Barret-Joyner-Helenda                             | BJH                       |
| Diffrazione a raggi X  | XRD                       |
| Analisi termogravimetrica                                    | TGA                       |
| Bromuro di potassio  | KBr                       |
| Microscopia a scansione elettronica ed emissione di campo    | FESEM                     |
| ARG  | Arginina                  |
| Campione impregnato a pH 1 con acido cloridrico (1%)         | Arg@Silice/1              |
| Campione impregnato a pH 5 con acido cloridrico (1%)         | Arg@Silice/5              |
| Campione impregnato a pH 9 con acido cloridrico (1%)         | Arg@Silice/9              |
| Campione impregnato a pH 10 con acido cloridrico (1%)        | Arg@Silice/10             |
| Campione impregnato a pH 11 con acqua deionizzata            | Arg@Silice /11            |
| Campione impregnato a pH 7 con multistep e acqua deionizzata | Arg@Silice/7              |
| Campione impregnato con multistep ed etanolo                 | Arg@Silice/EtOH           |
| Campione Arg@Silice/1 dopo il rilascio                       | Arg@Silice/1/PostRilascio |



# INTRODUZIONE

I sistemi per il rilascio di farmaci, meglio noti sotto l'acronimo DDS (Drug Delivery System), sono sistemi contenenti sostanze terapeutiche, che permettono di controllarne o migliorarne il rilascio nel corpo [1]. Di questi sistemi fanno parte le nanoparticelle e le microparticelle, “*generalmente considerate come sicure*” (GRAS) dalla *Food and Drug Administration*. Tutti i DDS sono biocompatibili, sicuri in quanto non tossici e biodegradabili [2].

Tra i materiali utilizzabili nell'ingegnerizzazione di DDS si annovera la silice mesoporosa, un materiale inorganico avente una elevata area superficiale specifica ed un elevato volume dei pori, generalmente di dimensione tra i 2 e i 20 nm, chiamati per questa ragione mesopori [3],[4]. Lo studio della silice amorfa nel campo della medicina si è espanso in molte direzioni, per attività antinfiammatorie, per imaging biomedico e come carrier di molecole sonda per il rilevamento di tumori [2],[5].

La silice amorfa può coprire un ruolo anche nel processo di guarigione della ferita sia come principio attivo, rilasciando acido ortosilicico che favorisce la cicatrizzazione, sia come carrier per altre molecole benefiche per la guarigione [6],[7].

La guarigione della ferita è un processo dinamico, interattivo e complesso che si svolge in quattro fasi: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento [8].

L'arginina, il principio attivo utilizzato nel lavoro di tesi, è un aminoacido semi-essenziale per l'uomo presente in molti cibi comuni come l'anguria, le nocciole, il riso e la carne. Essa ha diverse proprietà benefiche per il sistema immunitario, riducendo il tasso di infezioni, ha buone proprietà antinfiammatorie ed è coinvolta in processi nutrizionali e fisiologici come la sintesi di molte proteine [9]. Questo aminoacido, inoltre, è l'unico substrato per la sintesi del monossido di azoto (NO), responsabile del rilassamento dei muscoli e della riduzione della pressione sanguigna [9]. Il monossido di azoto agisce sulle cellule tumorali inibendone la crescita [10]. Tra i diversi benefici dell'arginina, è di nostro interesse il suo effetto nella guarigione della ferita legato anch'esso al monossido di azoto, in quanto questo composto favorisce sia la sintesi del collagene che l'angiogenesi e la proliferazione delle cellule attraverso una migliore riepitelizzazione [10],[11].

Lo scopo di questo lavoro è quello di utilizzare una silice mesoporosa di sintesi come supporto per l'arginina al fine di accelerare il processo di guarigione della ferita, tenendo ben presenti tutti gli aspetti positivi e benefici per il suddetto processo che la silice e l'arginina presentano.

L'elaborato è articolato in sette capitoli:

- Il primo capitolo tratta in generale del processo di guarigione della ferita spiegando più in dettaglio le quattro fasi di quest'ultimo. Vengono inoltre trattate le medicazioni utilizzate, sia quelle tradizionali che quelle più avanzate, di cui sono riportati diversi esempi. Infine, viene introdotta l'arginina come principio attivo utilizzato in questo lavoro, con tutte le sue proprietà e caratteristiche strutturali.
- Nel secondo capitolo vengono trattati in generale i DDS riportando qualche esempio e focalizzando l'attenzione sulle loro applicazioni nel wound healing. Viene prestata particolare attenzione alla silice mesoporosa, descrivendone le principali proprietà e tipologie, le tecniche di sintesi e le sue applicazioni nel campo biomedicale.
- Nel terzo capitolo vengono elencati i materiali utilizzati. Viene descritta la tecnica utilizzata per l'impregnazione del carrier, l'*Incipient Wetness Impregnation* (IWI), e successivamente tutte le tecniche di analisi: la microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM), l'analisi di fisisorbimento di azoto, la diffrattometria a

raggi X (XRD), la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e la spettroscopia ultravioletta-visibile. È stato anche descritto il metodo di analisi dell'arginina tramite derivatizzazione con una soluzione di ninidrina ed infine vengono riportati il metodo di rilascio utilizzato e la costruzione della retta di taratura.

- Nel quarto capitolo viene descritta dettagliatamente la sintesi della silice e vengono mostrati i risultati della sua caratterizzazione attraverso il FESEM, l'analisi di fisisorbimento di azoto, l'XRD e lo FT-IR.
- Nel capitolo cinque vengono invece descritte le impregnazioni fatte a diversi pH e quindi mostrati i risultati dei campioni contenenti arginina con le tecniche di analisi utilizzate nel capitolo precedente, mettendo in luce le differenze tra i vari campioni.
- Il sesto capitolo riporta i risultati relativi alla prova di rilascio di arginina, ottenuta utilizzando la cella di Franz.
- Nel settimo ed ultimo capito vengono riportati le conclusioni e discussi i possibili sviluppi futuri.

# 1 Wound healing

La pelle è l'organo più esteso del corpo umano e protegge quelli interni dai rischi ambientali quali agenti patogeni, radiazioni, cambiamenti di temperatura o perdite d'acqua, fungendo da barriera fisica tra ambiente esterno ed interno. Quando questa viene danneggiata, per esempio a causa di interventi chirurgici, traumi, ustioni o lacerazioni, si compromette la sua efficacia nella protezione dell'ambiente interno; la pelle, però, possiede delle proprietà rigenerative eccellenti, infatti grazie ad una serie di eventi fisiologici riesce a guarire con facilità tagli o lesioni [12],[13].

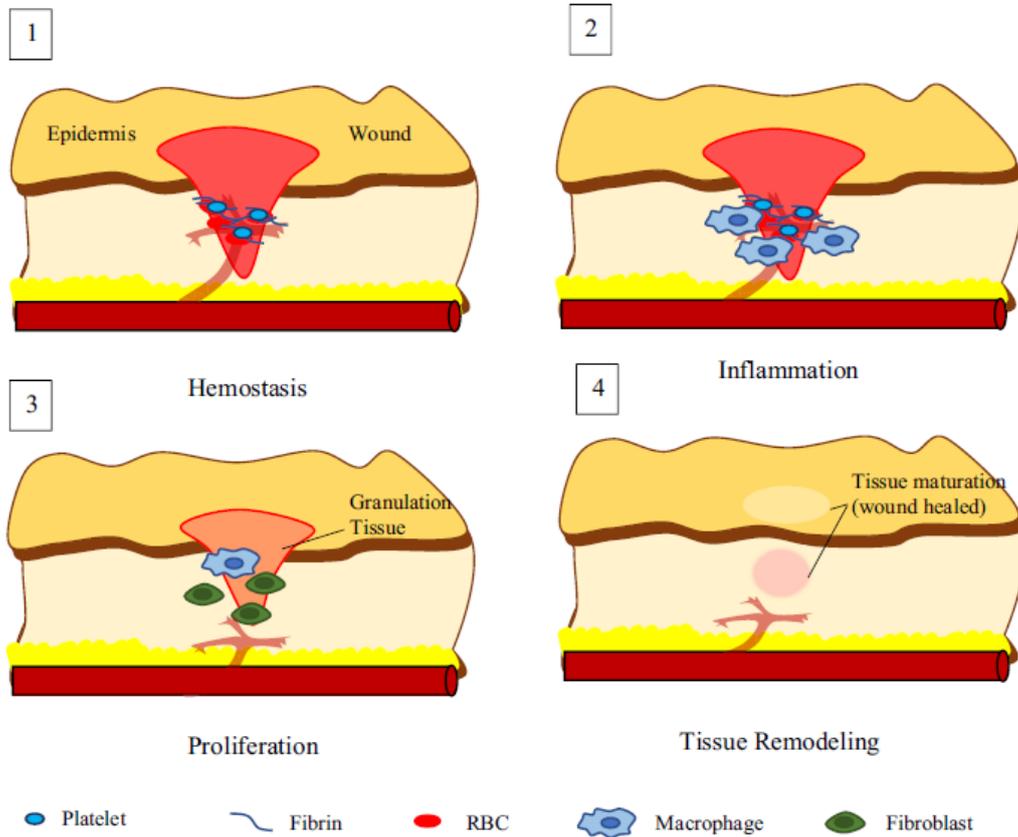
La ferita può essere definita come una discontinuità del tessuto dovuta ad un danno fisico, termico, meccanico o elettrico [14]; questa può essere poi complicata da ulteriori danni al tessuto sottostante e da una scarsa ossigenazione della ferita stessa [15]. In base al livello di contaminazione e tempo di guarigione la ferita può essere classificata acuta o cronica. Quella acuta può essere provocata da ustioni, incidenti o lesioni chirurgiche e normalmente guarisce, con la riparazione e rigenerazione dei tessuti, in un arco di otto o dodici settimane in base alla dimensione e profondità del danno della pelle. Quella cronica invece non guarisce in modo tempestivo perché non riesce a progredire in tutti gli stadi della guarigione della ferita, in quanto possono persistere alcune patologie come per esempio l'infezione. Questa tipologia di ferita è generalmente il risultato di ulcere o ustioni [14],[15].

La guarigione della ferita è un processo fisiologico naturale che comporta interazioni tra diversi tipi di cellule, fattori di coagulazione e crescita, tessuto connettivo, citochine e sistema vascolare ed è fondamentale per mantenere la funzione barriera della pelle [16]. Questo processo si svolge in quattro fasi, rappresentate schematicamente in Figura 1.1:

1. l'*emostasi* si ha immediatamente dopo la lesione. Durante questa fase le piastrine si aggregano formando un coagulo che crea una costrizione dei vasi sanguigni, in modo da ridurre al minimo la perdita di sangue. Questo coagulo permette la migrazione di leucociti e linfociti verso la ferita per promuovere l'inizio della fase successiva. La ferita viene inizialmente chiusa con una rete di fibrina che successivamente si indurisce fino a formare una crosta [12],[14],[16];
2. la *fase infiammatoria* si ha poco dopo la lesione dei tessuti e dura circa tre giorni, durante la quale si verifica il gonfiore, causato da un accumulo di liquidi nella ferita, sintomo dell'infiammazione [13],[14]. In questa fase i macrofagi "mangiano" i detriti pulendo la zona della ferita e riabilitando il tessuto danneggiato, inoltre secernono fattori di crescita e citochine che vengono inviati alla ferita attraverso chemiotassi e che promuovono la proliferazione dei tessuti e la migrazione cellulare [12],[16],[17];
3. la *proliferazione* inizia circa tre giorni dopo la lesione iniziale e continua fino alla chiusura della ferita. Questa fase è caratterizzata dalla produzione di collagene che insieme ai fibroblasti va a sostituire la rete provvisoria di fibrina [14],[17],[18] con la formazione di nuovi tessuti e vasi sanguigni [13]. I miofibroblasti si dispongono attorno alla ferita andando a tirarne i bordi per contrazione in modo da favorire la guarigione della stessa, accelerata anche dalla presenza di umidità intorno alla ferita. La guarigione procede in maniera corretta se il nuovo tessuto è di colore rosso rosato mentre un colore più scuro indica una ferita infetta o ischemica [16].
4. la *fase di maturazione* inizia circa due o tre settimane dopo la lesione e in base alla complessità della ferita può durare da qualche mese a più di un anno, questa ha lo scopo di recuperare la normale organizzazione strutturale e aumentare la resistenza a trazione della pelle. Durante questa fase tutti i processi attivati precedentemente terminano, i piccoli capillari sanguigni e le cellule come macrofagi e miofibroblasti spariscono o subiscono apoptosi non essendo più necessari [13],[16]. La forza della pelle dopo la

guarigione della ferita non sarà mai uguale a quella che essa aveva prima dell'infortunio [17].

In generale tutte queste fasi sono complesse e il mancato avanzamento della guarigione della ferita in una o più fasi può portare a ferite croniche [16].



**Figura 1.1:** Fasi della guarigione della ferita nel tempo [12]

Durante le quattro fasi di guarigione sono essenziali alcuni nutrienti che hanno diversi effetti benefici, alcuni esempi sono riportati nella Tabella 1.1.

**Tabella 1.1:** Nutrienti essenziali nelle diverse fasi della guarigione della ferita [19]

| Wound healing phase | Essential nutrients                           | Effect  |
|---------------------|---|---|
| Haemostasis         | Drugs, herbs, vitamins, amino acids, minerals | Blood clotting  |
| Inflammatory phase  | Vitamin A                                     | Enhances early inflammatory phase                           |
|                     | Bromelain and adequate protein intake         | Prevents prolonging inflammatory phase                      |
|                     | Vitamin C                                     | Enhances neutrophil migration and lymphocyte transformation |

|                     |                                     |  |
|---------------------|-------------------------------------|--|
| Proliferative Phase | Vitamin C, <i>Centella asiatica</i> | Necessary for collagen synthesis                                 |
|                     | Glucosamine                         | Enhances hyaluronic acid production                              |
|                     | Vitamin A                           | Promotes epithelial cell differentiation                         |
|                     | Zinc                                | Required for DNA synthesis, cell division, and protein synthesis |
|                     | Aloe vera                           | Support formation of granulation tissue                          |
| Remodelling phase   | Amino acids and proteins            | Wound remodelling  |

Le medicazioni per le ferite devono essere non aderenti, antibatteriche, sterili e convenienti [12] e vengono usate per molti scopi [13],[14] tra cui:

- mantenere un ambiente umido in modo da accelerare la guarigione della ferita;
- proteggere la ferita da agenti esterni come infezioni batteriche o stress meccanici;
- minimizzare o evitare la formazione di cicatrici;
- consentire l'ossigenazione della ferita e quindi lo scambio di gas tra tessuti feriti e ambiente esterno;
- mantenere un'adeguata temperatura tissutale per migliorare il flusso sanguigno alla ferita e per migliorare la migrazione epidermica;
- avere un'azione di sbrigliamento cioè rimuovere il tessuto lacerato o necrotico;
- velocizzare la fase di proliferazione promuovendo sia l'angiogenesi che la sintesi del tessuto connettivo.

Esistono medicazioni tradizionali e avanzate, diversamente utilizzate nel wound healing in base al tipo di ferita.

Quelle tradizionali sono indicate per ferite pulite e secche e con bassi livelli di essudato, possono essere utilizzate come medicazioni primarie oppure come medicazioni secondarie principalmente per evitare che la ferita venga contaminata. I prodotti utilizzati per questo tipo di medicazioni sono per esempio garze, bende, cerotti, cotone, etc. Per esempio, garze composte da tessuto e fibre non tessute di cotone, da rayon o da poliesteri servono come protezione contro infezioni batteriche; altre garze sterili vengono, invece, utilizzate per assorbire essudati ed altri fluidi in una ferita aperta. Questi tipi di medicazioni oltre ad essere più costosi di altri richiedono frequenti cambiamenti per prevenire la macerazione dei tessuti sani e se posti su ferite che presentano un drenaggio eccessivo potrebbero inumidirsi e diventare aderenti rendendo poi dolorosa la rimozione della garza. Invece, bendaggi in cotone e cellulosa vengono per esempio utilizzati per la ritenzione di ferite non troppo gravi, mentre bende a compressione per ulcere venose [14]. Altri prodotti utilizzati per queste terapie sono estratti vegetali, come aloe vera e pervinca del Madagascar (vinca rosea) o miele: l'aloè vera o la pervinca, se applicati alla zona ferita, accelerano il processo di rigenerazione cutanea; il miele invece essendo uno zucchero naturale svolge un ruolo molto importante nella riepitelizzazione [16].

Le medicazioni avanzate, piuttosto che operare come semplice copertura della ferita, mirano a prevenire o contenere la proliferazione batterica andando a diminuire la morbilità dell'infezione (frequenza con cui l'infezione si manifesta nella popolazione) [13], ma anche a

mantenere una certa umidità nell'ambiente della ferita in quanto questo è un aspetto fondamentale per la guarigione della stessa [12]. Per questi trattamenti vengono utilizzati diversi prodotti [12],[14]:

- Gli *idrogel*, composti da polimeri reticolati con un elevato contenuto di acqua (circa il 70-90%), il quale consente loro di mantenere l'ambiente umido per la ferita; sono inoltre capaci di far permeare l'ossigeno e assorbire l'essudato. Sono utilizzati per ferite croniche asciutte, ferite necrotiche, ulcere e ustioni e sono adatti per tutti gli step della guarigione della ferita. Questa tipologia di medicazione è non reattiva e non irritante nei confronti dei tessuti biologici e permeabile ai metaboliti ma ha anche una resistenza meccanica bassa per cui viene solitamente ibridata con altri polimeri.
- Gli *idrocolloidi* sono dei gel costituiti da gelatina, carbossimetilcellulosa e pectina e sono capaci di mantenere un'adeguata umidità sulla ferita (come gli idrogel), sono inoltre impermeabili ai batteri e all'ossigeno. Quest'ultimo aspetto risulta però essere vantaggioso solo per le prime fasi di guarigione mentre potrebbe andare a compromettere le successive. Essi vengono utilizzati per ustioni minori, piaghe da pressione e ferite gravi ma possono essere utilizzate anche in campo pediatrico in quanto la loro rimozione non provoca dolore; se ne sconsiglia invece l'utilizzo per ulcere neuropatiche e ferite con presenza di elevate quantità di essudato.
- Gli *alginati* sono dei polisaccaridi derivanti dalle alghe marine costituiti da unità di acido D-mannuronico e di acido L-guluronico. Sono altamente biodegradabili e solitamente reticolati da ioni calcio (con legami forti tra le diverse catene polimeriche, a livello di gruppi funzionali reattivi), rendendoli così delle barriere biocompatibili poco costose. Queste medicazioni combinate con ioni calcio sono in grado di assorbire grandi quantità di essudato della ferita, ma possono anche essere incorporate con ioni argento e zinco per aumentare il rilascio di fattori di crescita e migliorare le proprie proprietà antiossidanti e antibatteriche. Sono adatti per ferite con diversi livelli di drenaggio ma non per ferite asciutte o molto gravi con esposizione ossea e per ustioni di terzo grado.
- Il *collagene* e il *chitosano* fanno parte delle medicazioni bioattive, presentano un'elevata biocompatibilità e biodegradabilità e non sono tossici. Il chitosano forma uno strato superficiale per proteggere la ferita aumentando anche l'assorbimento di acqua, in questo modo si favorisce l'angiogenesi durante la fase di proliferazione. Il collagene avvia la formazione dei fibroblasti e accelera la migrazione endoteliale. Questi materiali a base di collagene sono però permeabili ai batteri e ad agenti patogeni.
- La *cellulosa* è un materiale facilmente reperibile dalle piante ed è composta da microfibrille, essa stimola vari fattori di crescita che aumentano la formazione di nuovo tessuto portando ad una maggiore guarigione della ferita.
- Le *schiume* e i *film* sono sistemi indicati per lesioni epiteliali e ferite superficiali, ma anche per ferite con elevate quantità di essudato in quanto la schiuma ha grandi capacità assorbenti. Non sono invece adatti per ferite e cicatrici secche. Queste medicazioni possono essere modellate in quanto altamente elastiche e flessibili in modo da adattarsi a diverse conformazioni del corpo.

Un'altra strada che può essere seguita è l'utilizzo di nanotecnologie che possono essere usate per trattamenti di diverse patologie come malattie cardiovascolari, cancro e diabete. I nanomateriali, però, sono molto utili anche nella rigenerazione della pelle e ne sono stati studiati diversi tipi per i vari stadi della guarigione. Questi possono essere utilizzati con due approcci, sia come farmaci che agiscono terapeutamente sulla ferita, sia come vettori per agenti medici che agiscono sulla ferita [16]. Se usati come farmaci hanno il vantaggio di essere atossici e compatibili con la pelle favorendo la creazione di un ambiente umido accelerando così il processo di guarigione della ferita. Se invece vengono usati come carrier possono generalmente migliorare la ritenzione di un farmaco e con molecole bioattive possono proteggere il farmaco

dalla degradazione. Il rilascio può essere prolungato quindi lo è anche il mantenimento della concentrazione di farmaco desiderata, oppure sequenziale e selettivo nei confronti di agenti antibatterici, fattori di crescita e altre molecole. Per questi motivi la somministrazione è meno frequente, di conseguenza una diminuzione dei costi e la guarigione della ferita prosegue seguendo il giusto corso [13],[20]. Tra le nanoparticelle alcune sono molto importanti per il wound healing: le particelle a base lipidica tra cui i liposomi, le particelle polimeriche e quelle inorganiche, di cui alcuni esempi sono riportati nella Tabella 1.2. Le particelle come Drug Delivery System, utilizzate sia per la guarigione della ferita che per altri scopi benefici, verranno discusse più approfonditamente nel capitolo 2.

**Tabella 1.2:** Esempi di particelle inorganiche utilizzate nel wound healing [16]

| <b>Types of nanoparticles</b> | <b>Special characteristics</b>  | <b>Applications</b>  |
|-------------------------------|---|--|
| Silver nanoparticles          | Anti-bacterial, anti-inflammatory properties, useful for healed wounds; better clinical efficacy; effective at lower doses. Toxic at certain doses. | Burn wounds; diabetic ulcers; anorectal surgery                              |
| Gold nanoparticles            | Functionalized with antibiotics, peptide, and collagen scaffolds. High tissue adhesive properties; better anti-bacterial activity                   | Diabetic wounds; skin wound on rat model; rodent wound model                 |
| Graphene oxide nanoparticles  | Embedded in scaffolds; anti-bacterial; faster re-epithelialization and shrinkage properties   | As wound dressing in rats and murine model; in tissue engineering a scaffold |
| Terbium nanoparticles         | Helps in migration, proliferation, increases viability, assist in angiogenesis.   | Murine model, Zebrafish model (embryonic primary cells)                      |
| Copper nanoparticles          | Anti-microbial activity, enhanced wound healing by producing different growth factors; fabricated in dressing materials                             | Excision model in rat; murine model; in wound dressing                       |
| Zinc oxide nanoparticles      | Incorporated in hydrogels; anti-inflammatory, anti-oxidant properties; enhances angiogenesis, ROS production  | On guinea pigs; skin wound on rat model; in vitro conditions                 |
| Silica nanoparticles          | Easy fabrication and loading of drugs; helps in migration and proliferation of fibroblast.  | Topical applications; wound dressing in rat model (Wistar rat); murine model |
| Titanium nanoparticles        | Biocompatible, bio-synthesized, inherent bioactivity, enhanced wound healing ability, water retaining efficacy                                      | Burn wound model; rat mode (Wistar rat); albino rats                         |
| Iron oxide nanoparticles      | Easy synthesis, biodegradability, low toxicity, anti-microbial applications   | Incisional wound in Wistar rat; murine model                                 |

Come riportato nella Tabella 1.1 per la guarigione della ferita sono molto utili alcuni nutrienti come per esempio l'arginina, lo zinco e la vitamina C, che combinati insieme portano ad un miglioramento significativo della ferita [21]. L'arginina è importante perché è l'unico precursore del monossido di azoto, molecola segnale coinvolta nei processi di angiogenesi ed riepitelizzazione [22], che influenza le attività dei macrofagi e dei fibroblasti [23]. L'implementazione di arginina e quindi la presenza di NO nell'ambiente della ferita aiuta la transizione dalla fase infiammatoria a quella di proliferazione [19]. Essendo l'arginina il principio attivo usato in questo lavoro ne è stato fatto un approfondimento generale nel paragrafo successivo.

## 1.1 Arginina

L'arginina (acido 2-ammino-5-guanidilpentanoico) è un aminoacido semi-essenziale per l'uomo, particolarmente presente in alcuni cibi come la carne, le nocciole [9], l'anguria, il riso, i semi e le alghe mentre scarseggia nel latte di molti mammiferi come per esempio l'uomo e il maiale [24]. Esso può essere considerato anche condizionatamente essenziale poiché lo è per giovani in crescita e/o durante periodi di malattie e traumi, ma non è essenziale per adulti sani in quanto può essere sintetizzato in quantità sufficienti per soddisfare il fabbisogno fisiologico per via endogena [25],[26].

Questo aminoacido gioca un ruolo essenziale nella guarigione di ferite, come detto precedentemente, ma ha proprietà antinfiammatorie ed è coinvolta in molti processi nutrizionali e fisiologici di grande importanza come la sintesi di proteine, monossido di azoto, creatina, prolina, glutammato, poliammine e agmatina [27],[28]. Aiuta a ridurre il tasso di infezioni soprattutto quando le difese immunitarie sono ridotte [9], controlla inoltre l'integrità della mucosa del tratto gastrointestinale e quindi limita la mobilità batterica nell'intestino [29].

Più insolitamente l'arginina viene utilizzata per migliorare il sapore e l'aspetto della *bologna sausage*, salume diffuso in Canada e negli Stati Uniti. [30].

Oltre agli effetti benefici biologici come il miglioramento del sistema immunitario, l'arginina presenta anche effetti anticatabolici come il miglioramento del bilancio di azoto a seguito di traumi o stress e azioni secretagoghe (che favoriscono, stimolano la secrezione ghiandolare, con meccanismo chimico o nervoso) di diverse ghiandole endocrine [31]. La somministrazione di arginina dà anche grossi benefici a pazienti con malattie renali [30],[32].

Uno degli aspetti più importanti riguardanti l'arginina è che essa è l'unico substrato per la produzione dell'NO che è responsabile del rilassamento dei muscoli e della riduzione della pressione sanguigna [9]; l'aminoacido, infatti, sviluppa i suoi effetti sul sistema cardiovascolare ripristinando il flusso sanguigno quando depresso dopo traumi o shock emorragici in diversi organi quali fegato, milza e intestino, ma anche quello alterato in pelle e muscoli [11],[25],[26]. Il monossido di azoto in più è collegato a molti meccanismi regolatori fisiologici del sistema endocrino e a funzioni infiammatorie ed immunitarie in quanto l'arginina influenza la funzione dei linfociti T, gruppo di leucociti, che giocano un ruolo fondamentale nella immunità cellulo-mediata [10],[11],[33]. Il monossido di azoto è inoltre capace di interferire sulla proliferazione di cellule tumorali agendo sulla modulazione della crescita di quelle cancerose [10],[29]. L'implementazione di arginina potrebbe essere una nuova opportunità per la battaglia contro il cancro [32],[34], in quanto viene già spesso somministrata per garantire una qualità di vita migliore nei pazienti sottoposti a chemioterapia [29].

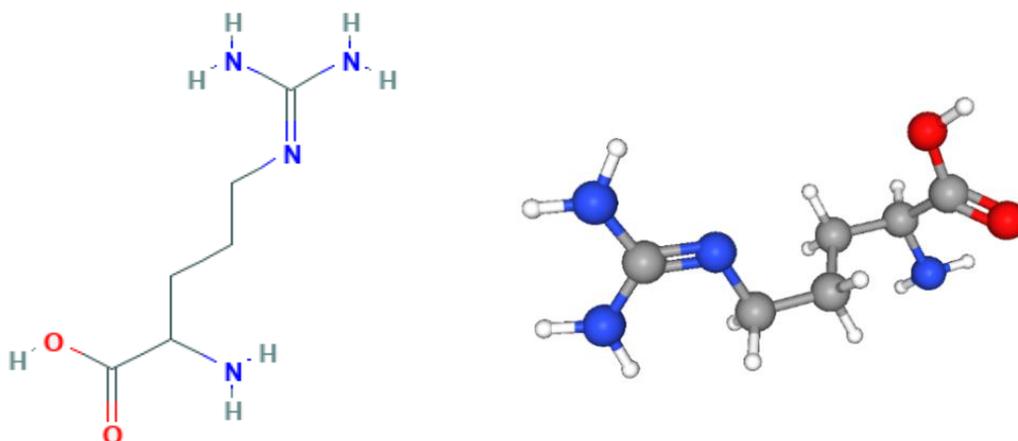
Una delle funzioni principali dell'arginina, il miglioramento della guarigione della ferita, è l'oggetto d'interesse del nostro lavoro e sembra essere anch'essa collegata all'NO, il quale favorisce la sintesi del collagene [10],[11]. Guarigione della ferita, monossido di azoto e arginina sono strettamente collegati poiché la guarigione della stessa è accompagnata da una

riduzione dell'NO che può essere sintetizzato solo grazie all'arginina utilizzata come substrato [31].

L'arginina può essere somministrata per via orale, endovenosa o intra-arteriosa [26] e nonostante i suoi effetti positivi, il dosaggio di arginina per l'uomo non è standardizzato; in letteratura si trovano valori contrastanti: il *Dietary Reference Intake* indica una dose di 4.2 g/d, *Olszewer* di 1.5 g/d mentre *Mahan et al.* di 10 g/d [29]. La somministrazione dell'aminoacido non presenta solo aspetti positivi, infatti, dosi eccessive potrebbero alterare le sue funzioni inibitorie per arteriosclerosi e ipercolesterolemia che verrebbero contrastate dall'eccesso dell'arginina stessa. Inoltre, diversi studi risultano contraddittori in quanto alcuni dimostrano un miglioramento dei sintomi di malattie cardiovascolari, mentre in altri l'apporto di arginina è risultato inutile per malattie come l'arteriopatia periferica o per terapie post-infarto [25].

### 1.1.1 Principali caratteristiche dell'arginina

L'arginina è un aminoacido basico con formula molecolare  $C_6H_{14}N_4O_2$  e peso molecolare di 174,20 g/mol; contiene un gruppo carbossilico (COOH) e tre amminici ( $NH_2$ ), due dei quali sono compresi nel gruppo guanidinico, presente nella catena laterale [25]. La Figura 1.2 rappresenta la formula di struttura 2D e 3D dell'arginina.



**Figura 1.2:** Formula di struttura dell'arginina 2D e 3D [35]

L'arginina si presenta come polvere cristallina bianca ed è irritante per pelle ed occhi. Ha un'elevatissima solubilità in acqua, di 182 mg/mL a 25°C; ha tre costanti di dissociazione acida, ognuna relativa ai diversi gruppi della molecola: 2.17 per il gruppo carbossilico, 9.04 per quello amminico e 12.48 per quello guanidinico. Il suo punto isoelettrico è 10.76 e ha temperatura di fusione intorno ai 240°C [35],[36],[37].



## 2 Drug Delivery System (DDS)

I DDS sono “la formulazione di un dispositivo che consente l’introduzione di sostanze terapeutiche nel corpo e migliora l’efficienza e la sicurezza controllando la velocità, il tempo e il luogo di rilascio del farmaco nel corpo” (definizione dell’*Istituto Nazionale di Sanità* degli Stati Uniti) [1]. Sebbene questi sistemi esistano dagli anni ’50, solo nel 1984 il *Journal of Controlled Release* scrisse per la prima volta di essi e da allora il numero di articoli riguardanti i sistemi di rilascio di farmaco è in continua crescita. Con il passare degli anni questi sistemi si sono sviluppati passando da una prima ad una seconda generazione, attualmente si è alla terza generazione. La seconda è importante perché ha sviluppato i sistemi di ordine zero e quelli a somministrazione autoregolata, biodegradabili e non tossici per l’ambiente biologico con il quale entrano in contatto. Con la seconda generazione si ha anche l’utilizzo di nanoparticelle come sistemi di veicolazione di farmaci [38]. Le nanoparticelle vengono utilizzate a partire dagli anni 70/80 e migliorate dagli anni 2000 circa, sono tutt’ora studiate perché facilitano e migliorano il rilascio del farmaco. La *Food and Drug Administration* ha già approvato molte nanotecnologie e carrier nanometrici per la preparazione di supporti medicali [39].

Tutti i Drug Delivery System devono essere biocompatibili perché se accumulati nel corpo per un determinato periodo di tempo non devono causare effetti indesiderati [5], in più le varie tipologie di carrier hanno diverse caratteristiche fisiche, chimiche e morfologiche ma anche diversa affinità con i farmaci: si possono avere, infatti, interazioni chimiche come legami idrogeno o covalenti, oppure interazioni fisiche come quelle elettrostatiche attraverso interazioni di van der Waals [39].

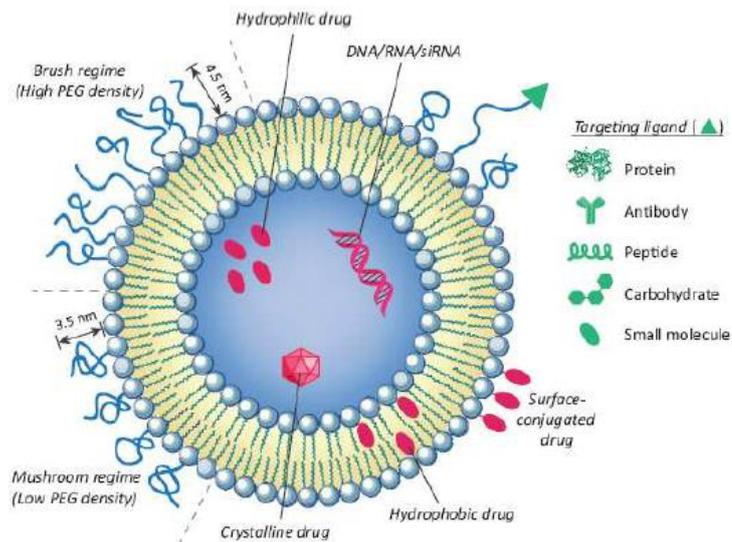
### 2.1 Particelle come Drug Delivery System

Le particelle utilizzate per il Drug Delivery System possono essere varie, alcune già citate nel capitolo precedente e tra le più importanti abbiamo:

- Liposomi: vescicole sferiche composte da fosfolipidi e steroidi con dimensioni intorno ai 50-450 nm [39], mostrati in Figura 2.1; sono tra i sistemi più studiati per il rilascio del farmaco e tra i più utili in quanto la loro membrana è simile a quella delle cellule e questo favorisce l’impregnazione del farmaco. Queste strutture inoltre sono biodegradabili e sicure grazie alla natura biocompatibile dei fosfolipidi di cui queste sono composte [5] e in più permettono l’incorporazione di farmaci sia idrofili che idrofobici [1],[39],[40]. Esistono più tipi di liposomi [41]:
  - quelli convenzionali, costituiti da un doppio strato lipidico in cui possono essere impregnati i materiali idrofobici e una fase centrale acquosa in cui possono essere inseriti materiali idrofili;
  - i liposomi PEGilati sono quelli che posseggono del polietilenglicole sulla loro superficie il quale fornisce un equilibrio sterico;
  - quelli che presentano ligandi come antibiotici, peptidi o carboidrati sulla superficie del liposoma stesso o attaccati al PEG del caso precedente.

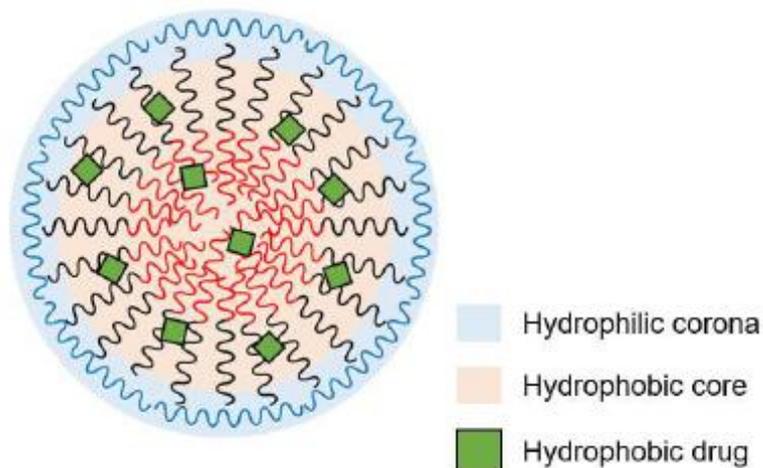
Secondo Y. Zhang *et al.* [42] queste particelle sono facilmente caricabili con farmaci anticancro e acidi nucleici che vengono trasmessi direttamente ai siti tumorali con maggiore facilità [42], ma anche con farmaci neurotrasmettitori, antinfiammatori ed antibiotici [1]. I liposomi, rispetto ai farmaci liberi, aumentano la solubilità e la stabilità di quest’ultimi ed in più diminuiscono la tossicità che questi avrebbero sui tessuti garantendo una maggiore sicurezza [42]. Questi sistemi a base lipidica sono molto utilizzati anche nel campo del wound healing in quanto essendo affini alle membrane

cellulari sono capaci di attraversare le barriere biologiche come la pelle. In questo campo i liposomi vengono caricati con farmaci idrofili come per esempio alcuni fattori di crescita come quello dei fibroblasti (FGF) e l'insulino-simile (IGF) [13]. Essi sono non tossici, compatibili con la pelle e riescono a coprire con efficacia la ferita andando a creare un ambiente umido sulla superficie della lesione favorendo così la guarigione [20].



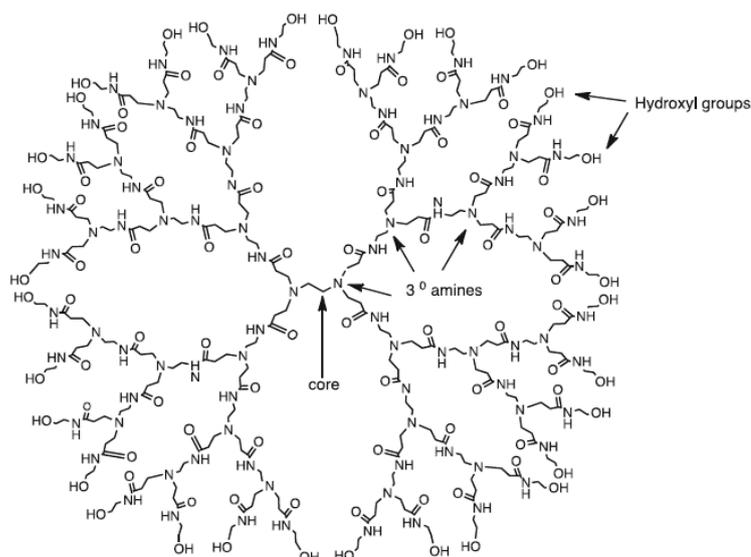
**Figura 2.1:** Liposoma [41]

- **Micelle polimeriche:** nanostrutture costituite da blocchi anfipatici di copolimeri che si raggruppano per formare una struttura a guscio con le teste idrofile all'esterno che interagiscono con la soluzione biologica e le code idrofobe all'interno [43]. In questo modo si trattiene nella parte centrale la soluzione acquosa, all'interno della quale possono essere introdotti farmaci idrofobi, come mostrato in Figura 2.2. Queste micelle hanno delle dimensioni solitamente non maggiori di 100 nm. I farmaci sono caricati all'interno delle micelle principalmente con tre metodi: un processo di dissoluzione diretta, uno di evaporazione del solvente e l'ultimo per dialisi [39]. Le particelle polimeriche sono biodegradabili e biocompatibili e sono anch'esse spesso utilizzate nella guarigione della ferita come sistemi di veicolazione di farmaci in quanto questi ultimi vengono protetti da degradazione e il loro rilascio avviene in maniera controllata. Il polimero più frequentemente utilizzato è il PLGA o acido poli(lattico-co-glicolico) ed esempi di farmaci in esso incorporati sono il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e dell'epidermide (EGF) oppure l'LL-37, un peptide antimicrobico che consentono di accelerare il processo di guarigione [13],[20].



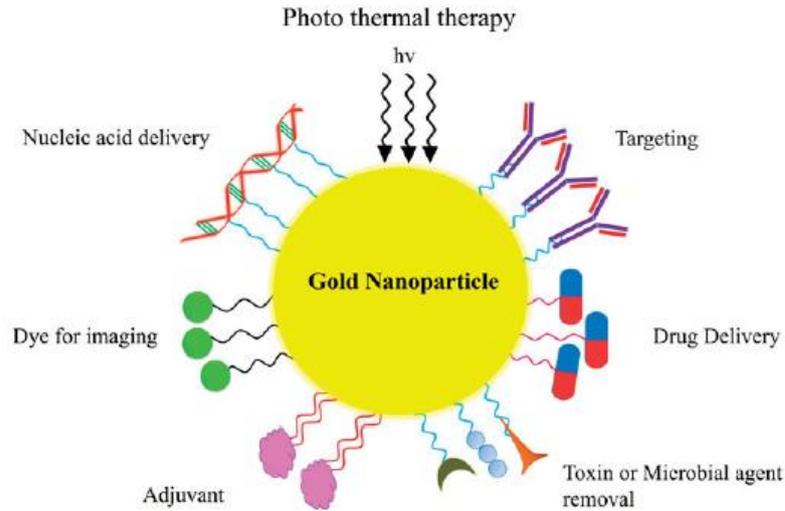
**Figura 2.2:** Micella polimerica [44]

- Cellulosa e i suoi derivati sono utilizzati ampiamente nel campo del drug delivery, ma principalmente per la gelificazione e la modifica della solubilità dei farmaci. Per quanto riguarda il rilascio esso può essere prolungato a causa dei legami idrogeno presenti tra carrier e farmaco [39]. Questi, inoltre, possono essere utilizzati come carrier per peptidi cicatrizzanti, utili per facilitare la guarigione di ferite come per esempio le ulcere [45].
- Dendrimeri: hanno strutture ben definite e tridimensionali, forma globulare e la loro superficie è facilmente funzionalizzabile e per tutti questi motivi sono degli ottimi sistemi di consegna di farmaci. Questi sistemi possono essere sintetizzati partendo dall'interno, dal nucleo, andando ad accrescersi verso l'esterno, o viceversa, quindi procedendo con la loro formazione dall'esterno verso l'interno. I dendrimeri, in base ai gruppi funzionali presenti, possono essere distinti in diverse tipologie, ma quella più utilizzata come carrier è la PAMAM, la quale struttura è mostrata in Figura 2.3, in quanto solubile in acqua e capace di oltrepassare il tessuto epiteliale. Questa tipologia di dendrimero è stata molto studiata da M. Marcinkowska *et al.* [46] i quali hanno associato questi DDS con farmaci antitumorali ed hanno anche sottolineato come questi sistemi possano aumentare la permeabilità di farmaci poco solubili [46]. Per caricare il farmaco al loro interno si può procedere per incapsulamento semplice, interazioni elettrostatiche o interazione covalente [1], mentre il rilascio può avvenire a causa di degradazione dei legami covalenti tra farmaco e dendrimero o per la semplice fuoriuscita del farmaco dovuta a cambiamenti dell'ambiente come pH o temperatura [39],[47].



**Figura 2.3:** Dendrimer di tipologia PAMAM [47]

- Particelle inorganiche: tra queste vi sono nanoparticelle di metallo, argento, platino ed oro che oltre ad avere una buona biocompatibilità e versatilità [48], presentano la risonanza plasmonica di superficie che gli altri carrier (liposomi, dendrimeri e micelle) non presentano [39],[49] e hanno anche buone proprietà ottiche, magnetiche ed elettriche [1]. Le nanoparticelle metalliche, in generale, sono molto spesso usate come carrier per farmaci chemioterapici perché sono facilmente funzionalizzabili e hanno una struttura mesoporosa con un'elevata superficie specifica. Esse riescono anche a ridurre gli effetti collaterali dei farmaci e migliorarne l'accumulo nell'ambiente biologico. Esempi di farmaci incorporati nelle nanoparticelle metalliche, studiati da W. Zhu *et al.* [50], sono il metotressato, la doxorubicina e il fluorouracile. Già da tempo si conoscono le proprietà antimicrobiche dei composti d'argento e per questo vengono spesso sfruttati per ustioni, infezioni batteriche, ferite aperte e ulcere croniche. Le nanoparticelle di argento sono degli antimicrobici ancora più efficienti in quanto presentano delle aree superficiali molto ampie, con diametri inferiori ai 100 nm e contenenti dai 25 ai 15000 atomi di argento. Le nanoparticelle d'oro come anche quelle d'argento hanno delle buone proprietà ottiche, cioè riescono a diffondere la luce nel campo del visibile e vicino all'infrarosso. Essendo l'intensità della radiazione diffusa sensibile alla forma e alla dimensione delle particelle, queste sono molto utili come biosensori e agenti diagnostici soprattutto per il cancro [1],[49],[51],[52]. Alcune delle funzioni di tali particelle vengono mostrate in Figura 2.4.



**Figura 2.4:** Particelle d'oro [52]

Altre particelle inorganiche molto utilizzate sono quelle a base di titanio, che, pur avendo un'elevata efficienza fotocatalitica, inerzia chimica e non tossicità, non vengono spesso utilizzate come carrier di farmaci, ma sono più spesso coinvolte, per esempio, in attività catalitiche [53].

I quantum dots, invece, sono dei cristalli nanometrici aventi diametro nel range compreso tra 2 e 10 nm [39], composti da materiale semiconduttore con particolari proprietà ottiche ed elettroniche che vengono spesso usate nel campo della medicina e della biologia come biosensori e sonde fluorescenti, per esempio per la diagnosi del cancro [49].

Per ultimo, tra le particelle inorganiche sono importanti le silici mesoporose, questi sistemi sono utilizzati in quanto presentano un volume dei pori sufficientemente elevato per poter aumentare la quantità di farmaco caricato nel supporto [5], ma anche perché sono biocompatibili [1],[48] ed hanno un'elevata stabilità chimica, fisica e meccanica, una buona disperdibilità in soluzioni acquose e presentano un'elevata concentrazione di silanoli sulla superficie che permettono un'elevato numero di reazioni superficiali [49]. In generale sono molte le particelle inorganiche che hanno una grande importanza nel processo di guarigione della ferita, le cui principali caratteristiche e applicazioni sono riassunte in Tabella 1.2.

La silice mesoporosa è il carrier utilizzato in questo lavoro, per cui le sue proprietà verranno discusse più approfonditamente nel paragrafo successivo.

## 2.2 Silici Mesoporose

Le silici mesoporose sono materiali ampiamente studiati come carrier di farmaci. Rispettano gli standard di biosicurezza, biodegradabilità e tossicità e appartengono alla categoria “*Generally Regarded As Safe*” (GRAS), riconosciute tali dalla FDA [2],[3].

Vista la loro grande area superficiale, elevato volume dei pori, stabilità e struttura ordinata, sono state studiate come sistemi per immagazzinamento dei farmaci. Questo materiale avendo un'elevata area superficiale permette il caricamento di una grande quantità di farmaco, il quale, trovandosi in pori di piccolissime dimensioni inibisce la sua forma cristallina mantenendo quella amorfa e favorendo così la sua dissoluzione a causa di un aumento della sua solubilità. Ciò risulta essere un vantaggio in quanto se il farmaco fosse libero di organizzarsi manterrebbe la sua struttura cristallina [54].

L'elevata porosità di una silice è quindi una delle caratteristiche più importanti perché, come detto precedentemente, influenza la capacità di caricamento del farmaco, il suo stato e la sua diffusione, ma anche la stabilità o degradabilità del materiale [3].

La silice mesoporosa è interessante nel campo del wound healing in quanto può agire come barriera mantenendo la ferita umida e proteggendola dalle infezioni. Un altro aspetto che la rende interessante per la guarigione della ferita è che dissolvendosi in essa rilascia acido ortosilicico che velocizza la cicatrizzazione [6].

### 2.2.1 Tipologie e sintesi di silice a mesoporosità ordinata

Esistono diverse tipologie di silici mesoporose: le più note sono le MCM (*Mobil Crystalline Materials*) e le SBA (*Santa Barbara Amorphous*) che si distinguono in base ai diversi precursori e condizioni utilizzate per la reazione di sintesi che portano ad una differenza nelle dimensioni e distribuzioni dei pori, perciò diversa morfologia. Si possono distinguere diverse sottoclassi: la MCM-41 e la SBA-15 sono esagonali, la MCM-48 e la SBA-11 sono cubiche e la MCM-50 ha una disposizione lamellare, la SBA-12 è esagonale 3D e la SBA-16 ha una struttura a gabbia cubica. Altri tipi di silici mesoporose sono la HMM-33, la TUD-1, la COK-12 e la KIT-6 [3], [5]. Tra tutte queste, quelle più utilizzate come DDS sono la MCM-41, la MCM-48, la SBA-15 e la SBA-16 [5], [54]. Alcune tipologie di silici sono rappresentate in Figura 2.5

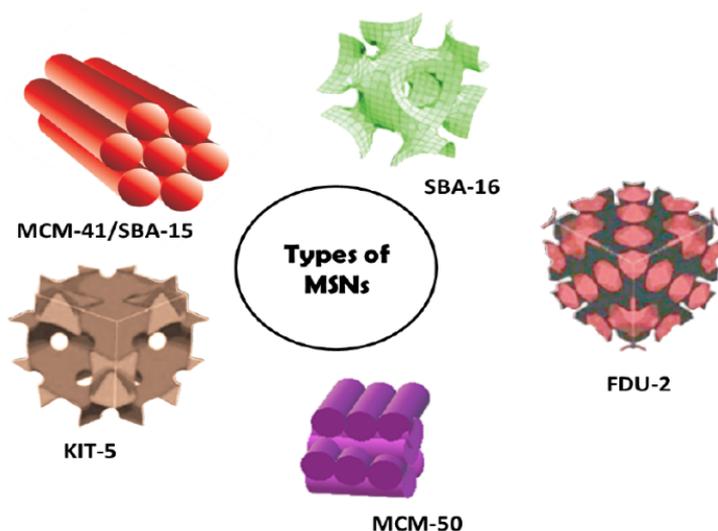


Figura 2.5: Tipologie diverse di silici mesoporose [5]

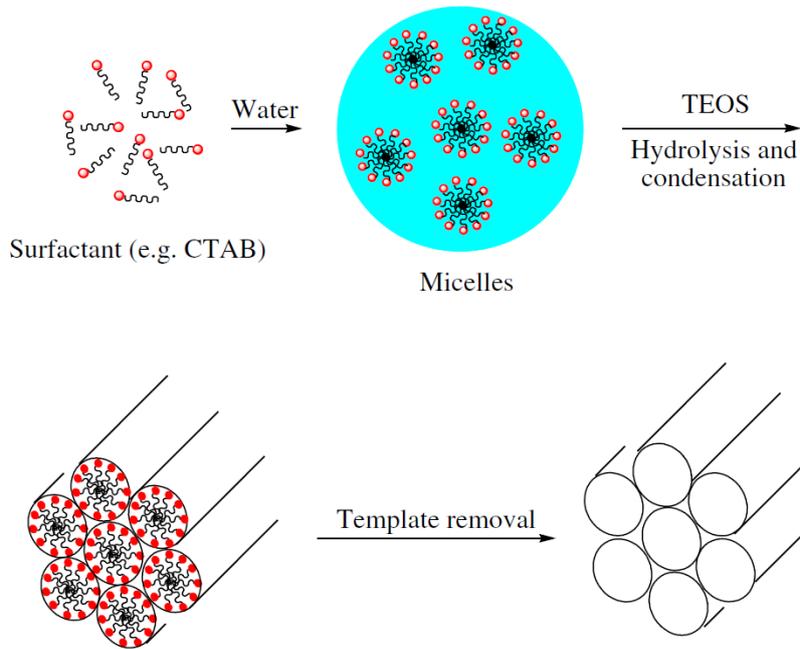
Per sintetizzare le silici mesoporose esistono diverse tecniche, quali per esempio *sol-gel*, *microwave synthesis*, *hydrothermal synthesis*, *templating methods*, *modified aerogel methods* e *fast self-assembly* che si distinguono per le diverse condizioni operative come per esempio il pH di reazione, o anche per la diversa fonte di silice o per il surfattante utilizzato [2].

Per la *microwave synthesis* è necessario un campo elettromagnetico con un'elevata velocità di riscaldamento.

Nell'*hydrothermal synthesis* viene utilizzato un surfattante come agente templante insieme ad un catalizzatore acido o basico e successivamente viene aggiunta una sostanza inorganica per formare l'idrogel il quale, a causa delle elevate pressioni e temperature che è necessario raggiungere, va posto in un'autoclave. Questa tecnica è più complessa e richiede più tempo della precedente.

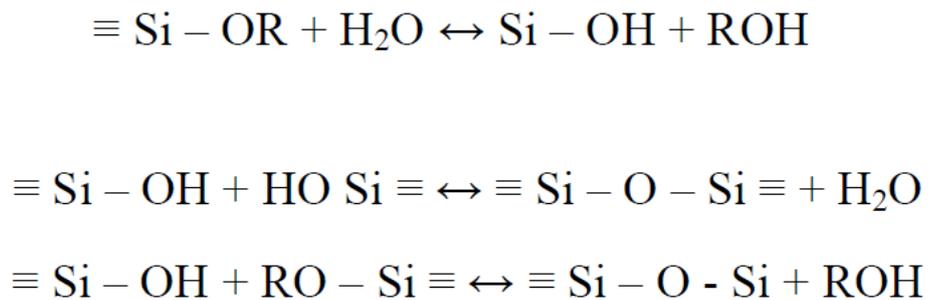
I *templating methods* possono essere distinti in *soft/hard template technique*, in entrambi i casi si utilizzano degli agenti templanti che vengono poi rimossi per ottenere il materiale mesoporoso. La differenza tra i due ricade nella tipologia di agente templante utilizzato: nel *soft template* si utilizzano dei surfattanti mentre nell'*hard template* si utilizzano particelle metalliche o polimeriche con aggiunta poi del precursore della silice; meno spesso possono essere utilizzati agenti templanti naturali.

Uno dei metodi più spesso utilizzati per la sintesi di silici mesoporose con elevate rese è il *sol-gel* con l'ortosilicato tetraetile (TEOS) come precursore della silice e bromuro di cetyltrimetilammonio (CTAB) come agente templante [2] in presenza di un catalizzatore acido o basico. Se si vuole procedere con velocità di sintesi maggiore è necessario lavorare in campo basico [5]. Inizialmente il surfattante (CTAB) si dispone all'interno della soluzione acquosa in micelle che possono assumere una forma sferica o a bastoncino (rod-like), le quali poi si aggregano formando strutture esagonali; successivamente il TEOS subisce idrolisi ed inizia a condensare attorno alle micelle del templante, conclusa la condensazione e dopo un certo tempo di invecchiamento si ottiene una struttura solida di silice e surfattante; infine si procede con la rimozione del CTAB attraverso un processo termico, la calcinazione, oppure un'estrazione tramite solvente [55],[56]. I passaggi appena descritti sono mostrati schematicamente in Figura 2.6. Con questo metodo si evita l'utilizzo di temperature eccessivamente elevate e si può anche avere, più o meno, il controllo sulla dimensione delle particelle solide di silice nell'aerogel o nel xerogel [57].



**Figura 2.6:** Schema di sintesi di una MCM-41 con il metodo *sol-gel* [55]

Il processo viene portato avanti attraverso una polimerizzazione in soluzione acquosa con l'aggiunta di un catalizzatore e di una fonte di silice; più frequentemente vengono usate come fonti molecolari gli alcossisilani ( $\text{Si}(\text{OR})_n$ ), tra cui il silicato di sodio, l'ortosilicato tetrametile oppure come già detto l'ortosilicato tetraetile. Il primo step della polimerizzazione è la formazione del gel tramite l'idrolisi dell'alcossisilano con la formazione di gruppi silanolic ( $\text{Si-OH}$ ). Questi ultimi vengono utilizzati poi per la condensazione, secondo step che può portare alla produzione sia di acqua che di alcol. La reazione di polimerizzazione segue lo schema riportato in Figura 2.7 [5],[57].



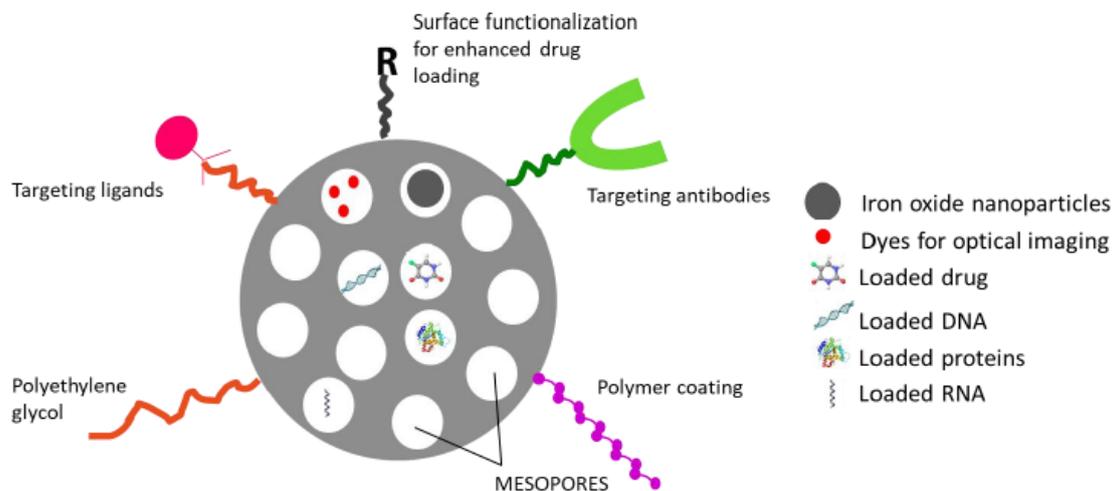
**Figura 2.7:** Rappresentazione schematica della reazione di polimerizzazione del processo di sol-gel, con un primo step di idrolisi ed uno successivo di condensazione [57]

La silice utilizzata in questo lavoro è stata sintetizzata con la tecnica *sol-gel* per cui il procedimento di sintesi verrà spiegato più dettagliatamente nel paragrafo 4.1.

## 2.2.2 Silici mesoporose in campo biomedicale

Le silici mesoporose vengono impiegate in applicazioni biomedicali per diversi scopi, riassunti nella Figura 2.8:

- terapie antitumorali, poiché la superficie della silice è facilmente funzionalizzabile [5]; esse possono essere inoltre utilizzate come carrier per molecole sonda per il rilevamento di tumori e la fototerapia [2];
- attività antinfiammatorie che possono essere studiate utilizzando la MCM-41 e la SBA-15 caricate con ibuprofene. Studiandone il rilascio si è potuto constatare che questo avviene in tre fasi: un primo rapido rilascio del farmaco presente sulla superficie a cui ne segue uno prolungato di quello intrappolato nei pori più piccoli ed infine un'ulteriore prolungato del farmaco presente nei pori più in profondità della particella [5];
- imaging biomedico o per scopi teranostici, perché i fluorofori (molecole utilizzate per questi scopi) hanno una solubilità molto bassa e migliorano le loro proprietà fotochimiche e fotofisiche se incorporati nelle silici mesoporose [5];
- nel campo dell'ingegneria dei tessuti soprattutto per il tessuto osseo: i gruppi silanolici superficiali delle silici mesoporose, reagendo con i fluidi corporei, generano dell'idrossiapatite che favorisce e accelera lo sviluppo del tessuto osseo [5];
- la guarigione delle ferite, sia perché sono molto versatili come supporti di farmaci e altri piccoli agenti utili per il wound healing (come fattori di crescita), sia perché basse dosi di queste particelle favoriscono la chiusura e la cicatrizzazione della lesione, grazie al rilascio dell'acido ortosilicico ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ); quest'acido è una piccola molecola che diffonde molto velocemente e per questo è necessario che il suo rilascio avvenga con un meccanismo sufficientemente lento perché venga mantenuto nell'ambiente della ferita [6],[7].



**Figura 2.8:** Alcune delle funzioni della silice in campo medicale [5]

Diversi studi mettono in luce l'utilizzo delle silici mesoporose come carrier per diversi farmaci, quali l'ibuprofene, il clotrimazolo, la curcumina, il fluorouracile, il ketoprofene, la doxorubicina, il paclitaxel, il docetaxel, la temozolomide, e molti altri [3],[7],[17],[18]. Ci sono, invece, pochi studi sull'utilizzo di silici come supporti per l'arginina.



## 3 Materiali e Metodi

### 3.1 Materiali utilizzati

Etanolo ( $C_2H_5OH$ ), idrossido di ammonio ( $NH_4OH$ ), bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB;  $C_{19}H_{42}BrN$ ), ortosilicato tetraetile (TEOS;  $SiC_8H_{20}O_4$ ), arginina ( $C_6H_{14}N_4O_2$ ), ninidrina ( $C_9H_6O_4$ ), acido cloridrico (HCl) ed acqua distillata.

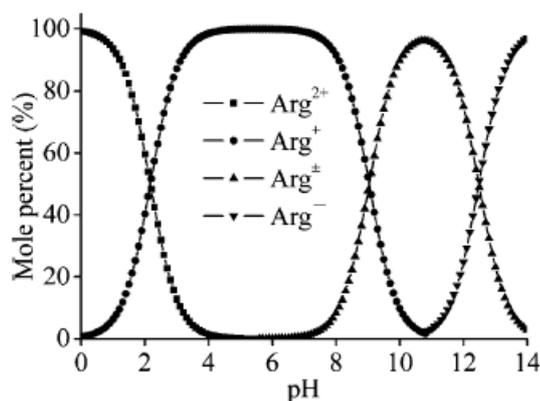
### 3.2 Impregnazione con arginina

La tecnica di incorporazione utilizzata in questo lavoro per caricare l'arginina sul supporto è l'*Incipient Wetness Impregnation (IWI)*.

Quest'ultima è una tecnica vantaggiosa in quanto si può conoscere la quantità di farmaco impregnata poiché il carrier viene messo a contatto con una soluzione circa uguale al volume dei pori che viene calcolata empiricamente, ed il farmaco in essa contenuto viene spinto all'interno dei pori per azione capillare [54]. Durante il successivo essiccamento del supporto per rimuovere i composti volatili, il farmaco depositato sulla superficie esterna viene guidato all'interno attraverso la diffusione. Altri vantaggi di questo metodo sono che il processo può essere condotto a temperatura ambiente e che il farmaco da caricare non viene esposto ad ambienti chimici che potrebbero danneggiarlo. Il farmaco viene caricato in maniera molto efficace e per questo la tecnica *IWI* può essere utilizzata per molecole molto costose [58],[59].

Un esempio di arginina incorporata in una silice mesoporosa con questa tecnica è descritto nell'articolo di P. Solanki e A. Patel [4], nel quale viene sintetizzata una MCM-48 incorporata con arginina e cisteina in diverse condizioni e successivamente sottoposte a caratterizzazioni con tecniche fisico-chimiche. Sono state inoltre effettuate prove di rilascio con fluidi corporei simulati. Dopo la sintesi della MCM-48 eseguita con una tecnica *sol-gel* (simile a quella usata in questo lavoro per la MCM-41) è stato utilizzato l'*Incipient Wetness Impregnation* per incorporare il 10%, il 20% e il 30% di arginina e cisteina in acqua. Il rilascio successivamente è stato realizzato in due solventi a pH diversi, uno molto acido e uno circa neutro e con due modalità, sia in stazionario che in continua agitazione, entrambe a  $37^\circ C$ ; i fluidi di rilascio vengono poi trattati con una soluzione di ninidrina e analizzati con lo spettrofotometro UV-visibile. Dai risultati si può dedurre che [4]:

- in base alla quantità di arginina incorporata la quantità rilasciata varia: risulta essere tanto più elevata quanto maggiore è quella presente all'interno del supporto;
- nel caso di rilascio con continua agitazione la quantità rilasciata è maggiore rispetto a quella che si ha in stazionario poiché in quest'ultima condizione il farmaco diffonde e si dissolve molto più lentamente traducendosi in tempi di rilascio completo dell'arginina più lunghi;
- per i due diversi pH utilizzati, i test di rilascio sono diversi: sia l'arginina che la silice presentano cariche superficiali positive o negative in base al pH: l'arginina è completamente protonata in forma  $Arg^{2+}$  a  $pH < 2$ , in forma di  $Arg^+$  a pH compreso tra 4 e 8, nella forma zwitterionica (neutra) tra pH 10 e pH 12 e in forma  $Arg^-$  a  $pH > 13$  (come mostrato in Figura 3.1) con punto isoelettrico a 10.76. Il campione nel solvente a pH 1.2 rilascia molto più lentamente di quello a pH 7.4 in quanto la forma  $Arg^{2+}$  è più reattiva nei confronti dei silanoli dell'MCM-48 rispetto alla forma  $Arg^+$  e quindi rallenta la dissoluzione delle molecole di arginina.



**Figura 3.1:** Distribuzione delle diverse forme protonate di Arg in funzione del pH [37]

### 3.3 Caratterizzazione dei materiali

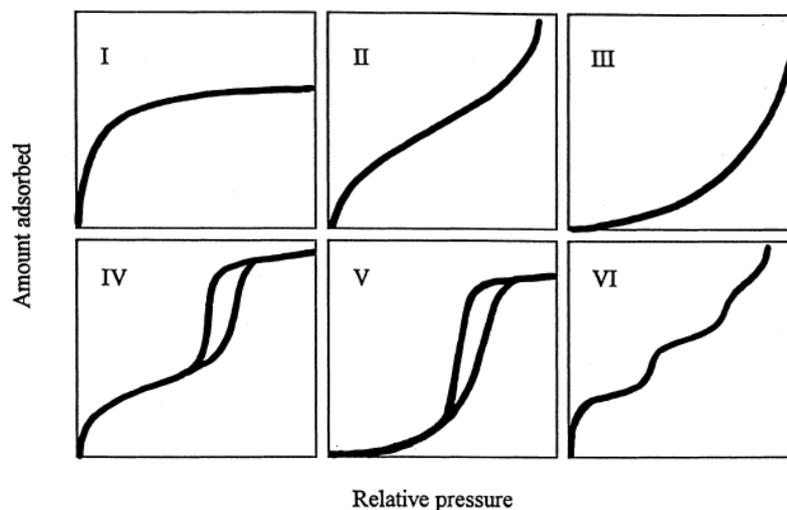
#### 3.3.1 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)

La microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM) è una tecnica analitica microscopica che permette di caratterizzare un materiale andando a identificarne la morfologia.

Le immagini sono state registrate con il *FE-SEM Zeiss Merlin*, riuscendo a visualizzare la superficie molecolare delle particelle con diverse scale: 1  $\mu\text{m}$ , 300 nm, 200 nm e 100 nm grazie all'utilizzo di diversi ingrandimenti da 10.00 K X a 250.00 K X. Prima dell'analisi è necessario, però, procedere con la metallizzazione dei campioni con platino.

#### 3.3.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

L'analisi di fisisorbimento di azoto viene utilizzata per valutare l'area superficiale specifica ( $\text{SSA}_{\text{BET}}$ ), la distribuzione dei pori, il diametro medio e il volume totale dei pori del materiale in esame. La misura permette di ottenere l'isoterma di adsorbimento, in cui viene riportata la quantità di gas adsorbita in funzione della pressione di equilibrio a temperatura costante [60],[61]. Secondo la classificazione IUPAC esistono sei tipi diversi di isoterma, riportati nella Figura 3.2



**Figura 3.2:** Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento per equilibri gas-solido [62]

L'analisi della silice mesoporosa restituisce un'isoterma di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi, con adsorbimento e condensazione capillare [62]; essa presenta un'isteresi tra il ramo inferiore di adsorbimento e quello superiore di desorbimento [61]. La porosità del materiale si può valutare in base alla condensazione del gas nei pori all'aumentare della pressione [63].

L'analisi di fisisorbimento è stata eseguita con lo strumento *ASAP 2020 Plus* della *Micromeritics* con azoto liquido. La misura deve essere eseguita con almeno 50 mg di polvere, inseriti in una buretta di vetro, e previo degasaggio, effettuato per eliminare l'acqua ed eventuali altre impurezze adsorbite, per 2 ore a 150 °C per il materiale senza arginina e a 70 °C per il materiale contenente arginina. La  $SSA_{BET}$  è stata calcolata tramite il modello di *Brauner-Emmet-Teller (BET)* mentre la distribuzione dei pori mediante il metodo di *Barrett-Joyner-Halenda (BJH)*.

### 3.3.3 *Diffrazione a Raggi X (XRD)*

La diffrazione a raggi X viene utilizzata per identificare le fasi cristalline e stimare le dimensioni dei cristalliti. Si ha inizialmente l'interazione del fascio di raggi X con il campione, il fascio viene poi rilevato da un detector e infine si ottengono dei grafici in cui l'intensità dei raggi X è riportata in funzione di  $2\theta$  (angolo tra il fascio e il detector). Durante l'analisi è necessario che il fascio di raggi X mantenga sempre una lunghezza d'onda tale per cui i risultati finali non subiscano alterazioni [64].

Per la determinazione della cristallinità dei campioni di interesse è stato utilizzato il diffrattometro *Panalytical X'Pert<sup>3</sup> Powder* (Cu  $K\alpha$  radiation). La polvere viene posta in un portacampione di alluminio. Le analisi sono state effettuate, sia per la silice tal quale che per la silice contenente arginina a bassi angoli (tra 1° e 8°) e ad alti angoli (da 5° a 60°).

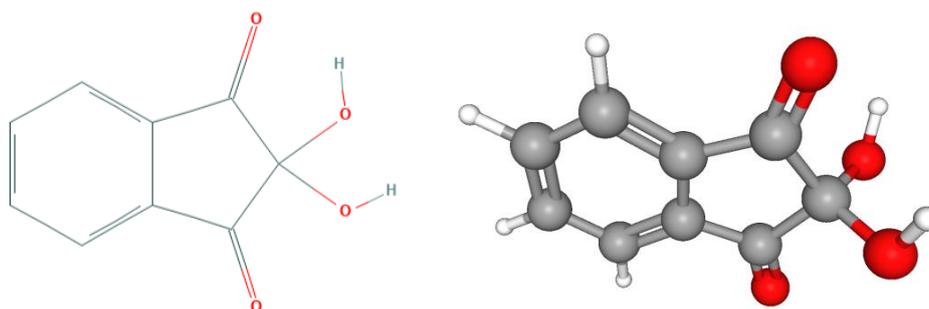
### 3.3.4 *Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)*

La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento utilizzata solitamente per caratterizzare i materiali e per studiarne i legami chimici [65]. In un tipico spettro infrarosso, ottenuto irraggiando il campione con un intervallo piuttosto ampio di radiazione infrarossa, si ha il numero d'onda del fotone incidente in ascissa e l'assorbanza o la trasmittanza in ordinata; la curva presenta dei picchi, ciascuno corrispondente ai diversi legami tra gli atomi che costituiscono il materiale [65],[66].

L'analisi FT-IR in questo lavoro è stata effettuata su pastiglie auto supportate di materiale tal quale o contenente arginina dal diametro di circa 1 cm<sup>2</sup> fatte con l'aiuto di una pressa idraulica; la pastiglia viene inserita in una bustina d'oro ed introdotta in una cella caratterizzata da finestre di KBr trasparenti alla radiazione infrarossa. Prima dell'analisi il campione viene sottoposto ad un processo di degasaggio per circa un'ora alla pressione residua di 0.1 Pascal al fine di eliminare sostanze indesiderate presenti sulla superficie. L'analisi è effettuata con una risoluzione di 2 cm<sup>-1</sup> con lo spettrofotometro *Bruker Equinox 55 con detector MCT* raffreddato ad azoto liquido.

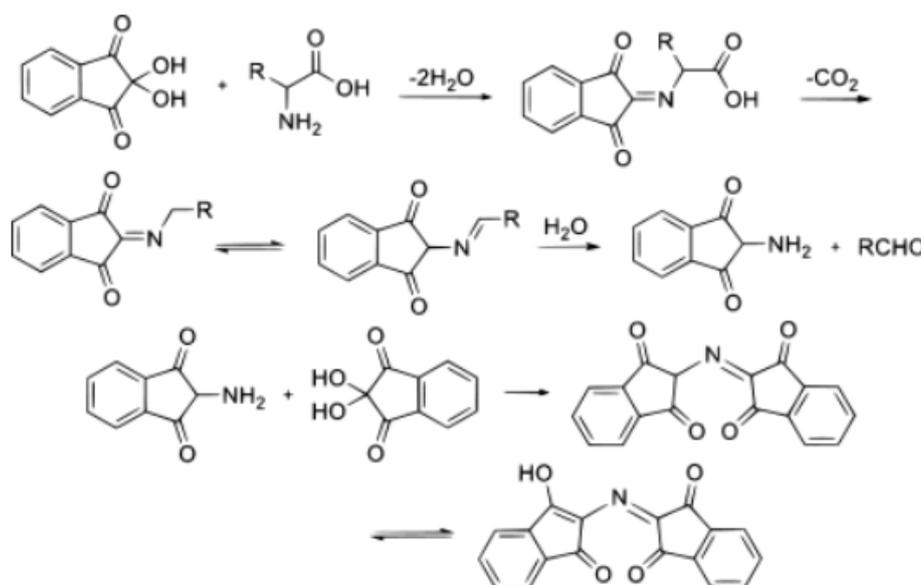
### 3.4 Analisi dell'arginina

Come già accennato nel paragrafo 3.2, gli aminoacidi non sono visibili allo spettrofotometro UV-visibile, è quindi necessario procedere con la derivatizzazione della soluzione di aminoacidi con una di ninidrina in modo da determinare la loro concentrazione. La ninidrina (2,2-diidrossi-1,3-diossoindiridene), la cui formula di struttura è mostrata in Figura 3.3, è stata preparata per la prima volta dal chimico Ruhemann attraverso la reazione dell'1-indanone con l'*N,N*-dimetil-para nitosoanilina [67]. Essa si presenta come una polvere o sottoforma di cristalli di colore giallo tenue ed è inodore; si decompone a 241°C circa ed è solubile in acqua, etanolo e acetone a temperatura ambiente [35].



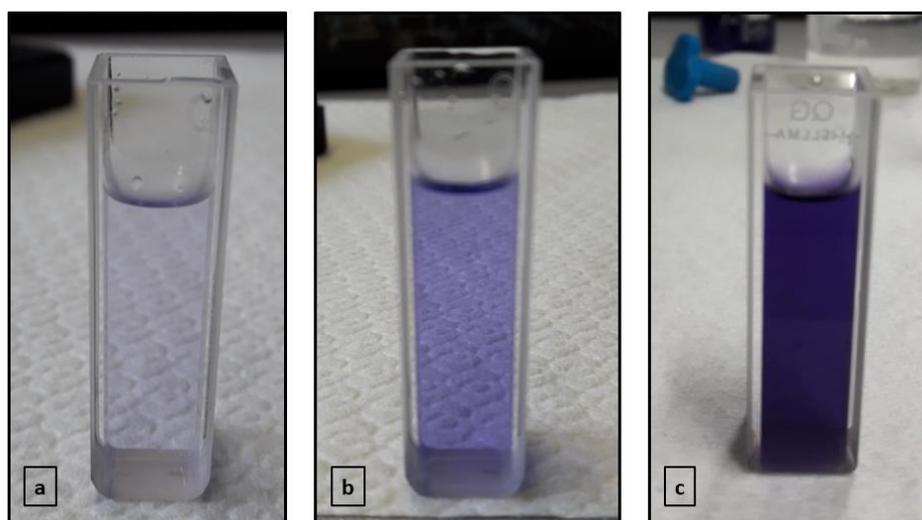
**Figura 3.3:** Formula di struttura della ninidrina 2D e 3D [35]

La reazione tra la ninidrina e un aminoacido generico avviene secondo lo schema mostrato in Figura 3.4. Una mole di arginina, per esempio, reagisce con due di ninidrina andando a formare un composto di colore viola più o meno intenso in base al tipo e alla quantità di aminoacido presente in soluzione, composto chiamato porpora di Ruhemann (RP). La soluzione colorata di viola è visibile così allo strumento e presenta un massimo di assorbimento a circa 570 nm [68].



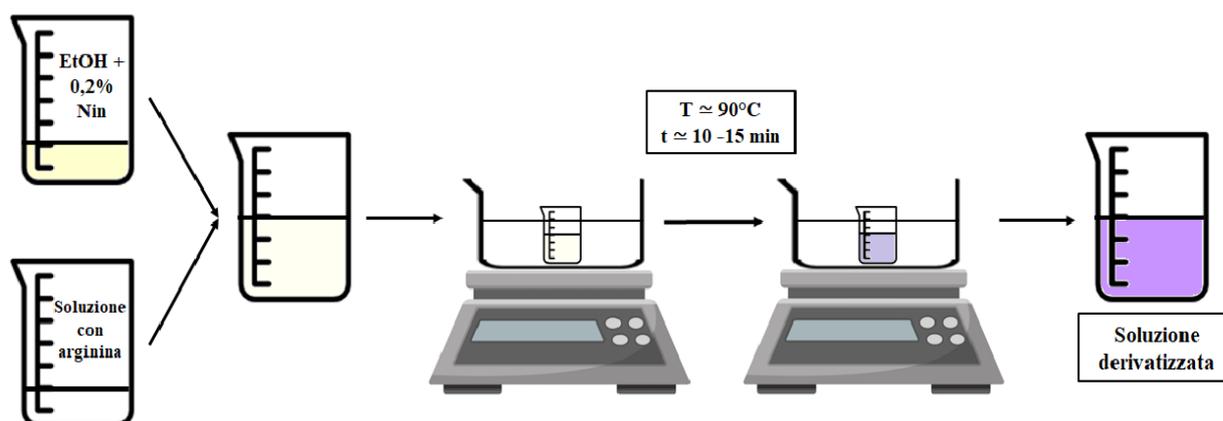
**Figura 3.4:** Schema di reazione tra un aminoacido e la ninidrina

In questo lavoro il test è stato eseguito utilizzando una soluzione di etanolo e ninidrina concentrata allo 0.2%; si è poi proceduto miscelando 2 ml di questa soluzione con 2 ml della soluzione di interesse. I 4 ml di soluzione vengono poi posti in dei flaconcini di vetro all'interno di un bagno d'acqua mantenuto a temperatura di circa 90°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ), in quanto, perché la reazione possa avvenire, è necessario portare l'acqua al suo punto di ebollizione [68]. Dopo qualche minuto, avviene la reazione e di conseguenza il cambiamento di colore da trasparente a viola. Il viola è più o meno intenso a seconda della concentrazione di aminoacidi nella soluzione derivatizzata. Alcuni esempi vengono mostrati in Figura 3.5.



**Figura 3.5:** Colorazioni delle soluzioni a diversa concentrazione di arginina: a) 8.6 ppm; b) 25 ppm; c) 100 ppm

Per una maggiore comprensione dei diversi step che portano all'ottenimento del color porpora di Ruhemann è riportato in Figura 3.6 uno schema del processo.



**Figura 3.6:** Schema del processo di derivatizzazione

### 3.4.1 Spettroscopia Ultravioletta-Visibile

La spettroscopia ultravioletta-visibile è una tecnica di assorbimento molecolare utilizzata per determinare la lunghezza d'onda ultravioletta o visibile a cui assorbe una data soluzione chimica. Con questa tecnica è possibile determinare la quantità di un farmaco incorporato in un

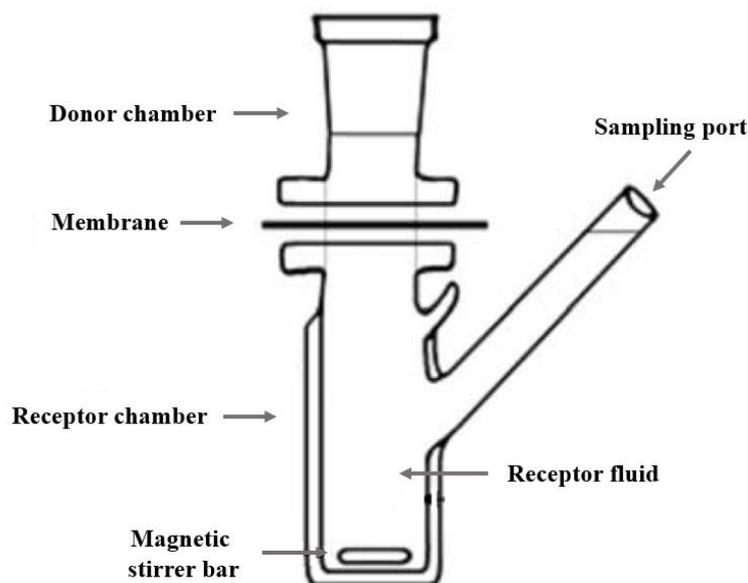
supporto e la quantità dello stesso rilasciato dal materiale. Lo spettrofotometro UV-visibile è composto principalmente da una sorgente di energia radiante nello spettro UV-visibile, un monocromatore capace di isolare un intervallo di radiazioni emesse, centrato nella lunghezza d'onda d'interesse, il più piccolo possibile, delle cuvette di quarzo cioè dei contenitori per i campioni da analizzare trasparenti alle lunghezze d'onda utilizzate e un rivelatore.

Per identificare la quantità di arginina, incorporata e rilasciata, è necessario costruire prima una retta di taratura interpolando dai quattro ai sei punti per avere una relazione tra l'assorbanza e la concentrazione.

Per questo lavoro è stato usato lo spettrofotometro *UV-Vis-NIR Cary 5000* della *Varian*, con il quale abbiamo analizzato le soluzioni in un range di lunghezze d'onda compreso tra 190 nm e 750 nm.

### 3.5 Rette di taratura e rilasci

La tecnica di rilascio utilizzata in questo studio è la cella di Franz la quale simula la permeazione di farmaci attraverso la pelle. È un metodo facilmente riproducibile e implementabile in qualsiasi laboratorio. Questa metodologia presenta diversi vantaggi tra cui l'utilizzo di piccole quantità di farmaci e tessuti [69]. La cella di Franz, riportata in Figura 3.7, è costituita da due compartimenti: una camera donatrice e una ricevente; tra le due parti viene posta una membrana che in questo caso è una membrana da dialisi a base di cellulosa.



**Figura 3.7:** Cella di Franz [70]

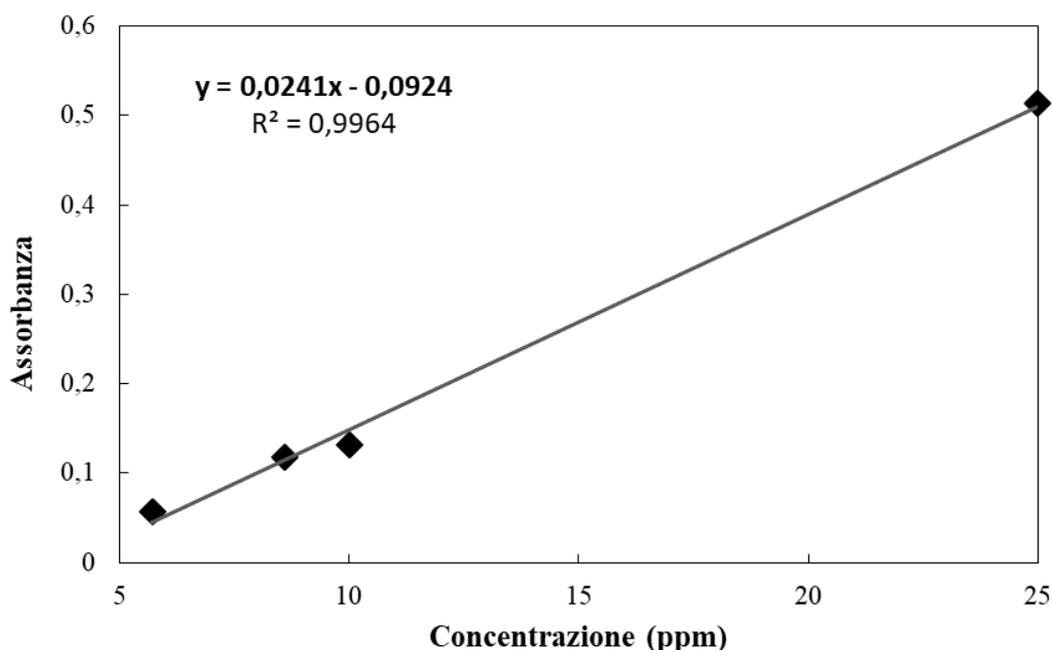
La fase donatrice è costituita da una sospensione di 20 mg di silice contenente arginina e 0.5 ml di acqua distillata; la fase ricevente è invece costituita semplicemente da 4 ml di acqua distillata. Grazie ad un agitatore la soluzione è mantenuta in agitazione e a temperatura costante di circa 33-35°C per tutto il tempo del rilascio (in modo da simulare al meglio le condizioni fisiologiche dell'epidermide). Ad intervalli di tempo stabiliti si preleva tutta la fase ricevente e la si sostituisce con una nuova; quella prelevata deve essere poi analizzata allo spettrofotometro UV-visibile in modo da poter misurare la quantità di arginina rilasciata.

Per poter valutare questa quantità è necessario, come detto in precedenza, costruire una retta di taratura la quale lega la concentrazione all'assorbanza restituita dallo spettrofotometro. Per costruire la retta di taratura si devono usare diluizioni a concentrazioni note partendo da una soluzione madre di arginina in acqua distillata con concentrazione di 1 mg/ml; queste diluizioni vengono poi analizzate con lo spettrofotometro UV-visibile andando a registrare l'assorbanza a 570 nm, lunghezza d'onda corrispondente al picco di assorbimento del composto porpora di Ruhemann (già descritto nei paragrafi precedenti). La Tabella 3.1 mostra le concentrazioni in ppm ( $\mu\text{g/ml}$ ) delle diluizioni utilizzate con la relativa assorbanza.

**Tabella 3.1:** Concentrazioni e assorbanze delle soluzioni diluite di arginina in acqua distillata

| Concentrazione (ppm) | Assorbanza a 570 nm |
|----------------------|---------------------|
| 5.7                  | 0.057               |
| 8.65                 | 0.117               |
| 10                   | 0.131               |
| 25                   | 0.514               |

Utilizzando i dati riportati in Tabella 3.1 è possibile quindi costruire la retta di taratura tramite interpolazione lineare dei valori di concentrazione e assorbanza sopracitati, ottenendo quanto riportato in Figura 3.8.



**Figura 3.8:** Retta di taratura dell'arginina in acqua distillata

Una volta ottenuta la retta ( $y = 0.0241x - 0.0924$ ) è possibile calcolare la quantità di arginina rilasciata ad ogni tempo. Si calcola prima la concentrazione sostituendo all'interno dell'equazione della retta i valori di assorbanza ricavati dagli spettri UV delle soluzioni del rilascio a diverse ore. Successivamente per ogni punto è possibile calcolare la quantità di

arginina in mg moltiplicando la concentrazione ottenuta dalla retta per il volume di rilascio (4 ml). Con questi valori è possibile infine costruire una curva di rilascio, la quale verrà presentata nel capitolo 6.

## 4 Sintesi e Caratterizzazione del Carrier

### 4.1 Sintesi della silice mesoporosa

La silice mesoporosa utilizzata in questo lavoro è una MCM-41 sintetizzata con la tecnica *sol-gel* in presenza di un catalizzatore basico, l'idrossido di ammonio, seguendo la procedura riportata da J. Ambati *et al.* [71] secondo la quale si devono miscelare 20.9 grammi di acqua, 26.8 di etanolo, 6.9 di idrossido di ammonio ed infine 1.1 grammi di CTAB e la miscela deve essere mantenuta in agitazione per 30 minuti. Successivamente si aggiungono 2.1 grammi di TEOS goccia per goccia mantenendo in agitazione per un minuto, quindi si procede con un invecchiamento per due ore con agitazione continua e costante a temperatura ambiente. Passate le due ore seguono la filtrazione e lavaggio con acqua deionizzata, l'essiccamento per una notte ed infine la calcinazione in aria a 500 °C per 4 ore in muffola [71].

L'etanolo come cosolvente viene spesso utilizzato in quanto favorisce la formazione di particelle sferiche ed all'aumentare del suo contenuto l'area superficiale aumenta mentre il diametro medio dei pori diminuisce [72].

Avendo bisogno di un'elevata quantità di materiale, sufficiente per le diverse caratterizzazioni e per più impregnazioni a pH diversi, nel nostro caso tutte le dosi sono state raddoppiate ottenendo così circa 1.1 grammi di polvere (vedi Figura 4.1).

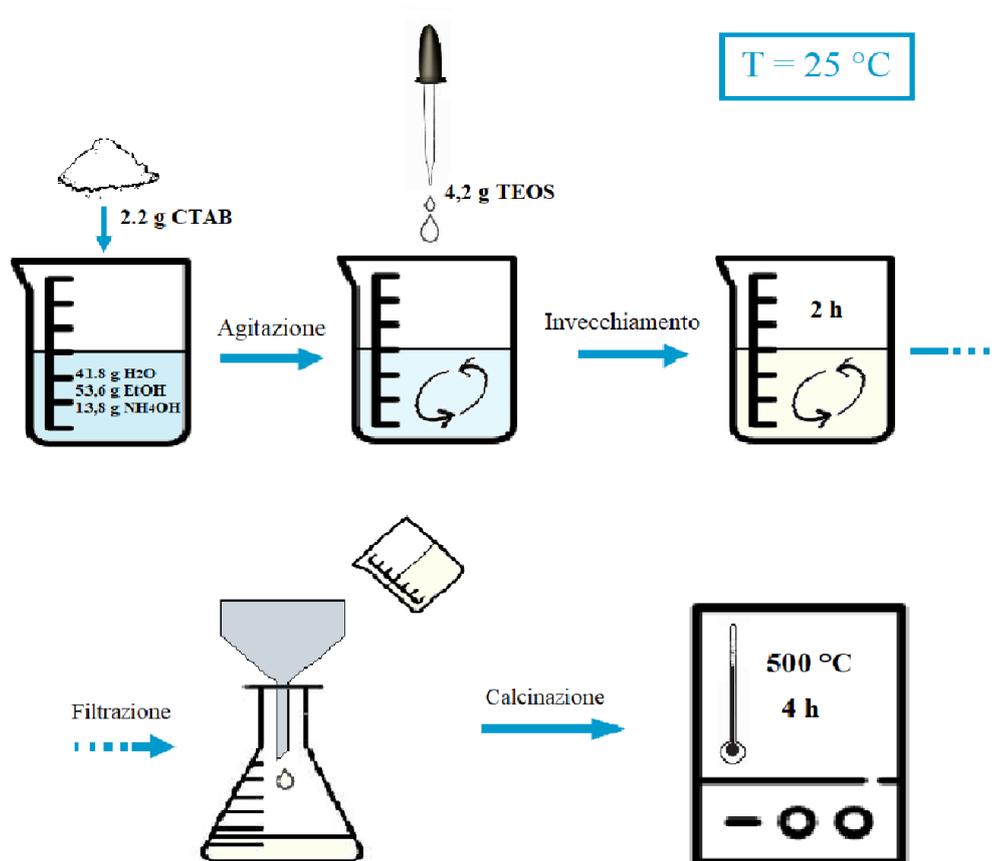


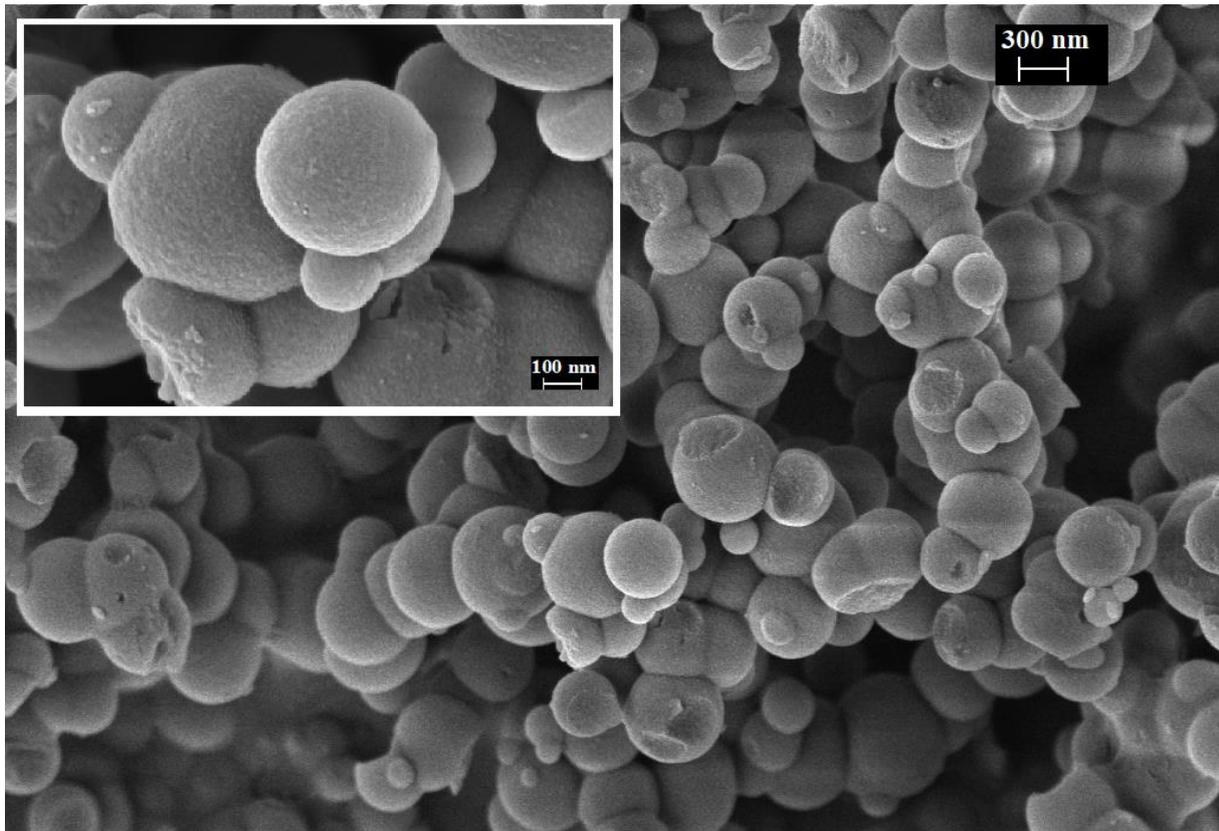
Figura 4.1: Schema di sintesi

## 4.2 Caratterizzazione della Silice

La caratterizzazione del campione ottenuto è stata eseguita con diverse tecniche, sopra descritte, quali: la microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM), l'analisi di fisisorbimento di azoto, la diffrazione a raggi X (XRD) e la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR).

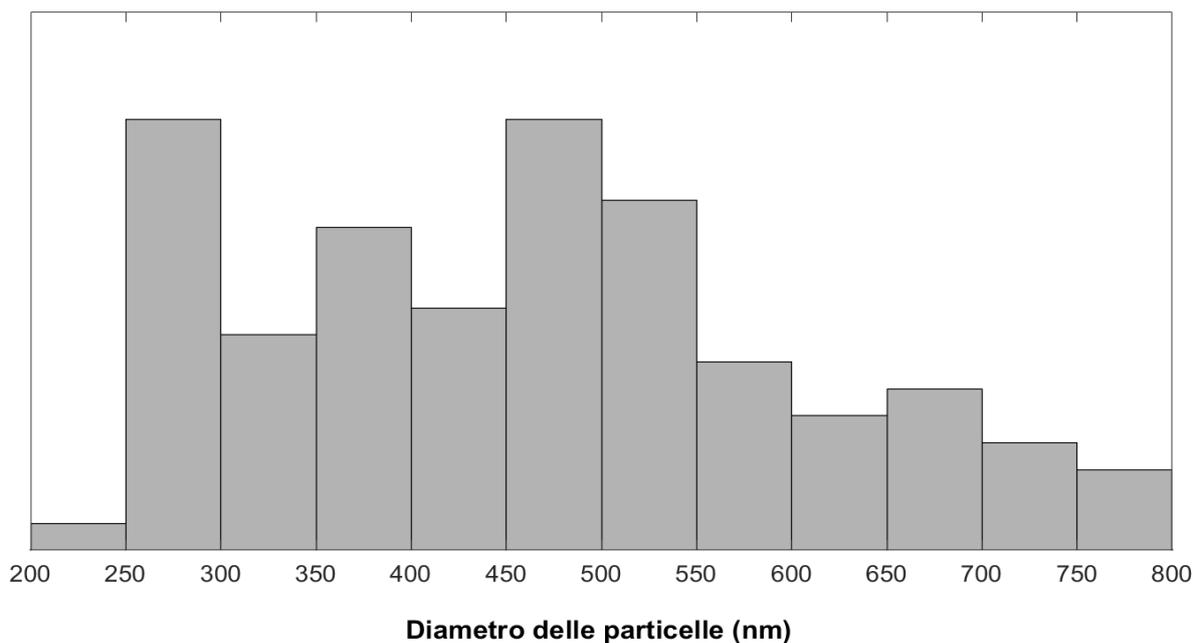
▪ Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM):

In Figura 4.2 è rappresentata la morfologia della silice MCM-41 sintetizzata a diversi ingrandimenti. Si nota un aspetto abbastanza regolare e sferico, in accordo con quanto riportato in letteratura [72].



**Figura 4.2:** Morfologia della silice a 300 nm (ingrandimento 50.00 K X) con dettaglio a 100 nm (ingrandimento 250.00 K X)

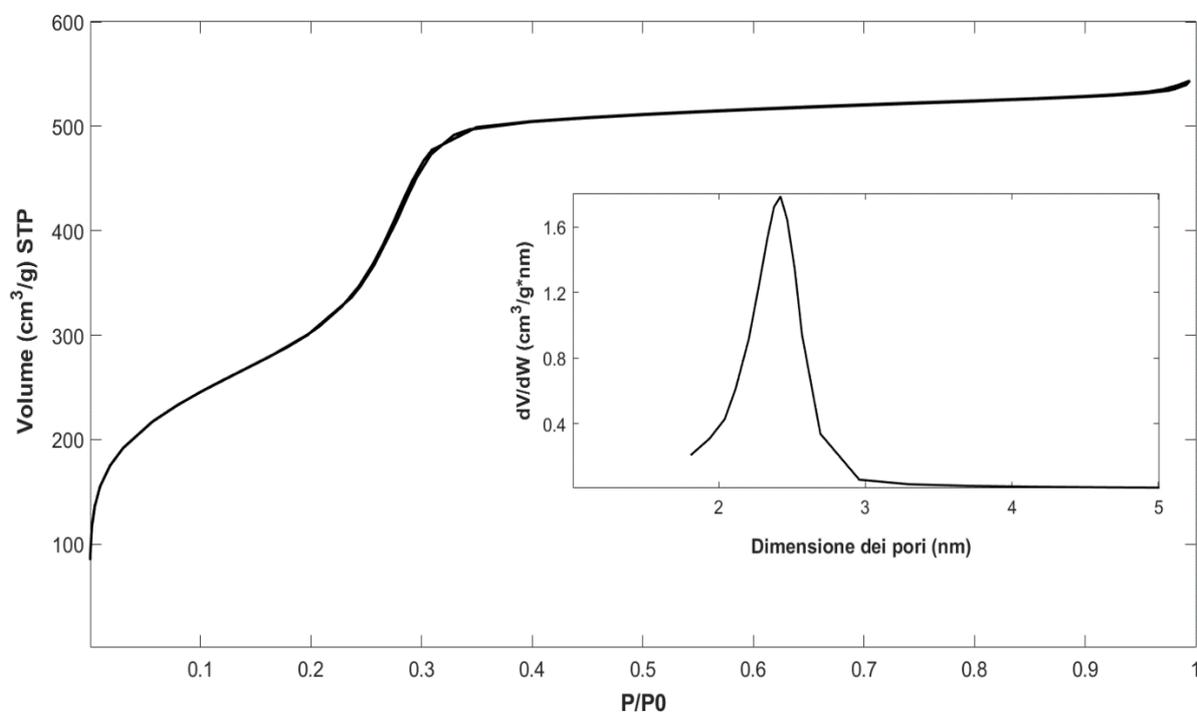
È, inoltre, evidente come la dimensione delle particelle non sia uniforme: sono stati quindi misurati i diametri di cento particelle dell'immagine con ingrandimento 50.00 K X con il programma *ImageJ* ottenendo la distribuzione dei diametri mostrata in Figura 4.3. La dimensione media delle particelle è di 466 nm circa per l'intera popolazione di particelle, con dimensioni che vanno dai 200 nm agli 800 nm, confrontabili con dati presenti in letteratura [73].



**Figura 4.3:** Distribuzione delle dimensioni delle particelle prese da un'immagine FESEM

▪ Analisi di fisisorbimento di azoto:

L'isoterma di adsorbimento e desorbimento e la distribuzione dei pori sono riportate in Figura 4.4. La curva è un'isoterma di tipo IV tipica dei materiali mesoporosi secondo la classificazione IUPAC [62] e mostra una condensazione capillare con riempimento dei pori a valori di pressione relativa ( $P/P_0$ ) compresi tra 0.2 e 0.3 circa [72].



**Figura 4.4:** Isotherme di adsorbimento/desorbimento e relativa distribuzione dei pori della silice

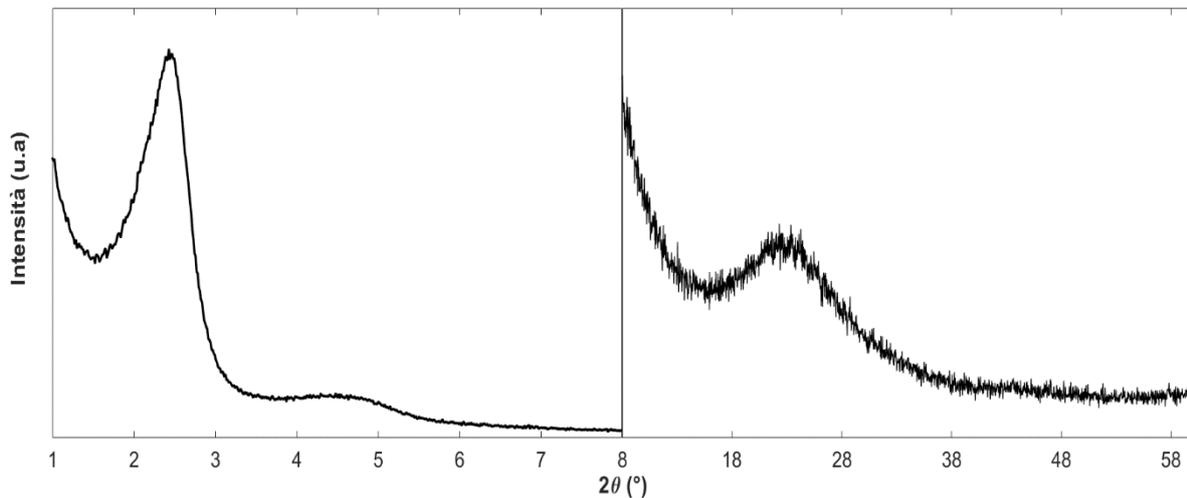
La distribuzione dei pori è monomodale con una dimensione media di 2.4 nm circa. Nella Tabella 4.1 sono riassunte i valori di SSA, volume dei pori e dimensione media dei pori.

**Tabella 4.1:** Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto

| Campione | SSA <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g) | Volume pori (cm <sup>3</sup> /g) | Dimensione pori (nm) |
|----------|--|----------------------------------|----------------------|
| Silice   | 1143                                   | 0.82                             | 2.4                  |

▪ Diffrazione a raggi X (XRD):

In Figura 4.5 sono riportati gli spettri XRD a bassi e ad alti angoli. Lo spettro a bassi angoli di una MCM-41 generalmente presenta quattro picchi di diffrazione, indice di una struttura ordinata a simmetria esagonale [74]. Nel nostro caso è evidente un primo picco di diffrazione a  $2\theta$  pari a circa  $2.43^\circ$  e uno scattering poco definito tra  $4^\circ$  e  $5^\circ$ ; questo pattern è tipico di un materiale caratterizzato da un basso grado di ordine [72],[73].

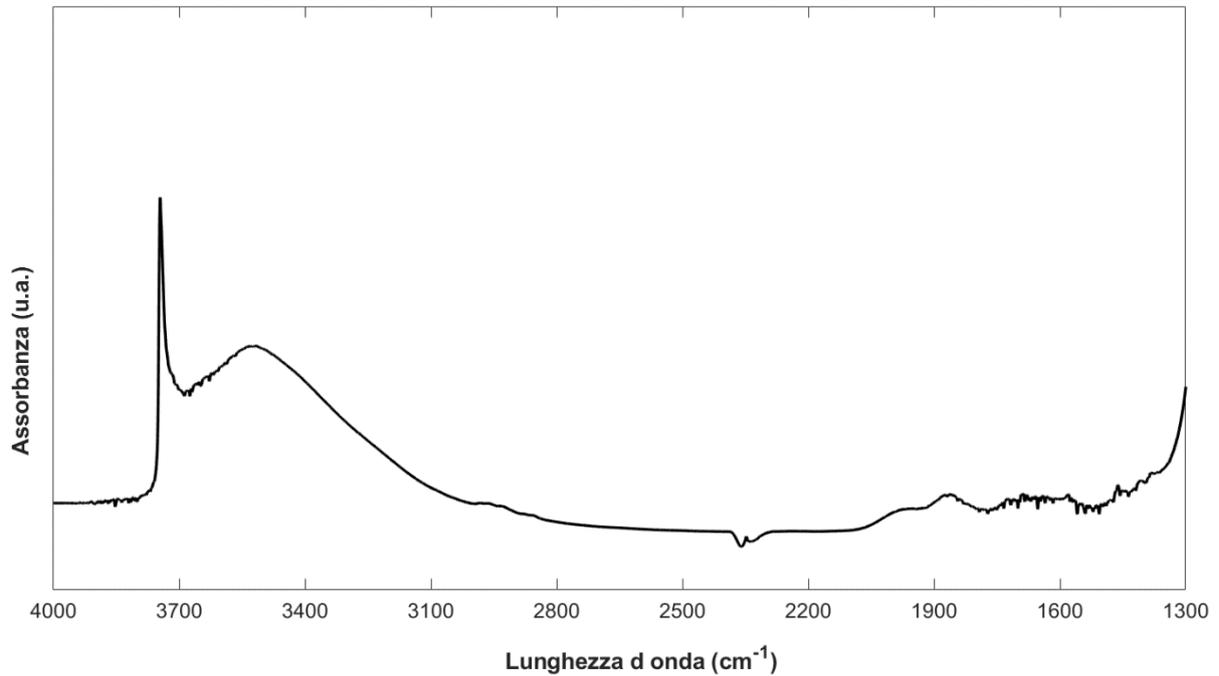


**Figura 4.5:** Spettri XRD a bassi angoli (sinistra) e ad alti angoli (destra) della silice

Nello spettro XRD ad alti angoli non sono osservati picchi, coerentemente con la natura amorfa della silice [74].

▪ Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR):

Lo spettro FT-IR mostrato in Figura 4.6 ha il tipico aspetto dei materiali a base di silice: presenta un picco alla lunghezza d'onda di  $3745\text{ cm}^{-1}$  dovuto alla vibrazione dei silanoli isolati e una banda larga tra  $3600$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching dei gruppi silanoli interagenti (Si-OH) [75],[76].



**Figura 4.6:** Spettro FT-IR della silice



## 5 Silice mesoporosa contenente arginina

### 5.1 Impregnazione della Silice

In questo lavoro l'arginina è stata introdotta all'interno della silice mesoporosa con la tecnica *Incipient Wetness Impregnation (IWI)*, descritta nel paragrafo 3.2.

Sono state effettuate sette impregnazioni, di cui le condizioni sono riportate in Tabella 5.1, ognuna a pH diversi (acidi, basici e circa neutri). In due di esse il pH è stato raggiunto semplicemente per diluizione con acqua deionizzata, per altri quattro si è ottenuto il pH desiderato con l'aggiunta di gocce di acido cloridrico concentrato all' 1%. Nell'ultimo caso l'impregnazione è stata effettuata con etanolo.

Per tutti i campioni impregnati la procedura è simile e fa riferimento allo studio di P. Solanki e A. Patel [4]: sono stati disciolti 20 mg di arginina in 2 ml di solvente e successivamente, solo per quattro dei campioni, si è fatto gocciolare l'acido in quantità diversa in base al pH desiderato. Le quattro soluzioni così ottenute presentano pH circa 1, circa 5, circa 9 e circa 10.

Le due impregnazioni con acqua deionizzata sono state ottenute in maniera diversa. In un caso si è utilizzata una soluzione contenente 27 mg di arginina in 2,7 ml d'acqua, avente un pH di circa 11. Nell'altro caso si è dovuto procedere con un'impregnazione multistep in quanto la soluzione risulta molto più diluita avendo disciolto 20 mg di arginina in 40 ml di acqua deionizzata per ottenere una soluzione vicino alla neutralità.

Anche per il campione impregnato con una soluzione di etanolo si è dovuto procedere con un IWI multistep, in quanto l'arginina risulta essere poco solubile nel solvente utilizzato e 20 mg di arginina sono stati disciolti in 40 ml di etanolo con l'aiuto di un agitatore.

Si sono quindi ottenuti degli slurry aggiungendo goccia a goccia le diverse soluzioni preparate a 200 mg di silice.

Per le impregnazioni multistep, per ogni step sono stati aggiunti 2 ml (per un totale di 20 aggiunte) per utilizzare i 40 ml di soluzione. Ogni aggiunta è stata seguita da essiccamento della polvere in stufa. Per ottenere la polvere contenente arginina dagli slurry tutti i campioni sono stati essiccati in stufa a 60°C circa per una notte, per favorire l'evaporazione del solvente. Alla fine di questo passaggio sono stati ottenuti dei campioni in polvere al 9% in massa di arginina, ovvero 20 mg di arginina in un totale di 220 mg di materiale (20 mg di arginina + 200 mg di silice). Per il campione Arg@Silice/11 invece una polvere al 12% in massa di arginina.

**Tabella 5.1:** Tabella riassuntiva dei campioni impregnati con le relative condizioni di impregnazione

| Campione      | Solvente      | pH | Tempo di contatto | ARG contenuto nominale %(m/m) |
|---------------|---------------|----|-------------------|-------------------------------|
| Arg@Silice/1  | Acqua (+ HCl) | 1  | 1 ora             | 9                             |
| Arg@Silice/5  | Acqua (+ HCl) | 5  | 1 ora             | 9                             |
| Arg@Silice/9  | Acqua (+ HCl) | 9  | 1 ora             | 9                             |
| Arg@Silice/10 | Acqua (+ HCl) | 10 | 1 ora             | 9                             |
| Arg@Silice/11 | Acqua         | 11 | 1 ora             | 12                            |

|                 |         |   |        |   |
|-----------------|---------|---|--------|---|
| Arg@Silice/7    | Acqua   | 7 | 20 ore | 9 |
| Arg@Silice/EtOH | Etanolo | 7 | 10 ore | 9 |

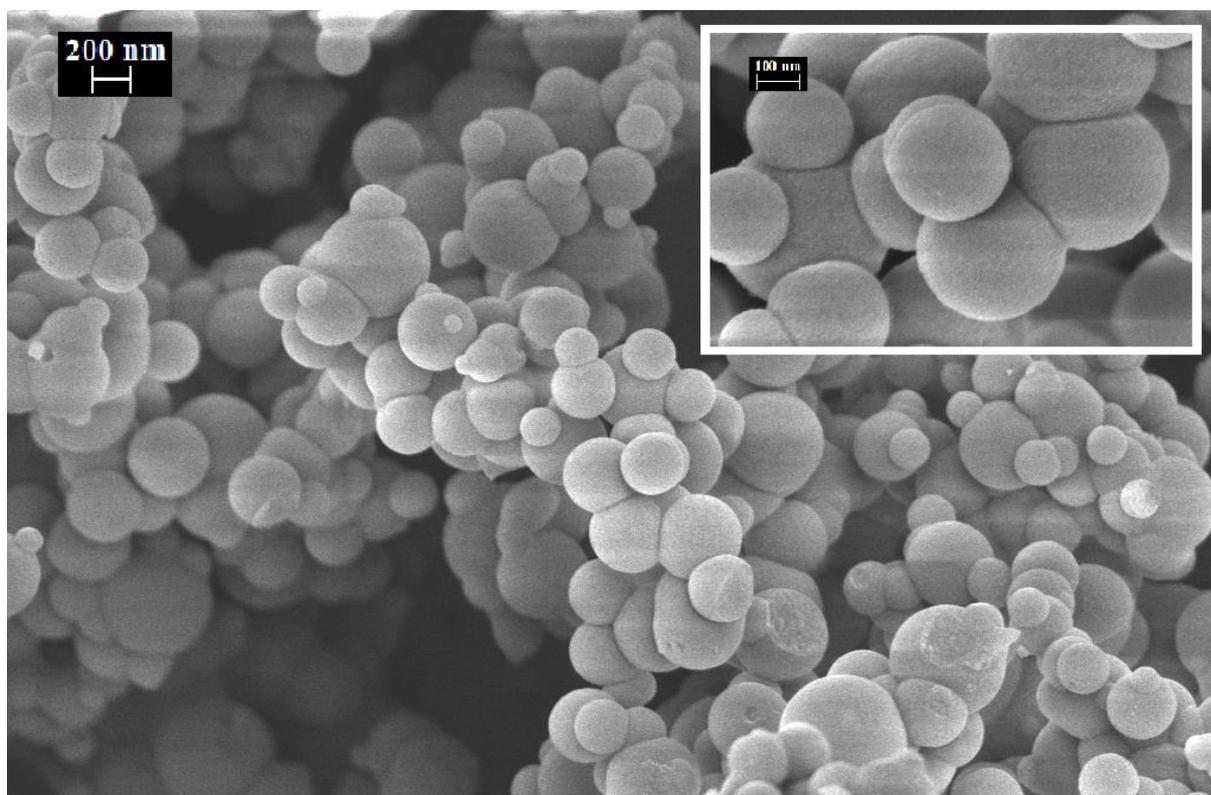
## 5.2 Caratterizzazioni della silice contenente arginina

La caratterizzazione dal punto di vista chimico-fisico e morfologico di tutti i campioni impregnati è stata fatta tramite l'analisi di fisisorbimento di azoto, la diffrattometria a raggi X (XRD) e la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR). I risultati ottenuti vengono divisi nei paragrafi successivi in base al pH di impregnazione e al solvente utilizzato: vengono prima presentati i risultati in ambiente acido, poi quelli in ambiente basico, successivamente si propone un confronto dei due campioni in acqua, uno impregnato in un unico step e l'altro con IWI multistep ed infine viene mostrata la caratterizzazione del campione impregnato in etanolo.

### 5.2.1 Campioni impregnati in ambiente acido

- Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo (FESEM):

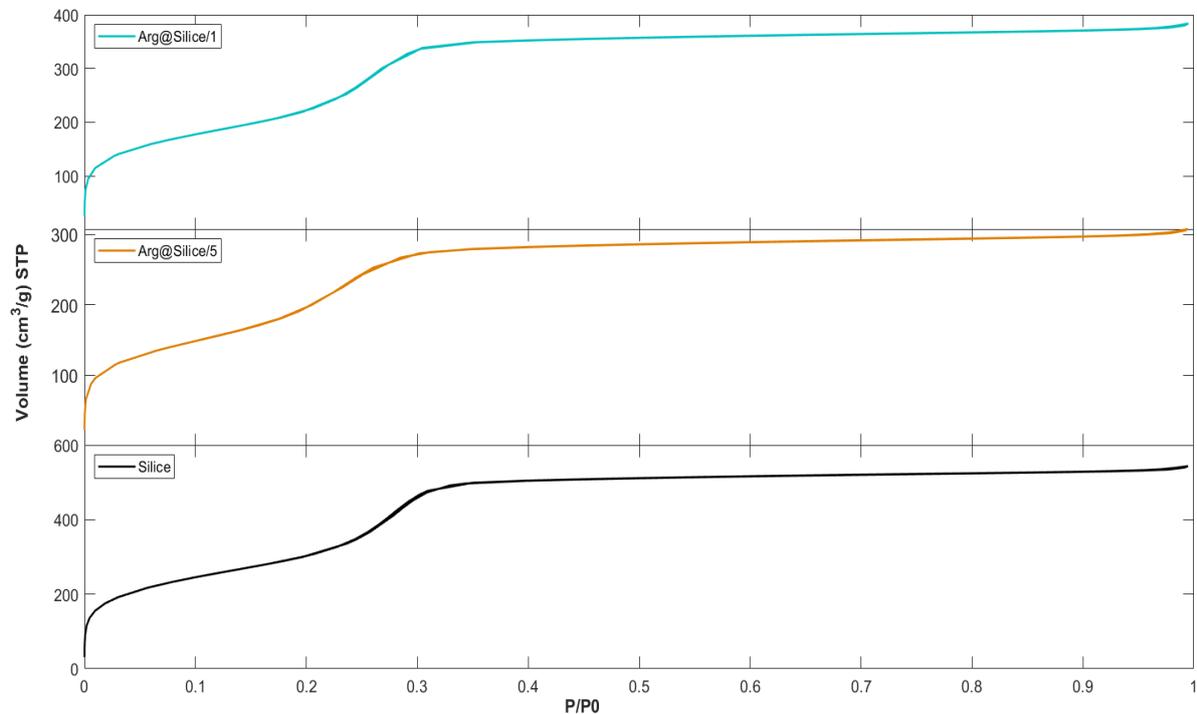
In Figura 5.1 viene mostrata la morfologia del campione Arg@Silice/5 a diversi ingrandimenti. L'aspetto delle particelle non è variato rispetto a quello della silice tal quale. Le particelle sono infatti ancora sferiche e abbastanza regolari, con una dimensione media intorno ai 450 nm.



**Figura 5.1:** Morfologia del campione Arg@Silice/5 a 200 nm (ingrandimento 50.00 K X) con dettaglio a 100 nm (ingrandimento 250.00 K X)

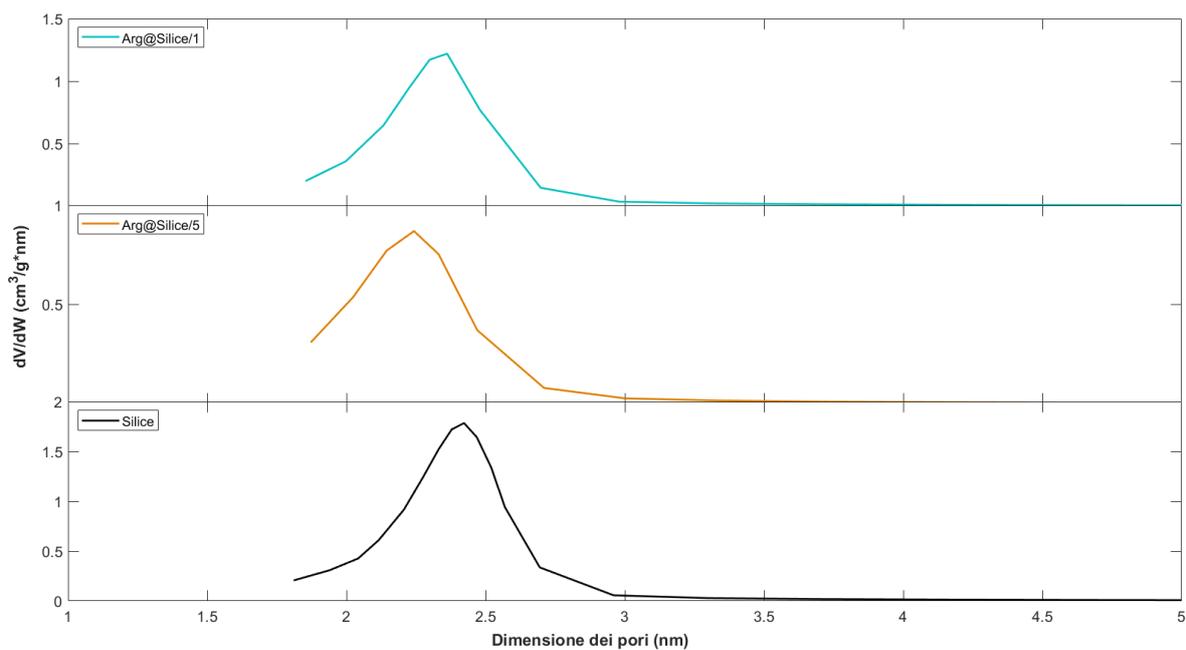
▪ Analisi di fisisorbimento di azoto:

In Figura 5.2 sono mostrate le isoterme di adsorbimento/desorbimento dei campioni Arg@Silice/1 e Arg@Silice/5 confrontati con quella della silice tal quale. La forma dell'isoterma dei due campioni impregnati è pressoché uguale a quella della silice tal quale per cui anche le isoterme dei campioni contenenti arginina sono di tipo IV.



**Figura 5.2:** Isotherme di adsorbimento/desorbimento dei campioni impregnati a pH acidi

Dalla distribuzione dei pori, mostrata in Figura 5.3, è possibile osservare la deposizione dell'arginina all'interno dei pori stessi in quanto la loro dimensione è diminuita, seppur di poco, rispetto a quella dei pori della silice tal quale.



**Figura 5.3:** Distribuzione dei pori dei campioni impregnati a pH acidi

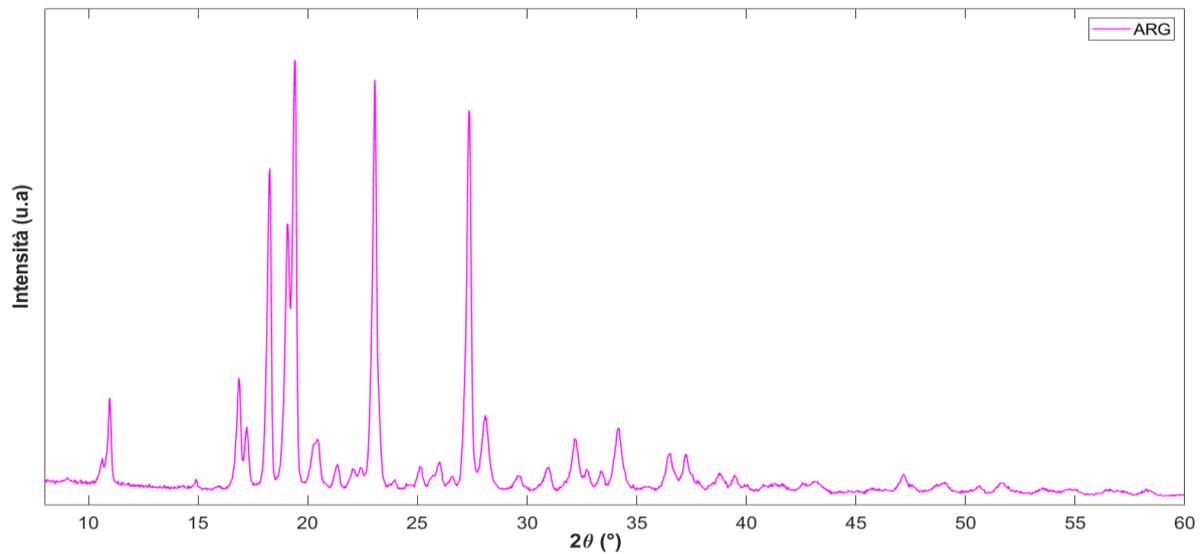
I valori di area superficiale, volume dei pori e dimensione media dei pori dei due campioni sono riportati in Tabella 5.2. Da questi è chiaro come il principio attivo sia stato correttamente incorporato; la presenza dell'arginina infatti fa sì che tutti e tre i valori risultino diminuiti rispetto a quelli della silice mesoporosa.

**Tabella 5.2:** Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto

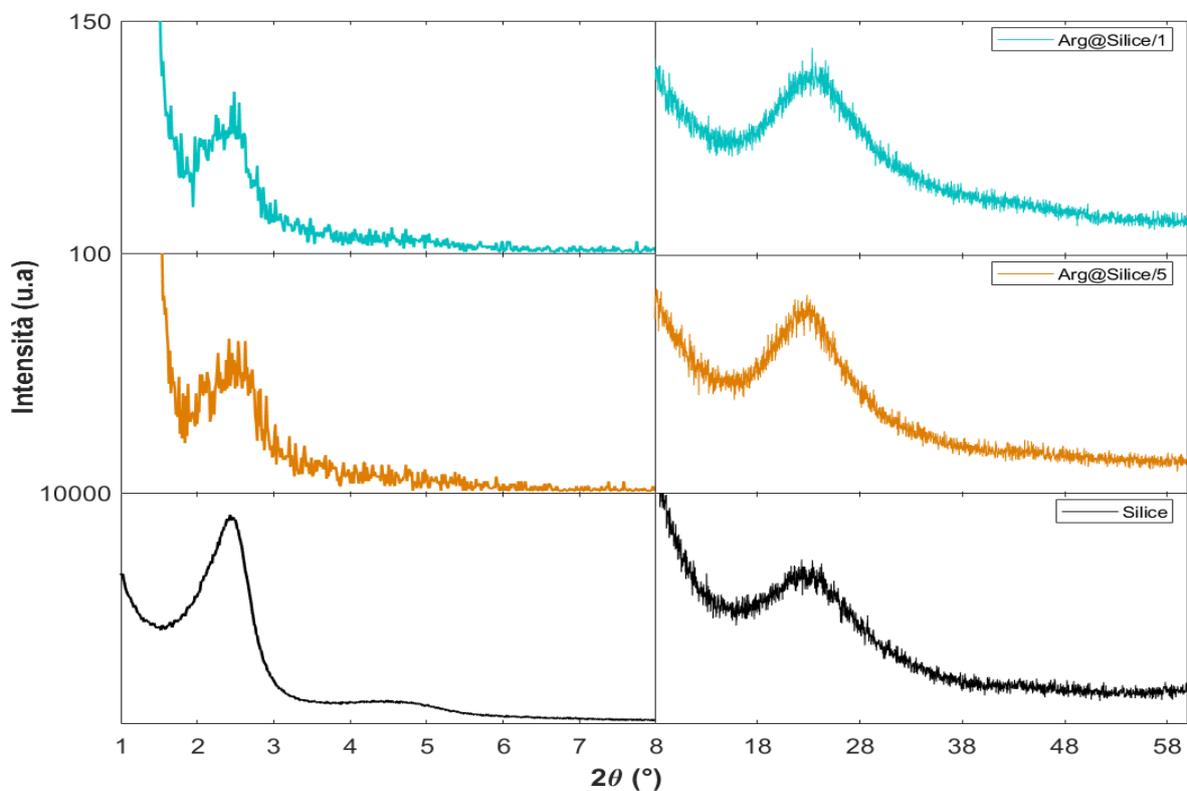
| Campione     | SSA <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g) | Volume pori (cm <sup>3</sup> /g) | Dimensione pori (nm) |
|--------------|--|----------------------------------|----------------------|
| Silice       | 1143                                   | 0.82                             | 2.4                  |
| Arg@silice/1 | 848                                    | 0.57                             | 2.4                  |
| Arg@silice/5 | 792                                    | 0.46                             | 2.2                  |

▪ Diffrazione a raggi X (XRD):

In Figura 5.5 sono riportati gli spettri XRD a bassi ed alti angoli. Lo spettro ad alti angoli di entrambi i campioni risulta essere molto simile a quello della silice tal quale mentre non ha nulla in comune con lo spettro dell'arginina in forma cristallina mostrato in Figura 5.4: da ciò si può dire che l'arginina incorporata all'interno del supporto è presente in forma amorfa.



**Figura 5.4:** Spettro XRD ad alti angoli dell'arginina



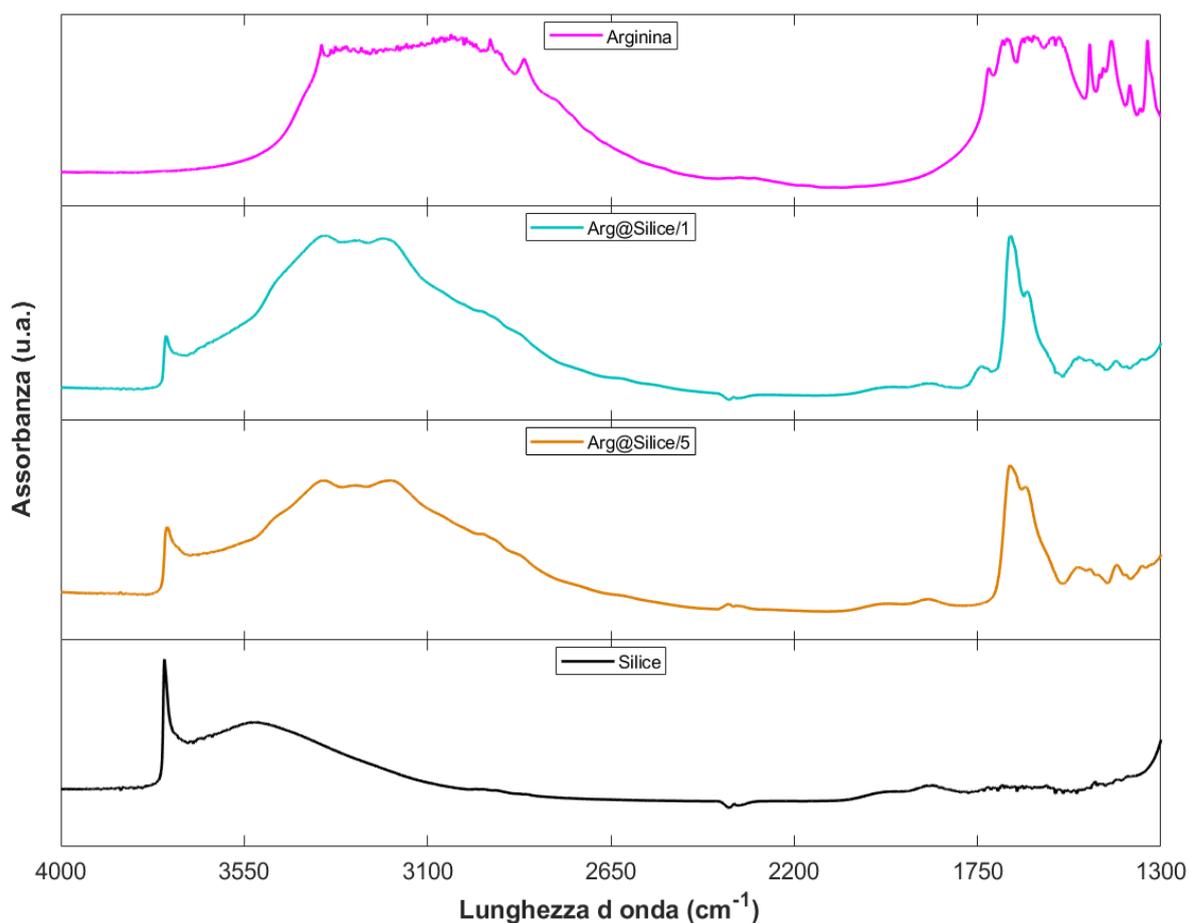
**Figura 5.5:** Spettri XRD a bassi angoli (sinistra) e ad alti angoli (destra) dei campioni impregnati a pH acidi

Per quanto riguarda gli spettri XRD a bassi angoli dei due campioni contenenti arginina non si osserva più il primo picco come nella silice tal quale ma uno scattering mal definito, visibile solo amplificando lo spettro (vedi asse delle ordinate). La scomparsa di questo picco potrebbe essere dovuta sia alla perdita di ordine della struttura interna della silice mesoporosa che alla presenza di un elevato numero di molecole di principio attivo all'interno dei pori. Nel caso dei campioni Arg@Silice/1 e Arg@Silice/5 è più probabile che la perdita del primo picco sia causata dalla presenza dell'arginina all'interno del supporto in quanto dall'analisi di fisisorbimento (Figura 5.2) non si osserva una modificazione della struttura porosa del supporto stesso.

▪ Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR):

Per poter confrontare gli spettri FT-IR dei campioni con quelli dell'arginina è stato necessario effettuare prima la sua caratterizzazione. L'analisi su quest'ultima è stata effettuata con lo spettrofotometro *Bruker Equinox 55* come descritto nel paragrafo 3.3.4 su una pastiglia ottenuta miscelando il 5% di arginina con il 95% di KBr.

Confrontando le curve FT-IR della silice e dell'arginina pure con gli spettri dei due campioni Arg@Silice/1 e Arg@Silice/5 in Figura 5.6 si possono osservare diverse bande di assorbimento che confermano l'interazione silice-arginina.



**Figura 5.6:** Spettro FT-IR dei campioni impregnati a pH acidi

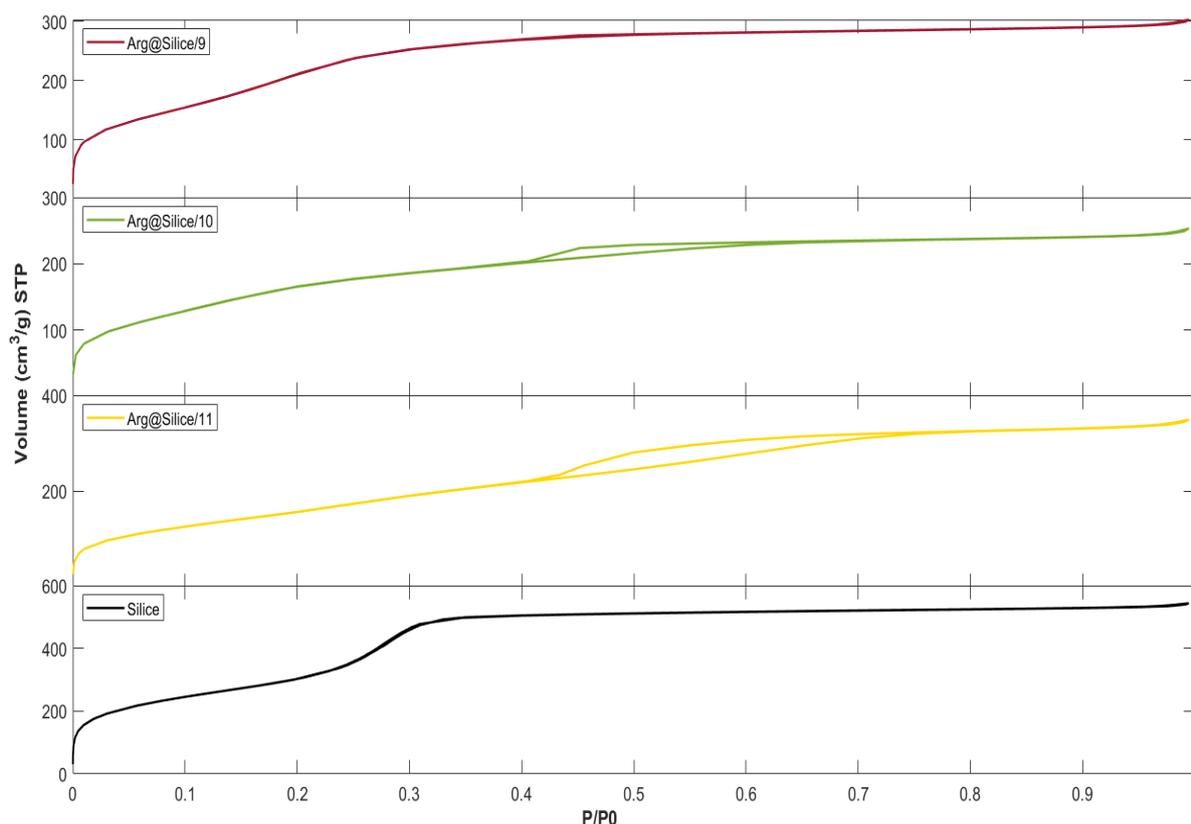
Gli spettri dei due campioni contenenti arginina sono molto simili: si osserva il picco dei silanoli isolati a  $3745\text{ cm}^{-1}$  di intensità minore rispetto a quello della silice tal quale, una banda di

assorbimento molto larga e ben strutturata tra 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  in cui si ha lo stretching dei gruppi N-H dell'arginina e il legame idrogeno dei silanoli con l'arginina ed infine sotto i 1750  $\text{cm}^{-1}$  si osservano delle bande intense dovute allo stretching dei gruppi C=O e C=N dell'arginina [4],[77]

### 5.2.2 Campioni impregnati in ambiente basico

#### ▪ Analisi di fisisorbimento di azoto:

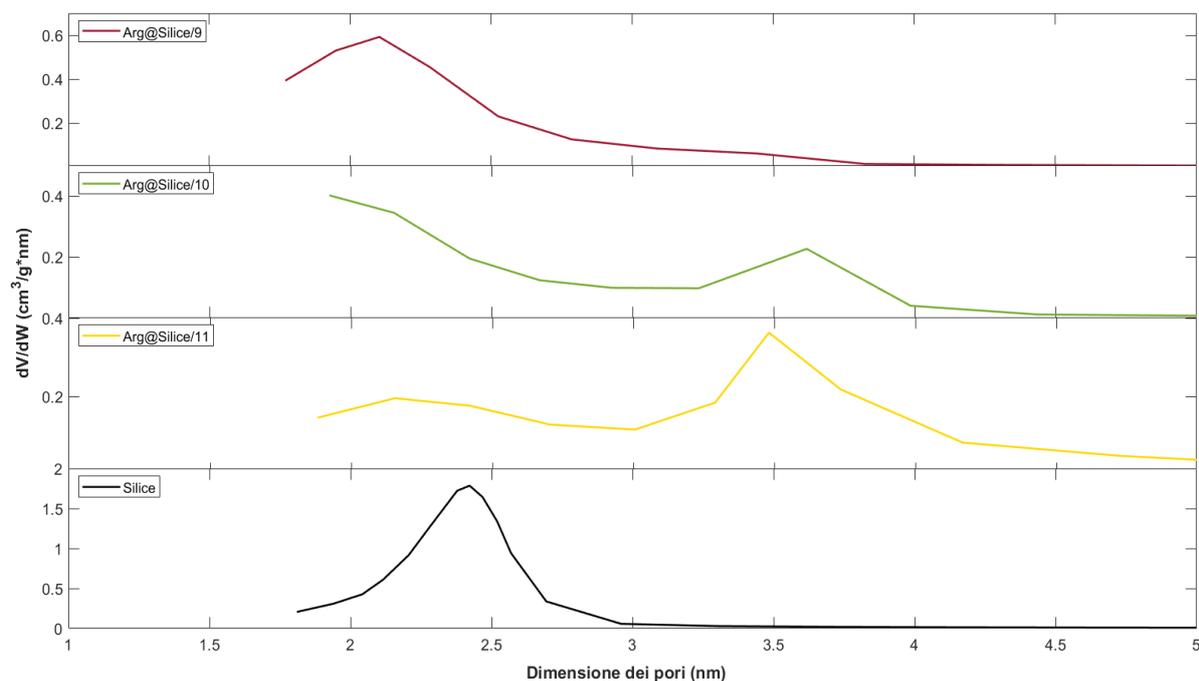
Le isoterme dei campioni impregnati in ambiente basico sono mostrate in Figura 5.7: si può notare come passando da un pH 9 ad un pH 11 la silice presenta sempre maggiore grado di degradazione.



**Figura 5.7:** Isotherme di adsorbimento/desorbimento dei campioni impregnati a pH basici

La degradazione del campione è osservabile dalla diversa forma che l'isoterma assume e dal coppia di isteresi sempre più evidente; inoltre in tutti i casi l'isoterma risulta più bassa rispetto a quella della silice [73].

Anche dalla distribuzione dei pori (Figura 5.8) si può notare la degradazione della silice, con la formazione di una nuova popolazione di pori nei campioni Arg@Silice/10 e Arg@Silice/11, mentre per il campione Arg@Silice/9 si osserva semplicemente una diminuzione della dimensione dei pori. Nei campioni impregnati a pH 10 e pH 11 la formazione della nuova popolazione di pori di dimensioni maggiori a discapito di quelli più piccoli potrebbe essere dovuta dalla degradazione della parete tra due pori confinanti [78]. Questo aspetto può essere anche osservato dai valori della dimensione dei pori riportati in Tabella 5.3, maggiori per i due campioni suddetti.



**Figura 5.8:** Distribuzione dei pori dei campioni impregnati a pH basici

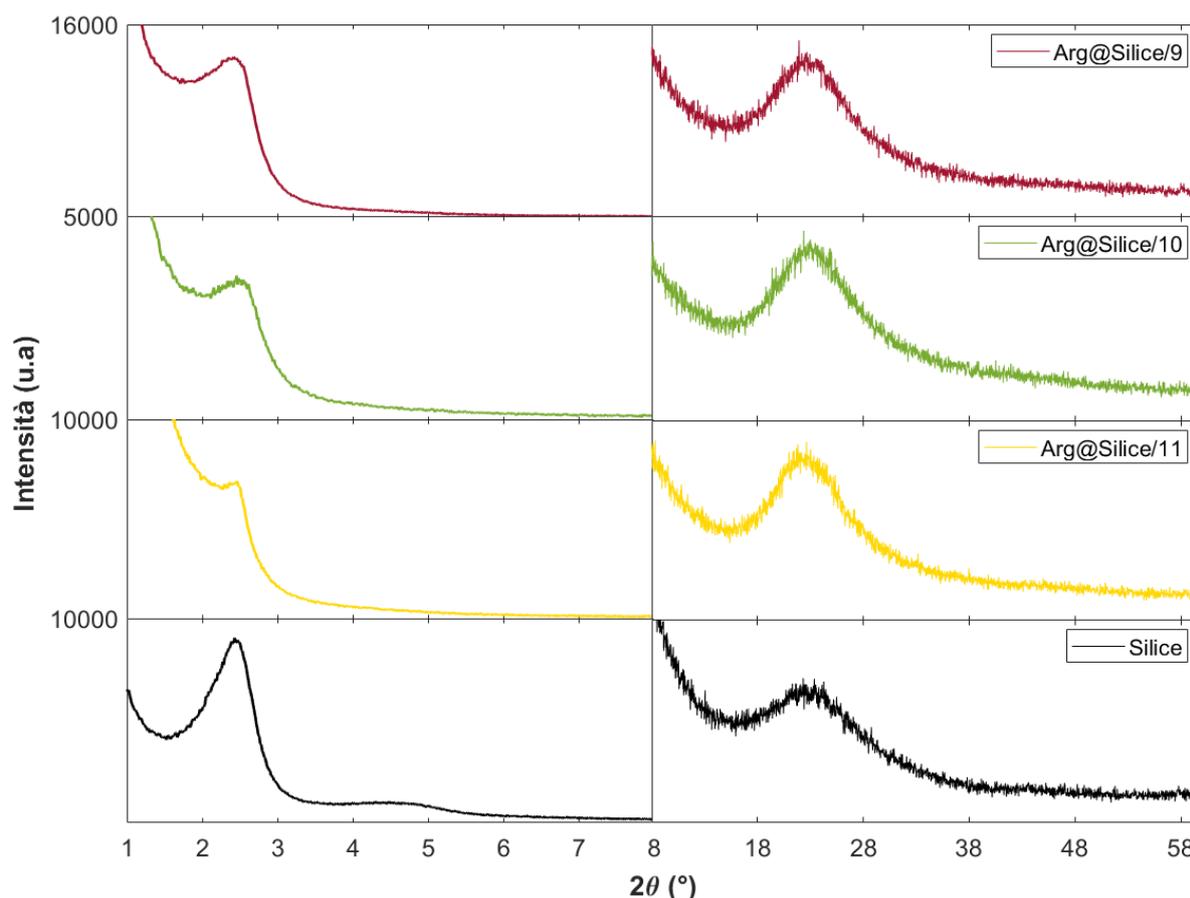
In Tabella 5.3 sono presentati i risultati ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto: i valori di area superficiale e volume dei pori, come nel caso precedente, diminuiscono per tutti e tre i campioni contenenti arginina rispetto a quelli della silice tal quale.

**Tabella 5.3:** Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto

| Campione      | SSA <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g) | Volume pori (cm <sup>3</sup> /g) | Dimensione pori (nm) |
|---------------|--|----------------------------------|----------------------|
| Silice        | 1143                                   | 0.82                             | 2.4                  |
| Arg@silice/9  | 929                                    | 0.45                             | 2.1                  |
| Arg@silice/10 | 656                                    | 0.38                             | 3.6                  |
| Arg@silice/11 | 623                                    | 0.5                              | 3.5                  |

▪ **Diffrazione a raggi X (XRD):**

Gli spettri XRD a bassi ed alti angoli dei campioni impregnati a pH basici sono mostrati in Figura 5.9. Come nel caso precedente lo spettro XRD ad alti angoli conferma il fatto che il principio attivo incorporato sia nella sua forma amorfa in quanto non si ha la presenza di picchi evidenti confrontabili con la Figura 5.4.

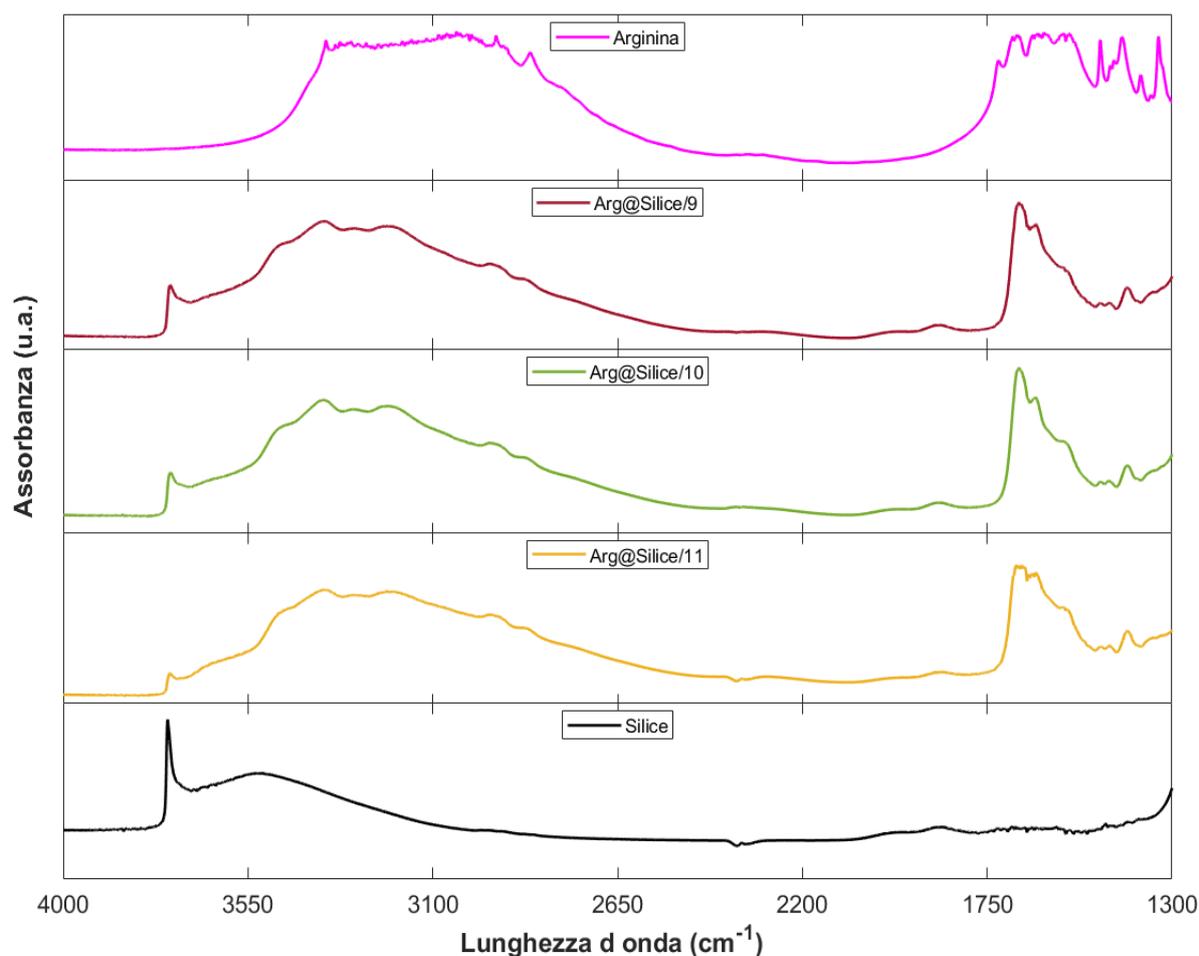


**Figura 5.9:** Spettri XRD a bassi angoli (sinistra) e ad alti angoli (destra) dei campioni impregnati a pH basici

Per gli spettri XRD a bassi angoli dei tre campioni Arg@Silice/9, Arg@Silice/10 e Arg@Silice/11 valgono le stesse considerazioni fatte nel paragrafo 5.2.1. In questo caso però le isoterme di adsorbimento (Figura 5.7) indicano una variazione della struttura mesoporosa interna per cui lo scattering mal definito potrebbe essere dovuto, oltre che alla presenza di arginina all'interno del carrier, anche alla perdita di ordine della struttura interna della silice mesoporosa.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR):

In Figura 5.10 vengono mostrati gli spettri FT-IR dei campioni impregnati in ambiente basico; valgono le stesse considerazioni fatte precedentemente per i campioni impregnati in ambiente acido in quanto la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier dà informazioni solo sulla presenza del principio attivo. Gli spettri dei tre campioni contenenti arginina hanno le stesse bande di assorbimento descritte nel paragrafo 5.2.1: il picco dei silanoli isolati a  $3745\text{ cm}^{-1}$ , una banda di assorbimento molto larga e ben strutturata tra  $3600$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  ed infine alcune bande intense sotto i  $1750\text{ cm}^{-1}$ .



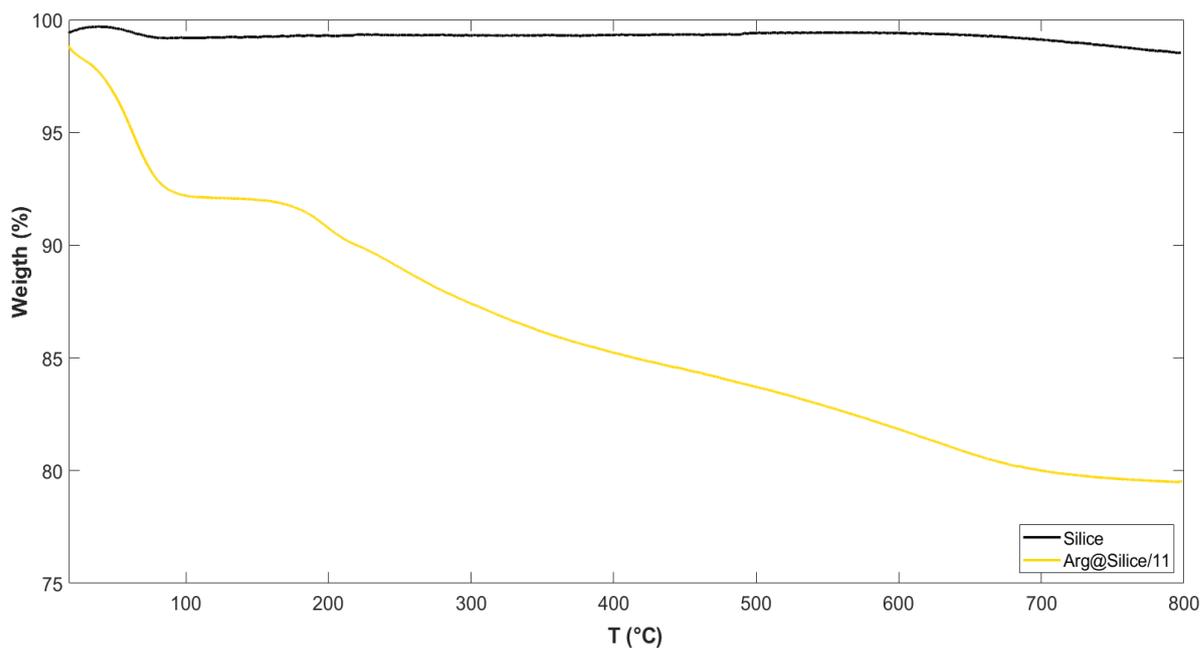
**Figura 5.10:** Spettro FT-IR dei campioni impregnati a pH basici

▪ Misura del contenuto di arginina nel campione Arg@Silice/11:

Il campione Arg@Silice/11 è il primo campione ottenuto per impregnazione e l'unico con una percentuale di arginina diversa, pari al 12% in peso. Per questo campione è stato possibile verificare la percentuale del principio attivo incorporata all'interno del supporto attraverso l'analisi termogravimetrica (TGA). Questa è un'analisi termica di tipo quantitativo che permette di valutare la perdita di peso di un campione in funzione della temperatura, attraverso un riscaldamento controllato. Il campione si inserisce all'interno di un crogiolo collegato ad una bilancia sensibile e il tutto viene posto all'interno di un forno.

Tale analisi è stata effettuata con lo strumento *TGA 92.16-18 SETARAM*. La prova è stata condotta utilizzando circa 8.5 mg di campione, in ambiente ossidante con temperature che vanno da 25 °C a 800°C (con un gradiente di 10 °C/min).

Il risultato di quest'analisi, mostrato in Figura 5.11, conferma la quantità di arginina presente all'interno del carrier. Si osservano due step di perdita di peso: la prima perdita pari al 6-7% tra 20 e 100 °C dovuta all'evaporazione dell'acqua fisisorbita sulla superficie del materiale; la seconda, pari a circa il 12%, si registra a temperature più elevate, nel range 200-800 °C ed è associabile alla perdita del principio attivo.

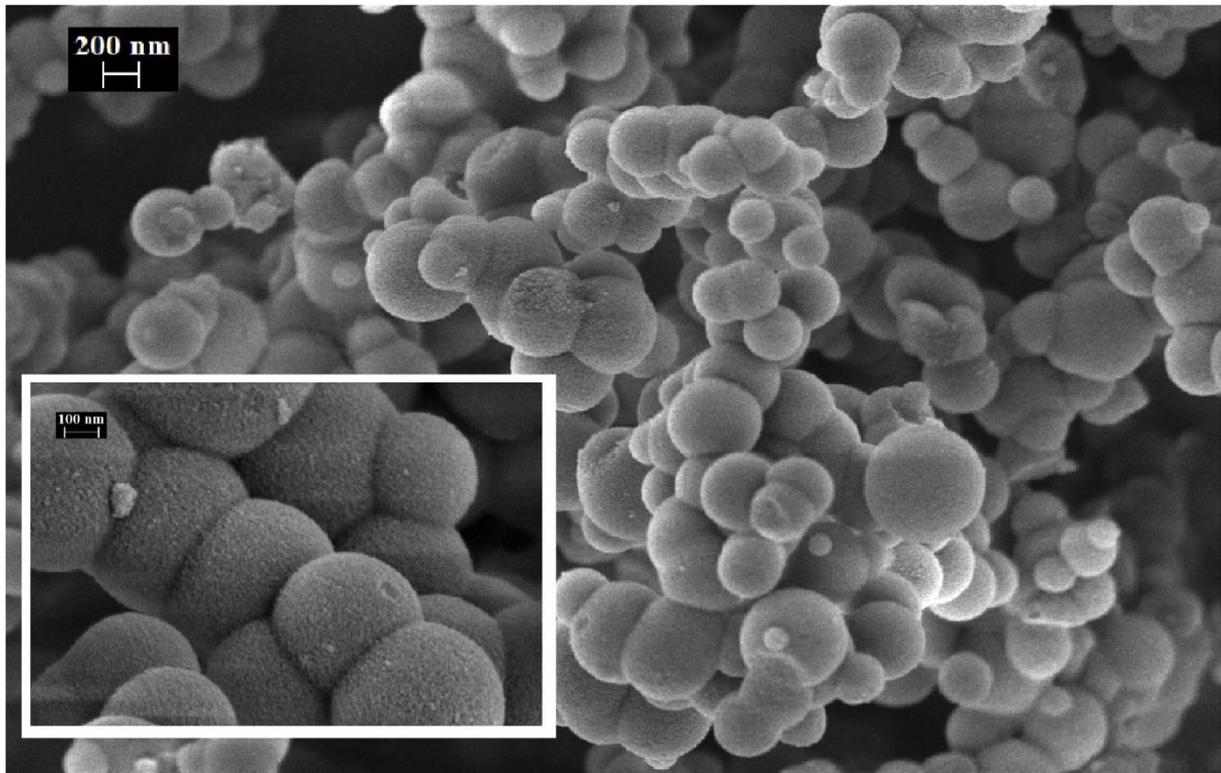


**Figura 5.11:** Curva termogravimetrica del campione Arg@Silice/11

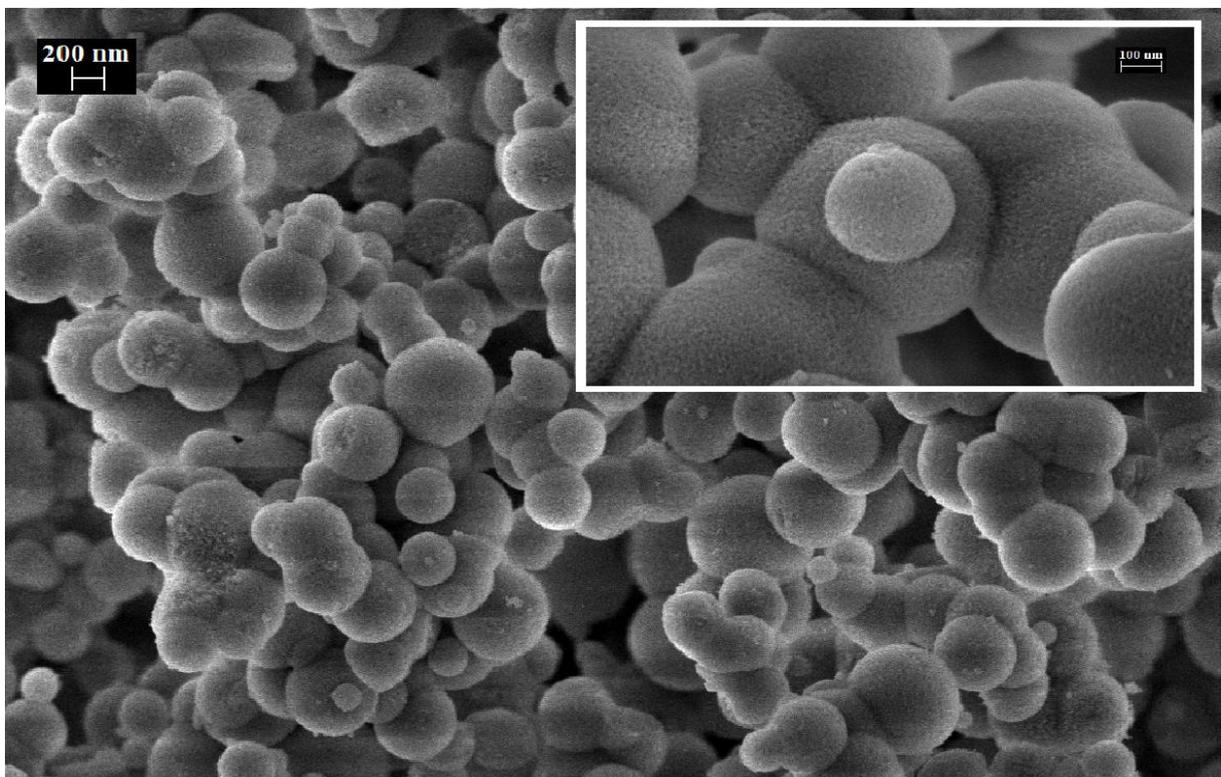
### 5.2.3 Confronto tra campioni impregnati con acqua

In questo paragrafo vengono mostrati i risultati dei due campioni impregnati con sola acqua per mettere in luce come anche il tempo di contatto tra silice e solvente influenzi la degradazione del supporto, dovuta perciò non solo alla variazione del pH e all'interazione silice-arginina come visto nei paragrafi precedenti.

- Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo (FESEM):



**Figura 5.12:** Morfologia del campione Arg@Silice/7 a 200 nm (ingrandimento 50.00 K X) con dettaglio a 100 nm (ingrandimento 250.00 K X)

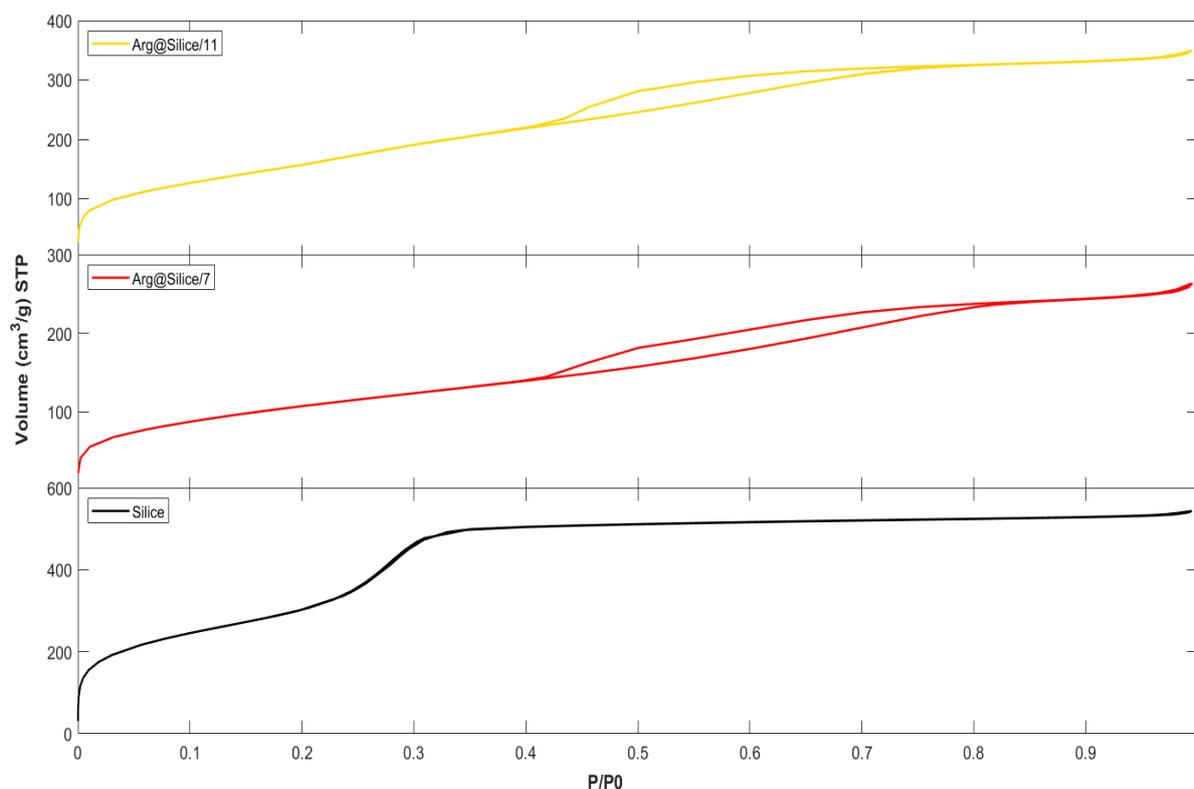


**Figura 5.13:** Morfologia del campione Arg@Silice/11 a 200 nm (ingrandimento 50.00 K X) con dettaglio a 100 nm (ingrandimento 250.00 K X)

Le Figure 5.12 e 5.13 mostrano rispettivamente la morfologia dei campioni Arg@Silice/7 e Arg@Silice/11: da questa prima analisi si può osservare una rugosità superficiale e quindi la degradazione del supporto, soprattutto se confrontata con la morfologia del campione Arg@Silice/5 (Figura 5.1) la quale invece mostra una superficie liscia e regolare, indice dell'integrità del supporto. Tuttavia, l'aspetto sferico delle particelle resta invariato e la loro dimensione media molto simile alla silice tal quale, rispettivamente pari a 440 nm e 470 nm circa per i campioni Arg@Silice/7 e Arg@Silice/11.

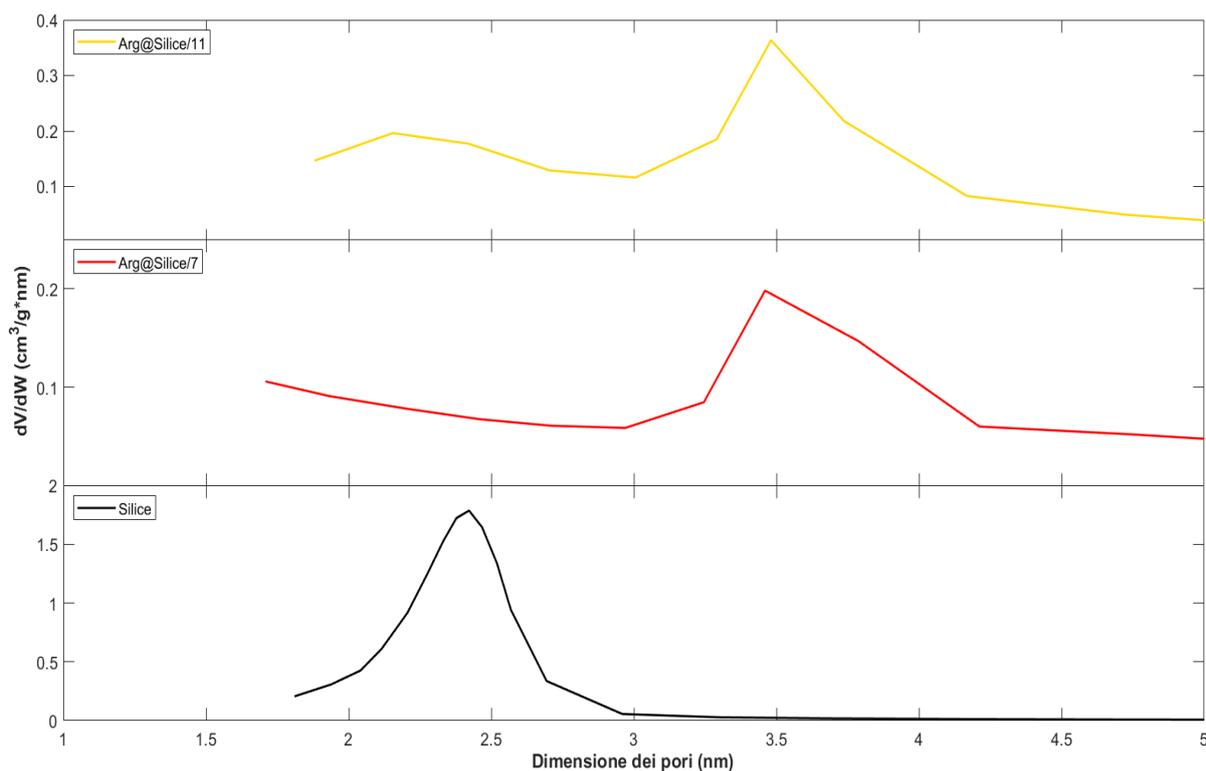
▪ Analisi di fisisorbimento di azoto:

Dal confronto delle isoterme dei campioni impregnati in acqua, mostrate in Figura 5.14, è evidente come sia il pH basico nel caso del campione Arg@Silice/11 che l'elevato tempo di contatto tra il supporto e l'acqua per il campione Arg@Silice/7 influenzino la degradazione della silice. Le due isoterme hanno una forma molto simile, compreso il coppia di isteresi che ha anche la stessa dimensione. Inoltre si osserva una variazione di forma rispetto all'isoterma di tipo IV della silice tal quale per cui è possibile che la struttura mesoporosa interna sia stata danneggiata [73].



**Figura 5.14:** Confronto isoterme di adsorbimento/desorbimento dei campioni impregnati con acqua

Dalla Figura 5.15 in cui è mostrata la distribuzione dei pori dei due campioni sopraccitati è possibile osservare come anche nel caso del campione Arg@Silice/7 si abbia la formazione di una nuova popolazione di pori di dimensioni maggiori, i cui valori vengono riportati in Tabella 5.4.



**Figura 5.15:** Confronto distribuzione dei pori dei campioni impregnati con acqua

La formazione della nuova popolazione di pori e la diminuzione dell'ordine della struttura mesoporosa interna si possono attribuire alla degradazione del carrier dovuta sia al pH basico di impregnazione [79] che al tempo di contatto tra solvente e silice di circa venti ore [78].

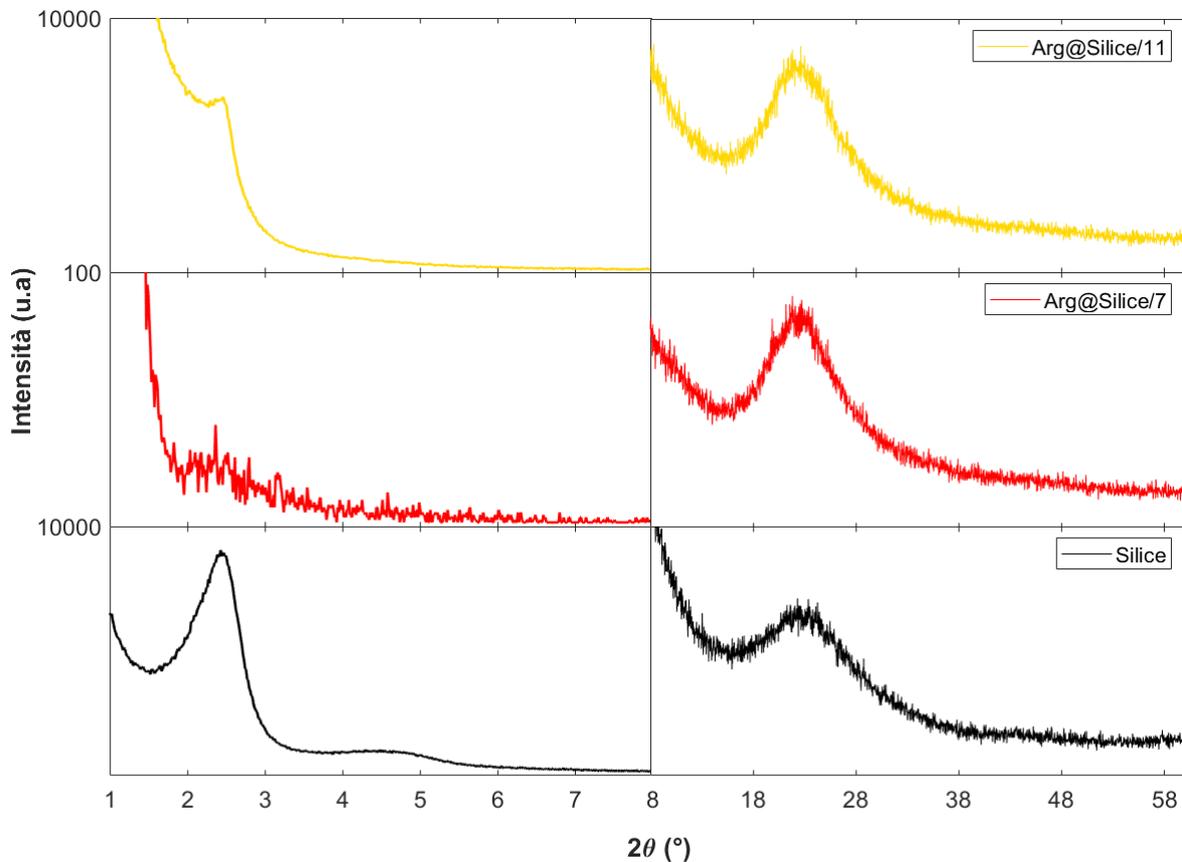
I valori di area superficiale e volume dei pori, riportati in Tabella 5.4, come nei casi precedenti diminuiscono.

**Tabella 5.4:** Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto

| <b>Campione</b> | <b>SSA<sub>BET</sub> (m<sup>2</sup>/g)</b> | <b>Volume pori (cm<sup>3</sup>/g)</b> | <b>Dimensione pori (nm)</b> |
|-----------------|--|---------------------------------------|-----------------------------|
| Silice          | 1143                                       | 0.82                                  | 2.4                         |
| Arg@silice/7    | 403  | 0.40                                  | 3.5                         |
| Arg@silice/11   | 623  | 0.5                                   | 3.5                         |

▪ Diffrazione a raggi X (XRD):

Nella Figura 5.16 sono mostrati gli spettri XRD dei due campioni impregnati con acqua. Anche in questo caso lo spettro XRD ad alti angoli non presenta picchi particolari tipici dell'arginina cristallina (Figura 5.4) e quindi essa è presente all'interno del supporto in forma amorfa.

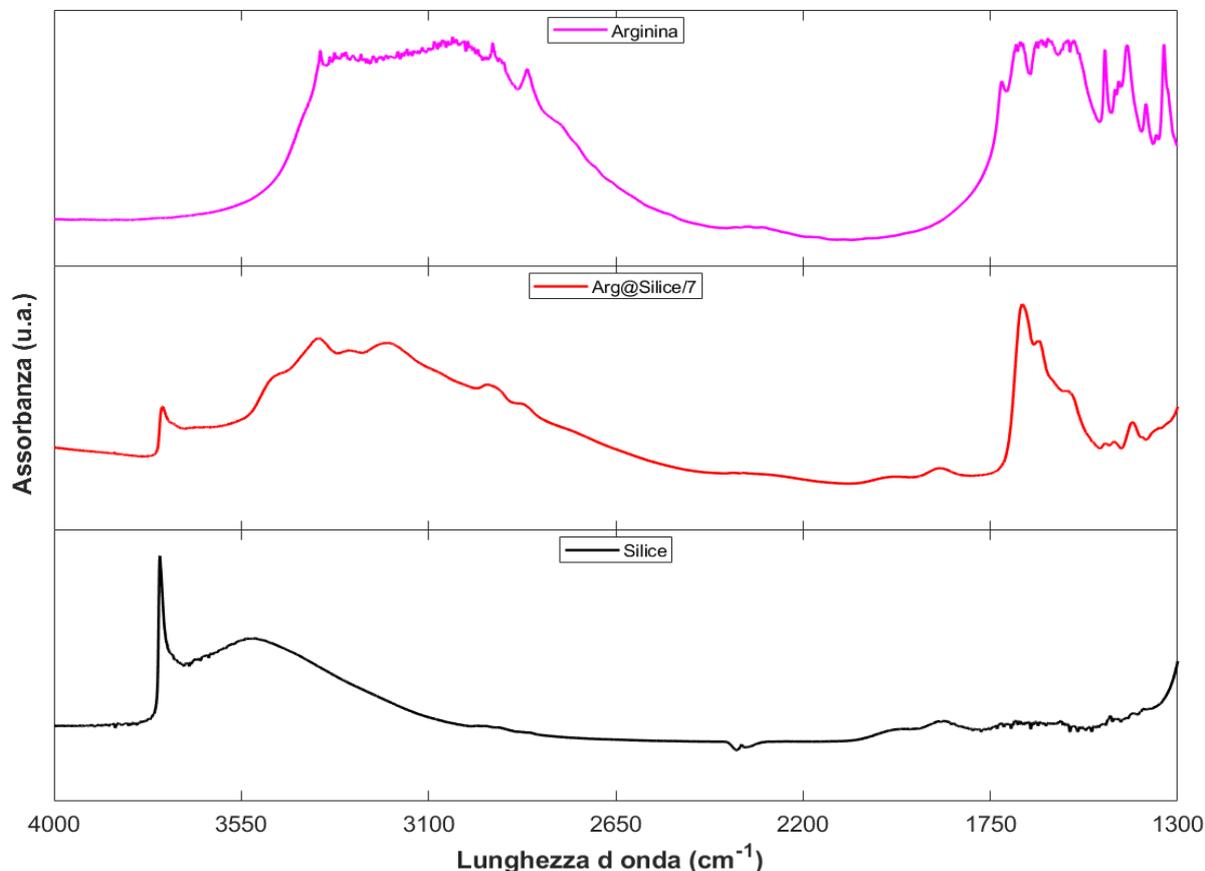


**Figura 5.16:** Confronto spettri XRD a bassi angoli (sinistra) e ad alti angoli (destra) dei campioni impregnati con acqua

Per l'analisi degli spettri XRD a bassi angoli valgono le considerazioni fatte nei due paragrafi precedenti. Dall'isoterma di adsorbimento in Figura 5.14 è osservabile la degradazione del supporto e quindi la modifica della sua struttura interna: questa potrebbe essere il motivo della perdita del primo picco, come detto per i campioni impregnati a pH basici.

- Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR):

In Figura 5.17 viene mostrato lo spettro FT-IR del campione impregnato con l'IWI multistep (Arg@Silice/7) e non è inserito il confronto con il campione Arg@Silice/11 impregnato in acqua già mostrato in Figura 5.10 in quanto quest'analisi ci dà solo informazioni sulla presenza o meno di arginina all'interno del supporto.



**Figura 5.17:** Spettro FT-IR del campione Arg@Silice/7

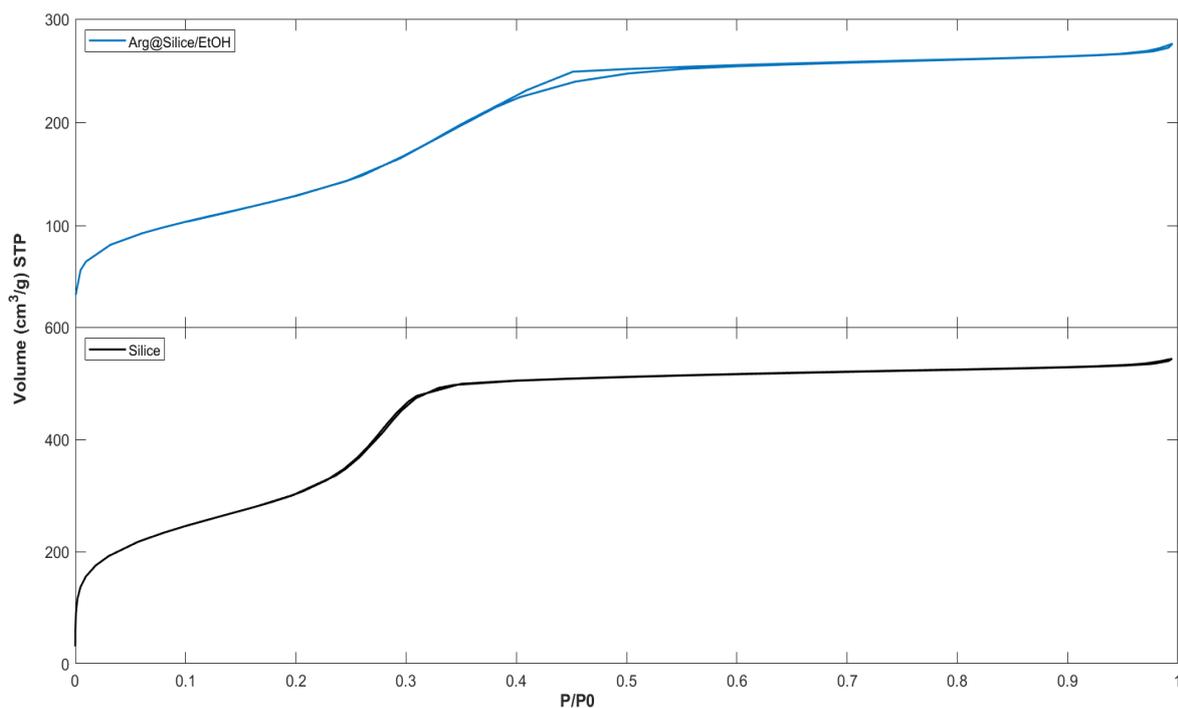
I risultati mostrati in Figura 5.17 confermano la presenza di arginina in quanto sono osservabili i picchi e le bande di assorbimento descritte precedentemente nei paragrafi 5.2.1 e 5.2.2.

#### 5.2.4 *Campione impregnato con soluzione di etanolo*

Il campione impregnato con soluzione di etanolo è stato a contatto con essa per circa dieci ore: dei 40 ml di etanolo utilizzati per disciogliere l'arginina una parte è evaporata durante gli step di impregnazione e in questo modo sono state necessarie solo dieci pipettate da 2-3 ml ciascuna per completare l'IWI multistep. In questo caso quindi gli effetti dell'interazione silice-arginina sono causati sia dall'interazione stessa che dall'elevato tempo di contatto tra supporto ed etanolo.

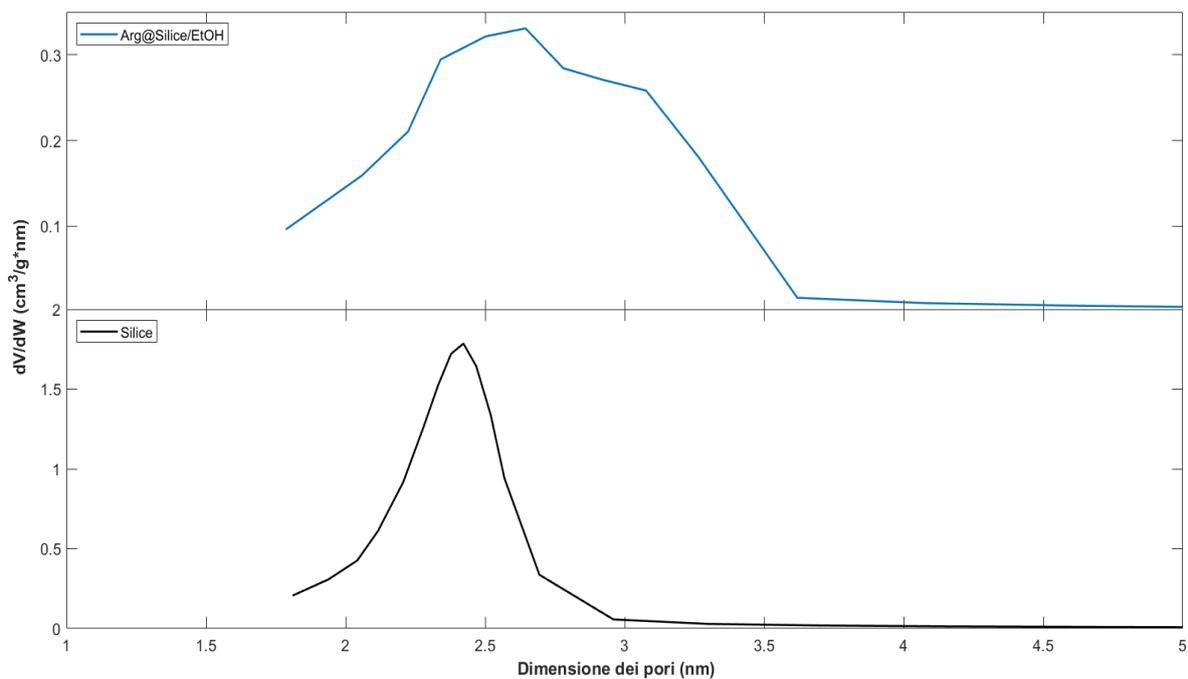
- Analisi di fisisorbimento di azoto:

In Figura 5.18 si osserva come l'isoterma di adsorbimento di azoto mantenga una forma molto simile a quella della silice tal quale ma a valori di volume di azoto adsorbito minore. Si osserva anche in piccolo cappio d'isteresi dovuto probabilmente ad una leggera degradazione del supporto.



**Figura 5.18:** Isotherme di adsorbimento/desorbimento del campione Arg@Silice/EtOH

I cambiamenti della silice sono visibili anche in Figura 5.19, distribuzione porosimetrica del campione Arg@Silice/EtOH: in essa si osserva infatti una distribuzione dei pori non più monomodale, come nella silice tal quale ma eterogenea. Sono visibili due popolazioni di pori, una avente dimensione media di circa 2.6 nm, presente in percentuale maggiore rispetto all'altra con dimensione media di 3.1 nm circa.



**Figura 5.19:** Distribuzione dei pori del campione Arg@Silice/EtOH

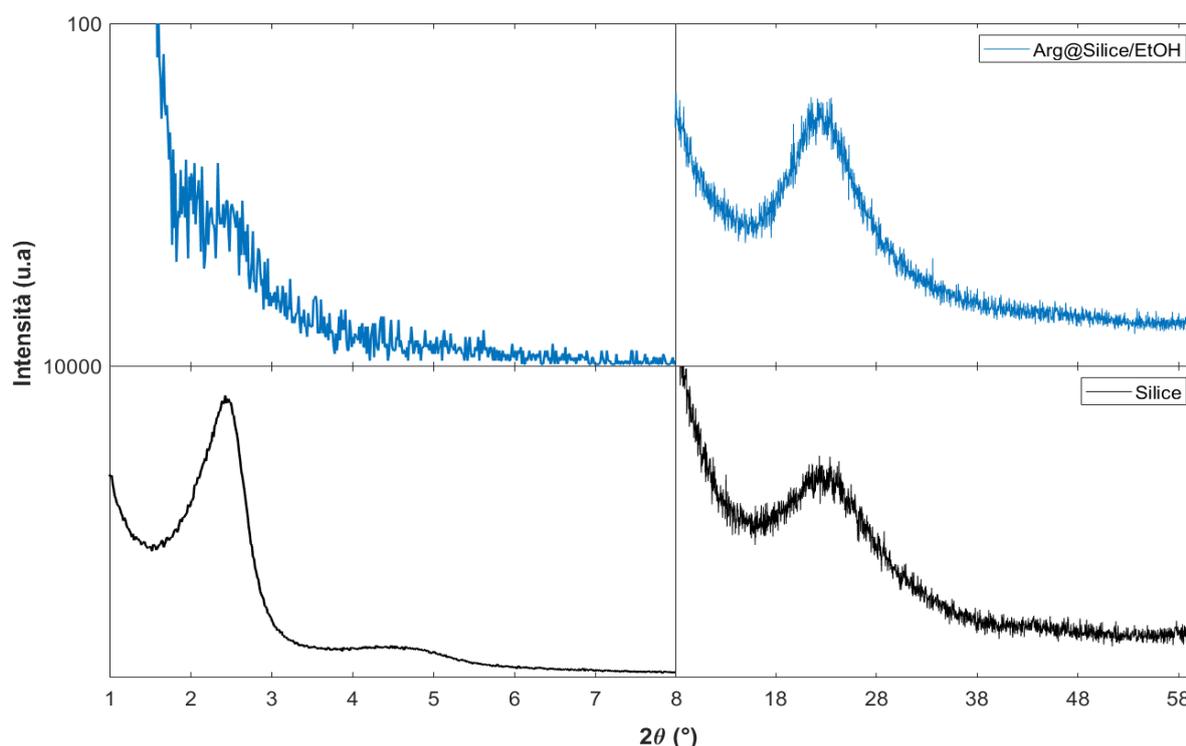
In Tabella 5.5 sono riportati i valori di area superficiale, volume dei pori, dimensione media dei pori. Come nei casi precedenti si ha la diminuzione dei primi due parametri e l'aumento del terzo, causati probabilmente da diversi fattori: la presenza del principio attivo all'interno dei pori, la degradazione che porta ad un aumento della dimensione media dei pori (Figura 5.19) o il fenomeno di swelling dovuto alla presenza di etanolo.

**Tabella 5.5:** Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto

| Campione        | SSA <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g) | Volume pori (cm <sup>3</sup> /g) | Dimensione pori (nm) |
|-----------------|--|----------------------------------|----------------------|
| Silice          | 1143                                   | 0.82                             | 2.42                 |
| Arg@silice/EtOH | 494                                    | 0.41                             | 2.65                 |

▪ Diffrazione a raggi X (XRD):

In Figura 5.20 vengono mostrati gli spettri XRD del campione Arg@Silice/EtOH. Lo spettro XRD ad alti angoli del campione non presenta picchi particolari e si mostra molto simile a tutti quelli visti finora per cui si ha la conferma che l'arginina sia stata incorporata nella sua fase amorfa.

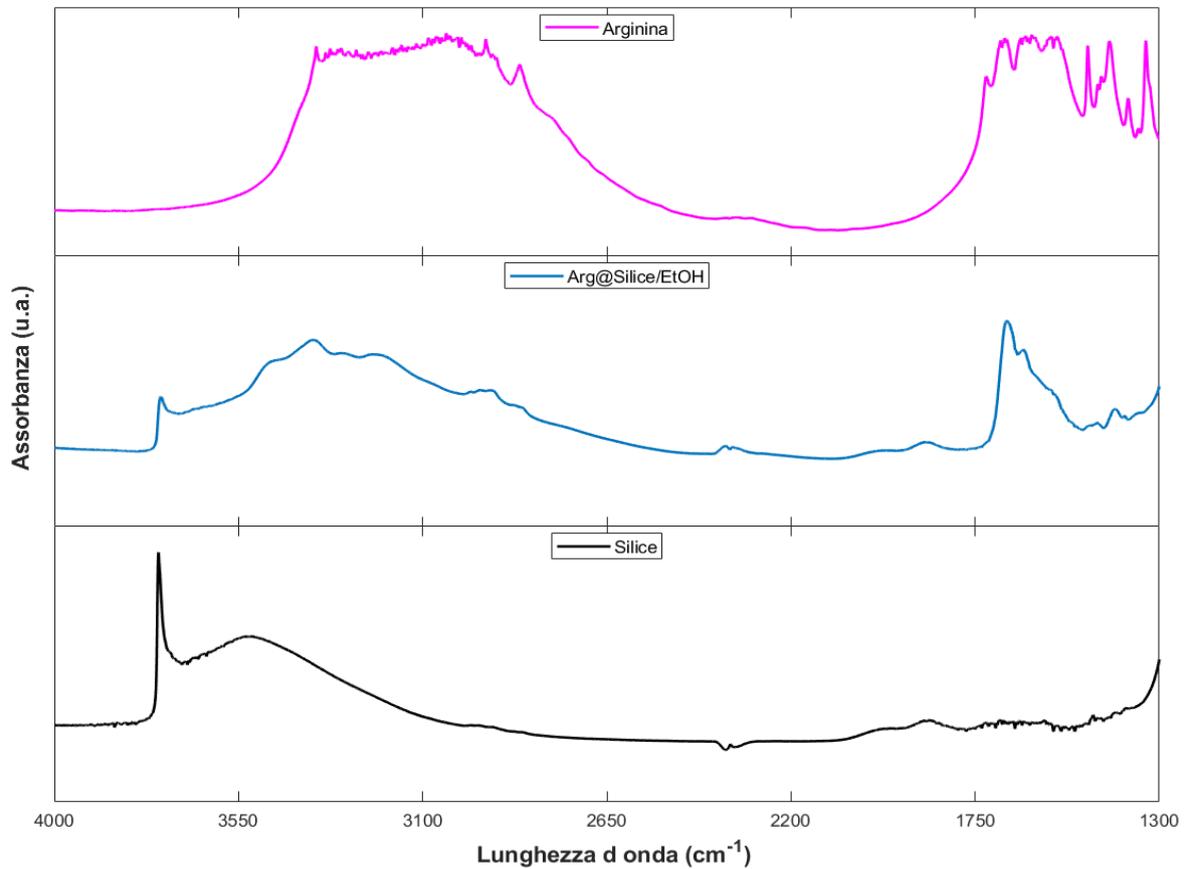


**Figura 5.20:** Spettri XRD a bassi angoli (sinistra) e ad alti angoli (destra) del campione Arg@Silice/EtOH

Lo spettro XRD a bassi angoli mostra uno scattering mal definito; valgono anche per quest'ultimo caso le considerazioni fatte precedentemente per gli altri campioni contenenti arginina.

▪ Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR):

Lo spettro FT-IR del campione Arg@Silice/EtOH è mostrato in Figura 5.21 e risulta molto simile a tutti quelli dei campioni contenenti l'arginina visti finora a conferma della presenza del principio attivo all'interno del supporto.



**Figura 5.21:** Spettro FT-IR del campione Arg@Silice/EtOH



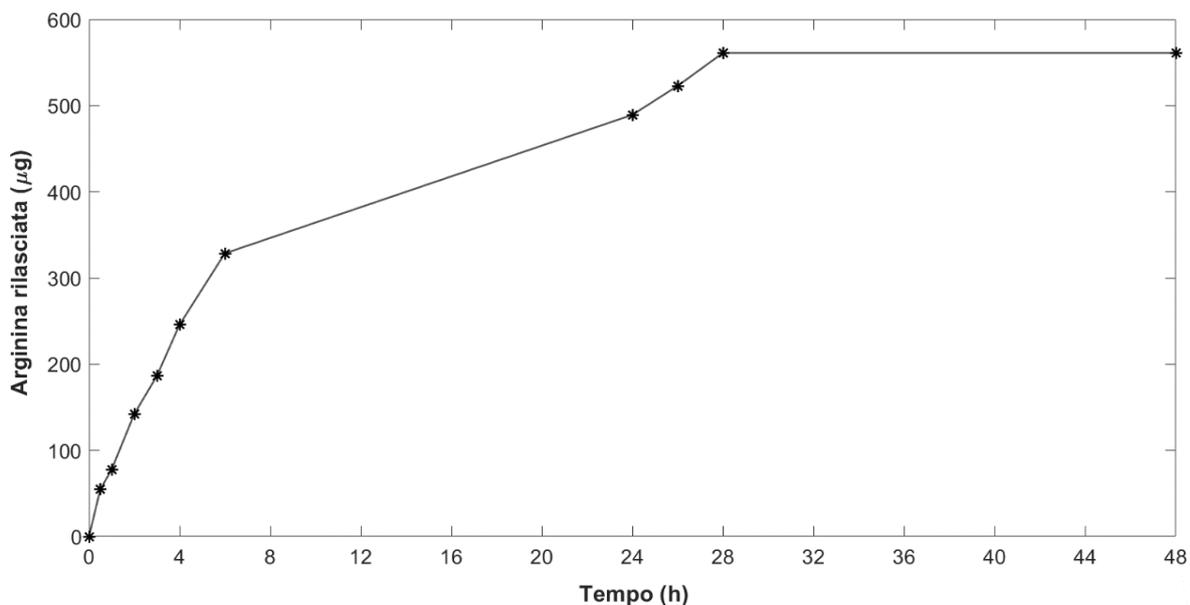
## 6 Rilascio

In questo lavoro di tesi è stato svolto un test di rilascio utilizzando la cella di Franz, metodo che simula le condizioni fisiologiche dell'epidermide, già descritto nel paragrafo 3.5. Il campione dal quale è stato fatto il test di rilascio è quello in cui l'arginina è stata incorporata a pH circa 1 (Arg@Silice/1) in quanto è uno di quelli che ha subito degradazione minore durante il processo di impregnazione. In Tabella 6.1 sono riportate le concentrazioni, le quantità in  $\mu\text{g}$  e la percentuale di arginina rilasciata. Questi valori sono stati calcolati a partire dall'assorbanza restituita dallo spettrofotometro delle soluzioni del rilascio ai diversi tempi, derivatizzate con la soluzione di ninidrina e grazie alla retta di taratura ottenuta in precedenza ( $y = 0.0241x - 0.0924$ ).

**Tabella 6.1:** Dati del test di rilascio di arginina da Arg@Silice/1

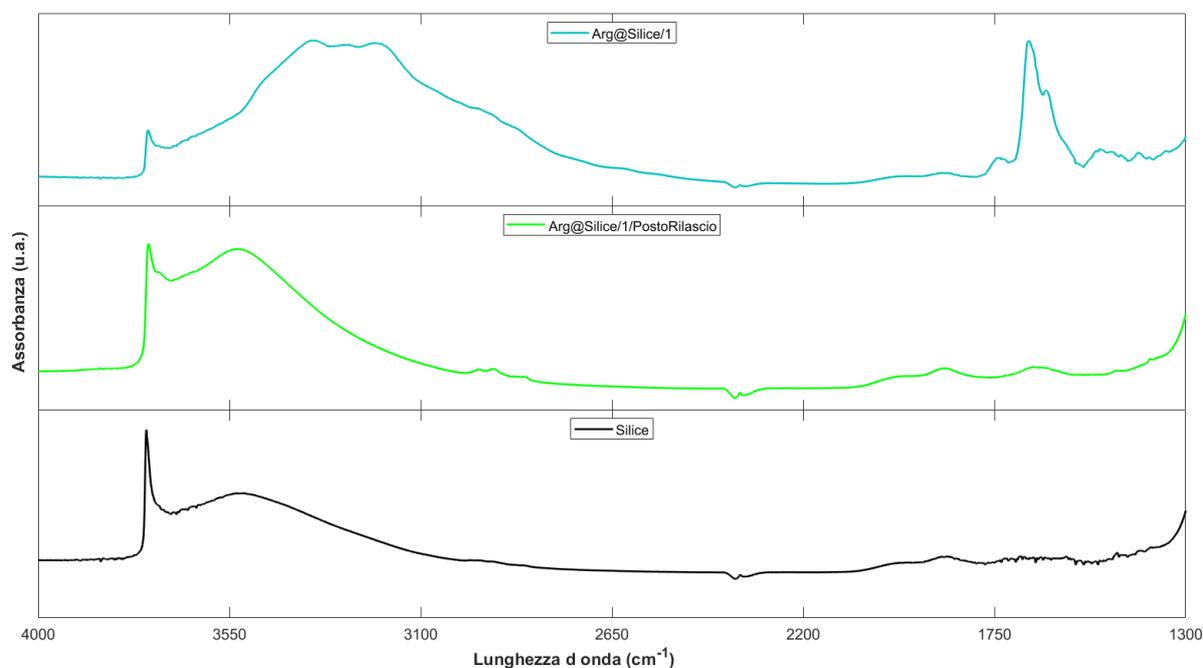
| <b>Tempo (h)</b> | <b>Concentrazione (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b> | <b>Quantità rilasciata (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | <b>Cumulata della quantità rilasciata (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | <b>Percentuale rilasciata (%)</b> |
|------------------|--|---|--|-----------------------------------|
| 0                | 0  | 0   | 0  | 0                                 |
| 0.5              | 13.65  | 54.61   | 54.61  | 3.03                              |
| 1                | 5.77   | 23.07   | 77.68  | 4.32                              |
| 2                | 16.09  | 64.37   | 142.05   | 7.89                              |
| 3                | 11.07  | 44.28   | 186.34   | 10.35                             |
| 4                | 14.85  | 59.38   | 245.72   | 13.65                             |
| 6                | 20.69  | 82.75   | 328.47   | 18.25                             |
| 24               | 40.20  | 160.80  | 489.26   | 27.18                             |
| 26               | 8.40   | 33.59   | 522.86   | 29.05                             |
| 28               | 9.58   | 38.31   | 561.16   | 31.18                             |
| 48               | 0  | 0   | 561.16   | 31.18                             |

La percentuale si riferisce al totale di arginina incorporato nella silice (9%) che nei 20 mg di polvere utilizzata per il rilascio corrisponde a 1800  $\mu\text{g}$  totali di arginina. La curva di rilascio viene costruita con la quantità di principio attivo rilasciata in  $\mu\text{g}$  ed è riportata in Figura 6.1.



**Figura 6.1:** Curva di rilascio di arginina da Arg@Silice/1

Concluso il rilascio, il campione è stato fatto essiccare e su di esso è stata effettuata un'analisi mediante spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) in quanto la reazione di derivatizzazione con la ninidrina potrebbe avere un'efficienza minore del 100% e quindi la curva di rilascio potrebbe sottostimare la quantità di arginina rilasciata. Lo spettro FT-IR in Figura 6.2 ci dà informazioni sulla presenza o meno dell'arginina: si può notare come il campione Arg@Silice/1/PostRilascio non mostra particolari modi dell'arginina, la quale sembra quindi essere assente o presente in tracce.



**Figura 6.2:** Spettro FT-IR del campione Arg@Silice/1/PostRilascio

Da quest'ultima analisi si può quindi dedurre che nel rilascio la quantità di arginina è maggiore rispetto a quella che abbiamo potuto osservare con l'analisi allo spettrofotometro UV-visibile. Il suo andamento però è confrontabile con quanto visto in letteratura ed il supporto è in grado di rilasciare l'arginina fino a un tempo di ventotto ore circa.



## 7 Conclusione e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi è stato realizzato e studiato un sistema di immagazzinamento e rilascio di arginina, in vista di applicazioni topiche per migliorare ed accelerare il processo di guarigione di una ferita. Il supporto scelto è una silice mesoporosa di sintesi della tipologia *Mobil Crystalline Materials*, (la sottoclasse MCM-41). La MCM41 è una silice amorfa caratterizzata da una elevata area superficiale ed un elevato volume dei pori (chiamati mesopori perché aventi solitamente una dimensione tra i 2 e i 20 nm). Per le proprietà appena citate questo materiale ha ottime capacità di veicolare farmaci; inoltre, la silice amorfa di per sé è capace di rilasciare acido ortosilicico, il quale favorisce la cicatrizzazione.

La sintesi via *sol-gel* avviene in ambiente basico, l'agente templante è il bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB) e il precursore di silice utilizzato è l'ortosilicato tetraetile (TEOS).

Dopo la sintesi il campione ottenuto è stato caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico e morfologico attraverso diverse tecniche: la microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM), l'analisi di fisisorbimento di azoto, la diffrazione a raggi X (XRD) e la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR).

Dalle immagini FESEM è possibile osservare che le particelle di silice presentano una morfologia sferica, con dimensioni comprese tra i 200 e gli 800 nm, aventi un diametro medio di circa 466 nm. Gli spettri XRD a bassi angoli mostrano il picco principale e altri più deboli e mal definiti, evidenziando così una struttura della silice meno ordinata rispetto ad una MCM-41 tradizionale; gli spettri XRD ad alti angoli confermano la struttura amorfa della silice. Dall'analisi di fisisorbimento di azoto si ottengono un'isoterma di adsorbimento/desorbimento di tipo IV tipica, secondo la classificazione IUPAC, dei materiali mesoporosi e una distribuzione dei pori monomodale con una dimensione media di 2.4 nm.

In un secondo momento l'arginina è stata introdotta all'interno del carrier mediante la tecnica *Incipient Wetness Impregnation* (IWI). Questa procedura risulta essere vantaggiosa in quanto si ha la possibilità di conoscere la quantità di farmaco incorporata, può essere inoltre condotta a temperatura ambiente e il farmaco non è esposto ad ambienti chimici che potrebbero danneggiarlo. Sono state eseguite diverse impregnazioni in modo da studiare l'effetto del pH della soluzione utilizzata per l'impregnazione, della quantità di soluzione, e del tempo di impregnazione sulle proprietà del sistema finale. Sono stati così ottenuti sette campioni, di cui le condizioni di impregnazione sono riassunte nella tabella sotto riportata.

Tabella riassuntiva dei campioni preparati

| Campione      | Solvente      | pH | Tempo di contatto | Evidenze di degradazione |
|---------------|---------------|----|-------------------|--------------------------|
| Arg@Silice/1  | Acqua (+ HCl) | 1  | 1 ora             | No                       |
| Arg@Silice/5  | Acqua (+ HCl) | 5  | 1 ora             | No                       |
| Arg@Silice/9  | Acqua (+ HCl) | 9  | 1 ora             | Si                       |
| Arg@Silice/10 | Acqua (+ HCl) | 10 | 1 ora             | Si                       |
| Arg@Silice/11 | Acqua         | 11 | 1 ora             | Si                       |

|                 |         |   |        |    |
|-----------------|---------|---|--------|----|
| Arg@Silice/7    | Acqua   | 7 | 20 ore | Si |
| Arg@Silice/EtOH | Etanolo | 7 | 10 ore | Si |

I dati raccolti, in particolare le isoterme di adsorbimento e le analisi al FESEM, hanno mostrato che i campioni impregnati in ambiente basico subiscono una variazione della porosità, imputabile a una degradazione della mesostruttura e alla parziale dissoluzione della silice. Evidenze analoghe si osservano per lunghi tempi di impregnazione. Il carrier risulta stabile all'impregnazione in ambiente acido per tempi brevi (1 ora).

Per verificare se il supporto avesse la capacità di rilasciare l'arginina, è stato eseguito un test di rilascio con la cella di Franz, generalmente utilizzata per simulare rilasci in applicazioni topiche. Per misurare la concentrazione dell'arginina rilasciata è stato necessario procedere con la sua derivatizzazione con una soluzione di ninidrina. Questo passaggio è necessario in quanto l'arginina non è visibile allo spettrofotometro UV-visibile: l'aminoacido reagendo con la ninidrina crea un composto di color viola chiamato porpora di Ruhemann (RP), che presenta un picco di assorbimento a circa 570 nm. I risultati ottenuti hanno mostrato la capacità della carrier di rilasciare il principio attivo fino a ventotto ore circa.

In futuro sarebbe interessante aumentare la quantità di arginina incorporata nel supporto e studiare l'interazione silice-arginina, per comprendere al meglio quale sia il fattore che porti alla degradazione del carrier e per ottimizzare il sistema di immagazzinamento e rilascio dell'arginina dalla silice.





## BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Witharana and J. Wanigasekara, “Drug Delivery Systems : A New Frontier in Nanotechnology,” pp. 11–14, 2017.
- [2] F. Farjadian, A. Roointan, S. Mohammadi-Samani, and M. Hosseini, “Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment,” *Chem. Eng. J.*, vol. 359, no. November 2018, pp. 684–705, 2019, doi: 10.1016/j.cej.2018.11.156.
- [3] E. Juère and F. Kleitz, “On the nanopore confinement of therapeutic drugs into mesoporous silica materials and its implications,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 270, no. February, pp. 109–119, 2018, doi: 10.1016/j.micromeso.2018.04.031.
- [4] P. Solanki and A. Patel, “In vitro release of l-arginine and cysteine from MCM-48: a study on effect of size of active biomolecules on release rate,” *J. Porous Mater.*, vol. 25, no. 5, pp. 1489–1498, 2018, doi: 10.1007/s10934-018-0561-z.
- [5] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, and S. Garg, “Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–49, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030118.
- [6] S. Quignard, T. Coradin, J. J. Powell, and R. Jugdaohsingh, “Silica nanoparticles as sources of silicic acid favoring wound healing in vitro,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 155, pp. 530–537, 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.049.
- [7] F. Arriagada, S. Nonell, and J. Morales, “Silica-based nanosystems for therapeutic applications in the skin,” *Nanomedicine*, vol. 14, no. 16, pp. 2243–2267, 2019, doi: 10.2217/nmm-2019-0052.
- [8] Y. Cheng *et al.*, “Hierarchical Acceleration of Wound Healing through Intelligent Nanosystem to Promote Multiple Stages,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, no. 37, pp. 33725–33733, 2019, doi: 10.1021/acsami.9b13267.
- [9] M. P. McRae, “Therapeutic Benefits of L-Arginine: An Umbrella Review of Meta-analyses,” *J. Chiropr. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 184–189, 2016, doi: 10.1016/j.jcm.2016.06.002.
- [10] Y. Matsumoto and Y. Kuroyanagi, “Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 21, no. 6–7, pp. 715–726, 2010, doi: 10.1163/156856209X435844.
- [11] H. P. Shi, S. M. Wang, G. X. Zhang, Y. J. Zhang, and A. Barbul, “Supplemental l-arginine enhances wound healing following trauma/hemorrhagic shock,” *Wound Repair Regen.*, vol. 15, no. 1, pp. 66–70, 2007, doi: 10.1111/j.1524-475X.2006.00186.x.
- [12] M. E. Aljghami, S. Saboor, and S. Amini-Nik, “Emerging Innovative Wound Dressings,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 47, no. 3, pp. 659–675, 2019, doi: 10.1007/s10439-018-02186-w.
- [13] S. Saghazadeh *et al.*, “Drug delivery systems and materials for wound healing applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 127, no. 402, pp. 138–166, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.04.008.
- [14] E. S. Selvaraj Dhivya, Viswanadha Vijaya Padma, “Wound dressings – a review,” *GSTF Int. J. Chem. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 47–68, 2014, doi: 10.7603/s40.
- [15] C. Dunnill *et al.*, “Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process,” *Int. Wound J.*, vol. 14, no. 1, pp. 89–96, 2017, doi: 10.1111/iwj.12557.
- [16] S. K. Nethi, S. Das, C. R. Patra, and S. Mukherjee, “Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications,” *Biomater. Sci.*, vol. 7, no. 7, pp. 2652–

- 2674, 2019, doi: 10.1039/c9bm00423h.
- [17] G. Han and R. Ceilley, “Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments,” *Adv. Ther.*, vol. 34, no. 3, pp. 599–610, 2017, doi: 10.1007/s12325-017-0478-y.
- [18] F. Thiruvoth, D. Mohapatra, D. Sivakumar, R. Chittoria, and V. Nandhagopal, “Current concepts in the physiology of adult wound healing,” *Plast. Aesthetic Res.*, vol. 2, no. 5, p. 250, 2015, doi: 10.4103/2347-9264.158851.
- [19] B. Palmieri, M. Vadalà, and C. Laurino, “Nutrition in wound healing: Investigation of the molecular mechanisms, a narrative review,” *J. Wound Care*, vol. 28, no. 10, pp. 683–693, 2019, doi: 10.12968/jowc.2019.28.10.683.
- [20] W. Wang, K. J. Lu, C. H. Yu, Q. L. Huang, and Y. Z. Du, “Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1186/s12951-019-0514-y.
- [21] K. L. Schneider and N. Yahia, “Effectiveness of Arginine Supplementation on Wound Healing in Older Adults in Acute and Chronic Settings: A Systematic Review,” *Adv. Skin Wound Care*, vol. 32, no. 10, pp. 457–462, 2019, doi: 10.1097/01.ASW.0000579700.20404.56.
- [22] I. B. J. G. Debats, T. G. A. M. Wolfs, T. Gotoh, J. P. M. Cleutjens, C. J. Peutz-Kootstra, and R. R. W. J. van der Hulst, “Role of arginine in superficial wound healing in man,” *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, vol. 21, no. 3–4, pp. 175–183, 2009, doi: 10.1016/j.niox.2009.07.006.
- [23] J. K. Stechmiller, B. Childress, and L. Cowan, “Arginine supplementation and wound healing,” *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 20, no. 1, pp. 52–61, 2005, doi: 10.1177/011542650502000152.
- [24] D. Davani-Davari, I. Karimzadeh, M. M. Sagheb, and H. Khalili, “The Renal Safety of L-Carnitine, L-Arginine, and Glutamine in Athletes and Bodybuilders,” *J. Ren. Nutr.*, vol. 29, no. 3, pp. 221–234, 2019, doi: 10.1053/j.jrn.2018.08.014.
- [25] E. Sudar-Milovanovic *et al.*, “Benefits of L-Arginine on Cardiovascular System,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 16, no. 2, pp. 94–103, 2015, doi: 10.2174/1389557515666151016125826.
- [26] B. Review, “BRIEF REVIEW AMINO ACIDS , ARGINASE AND NITRIC OXIDE IN VASCULAR HEALTH Ngan Ngoc Huynh and Jaye Chin-Dusting,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, no. July 2005, pp. 1–8, 2006.
- [27] W. Mu *et al.*, “The optimal arginine requirement in diets for juvenile humpback grouper, *Cromileptes altivelis*,” *Aquaculture*, vol. 514, no. June 2019, 2020, doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734509.
- [28] M. Wang, Y. Guo, P. X. Ma, and B. Lei, “Photoluminescent arginine-functionalized polycitrate with enhanced cell activity and hemocompatibility for live cell bioimaging,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 106, no. 12, pp. 3175–3184, 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36512.
- [29] M. de Andrade Bernal Fagiani *et al.*, “L-arginine minimizes immunosuppression and prothrombin time and enhances the genotoxicity of 5-fluorouracil in rats,” *Nutrition*, vol. 66, no. 2019, pp. 94–100, 2019, doi: 10.1016/j.nut.2019.04.012.
- [30] S. L. da Silva *et al.*, “Application of arginine and histidine to improve the technological and sensory properties of low-fat and low-sodium bologna-type sausages produced with high levels of KCl,” *Meat Sci.*, vol. 159, no. May 2019, p. 107939, 2020, doi: 10.1016/j.meatsci.2019.107939.
- [31] H. P. Shi, D. Most, D. T. Efron, M. B. Witte, and A. Barbul, “Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats,” *Wound Repair Regen.*, vol. 11, no. 3, pp. 198–203, 2003, doi: 10.1046/j.1524-475X.2003.11308.x.

- [32] S. Zou, X. Wang, P. Liu, C. Ke, and S. Xu, "Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 118, no. July, p. 109210, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109210.
- [33] M. B. Witte and A. Barbul, "Arginine physiology and its implication for wound healing," *Wound Repair Regen.*, vol. 11, no. 6, pp. 419–423, 2003, doi: 10.1046/j.1524-475X.2003.11605.x.
- [34] H. Zare-Zardini, A. Taheri-Kafrani, A. Amiri, and A. K. Bordbar, "New generation of drug delivery systems based on ginsenoside Rh2-, Lysine- and Arginine-treated highly porous graphene for improving anticancer activity," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18938-y.
- [35] "<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>."
- [36] "<https://www.drugbank.ca/>."
- [37] Q. Gao *et al.*, "Amino acid adsorption on mesoporous materials: Influence of types of amino acids, modification of mesoporous materials, and solution conditions," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 7, pp. 2261–2267, 2008, doi: 10.1021/jp0763580.
- [38] K. Park, "Controlled drug delivery systems: Past forward and future back," *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 3–8, 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.054.
- [39] J. K. Patra *et al.*, "Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects," *J. Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 1–33, 2018, doi: 10.1186/s12951-018-0392-8.
- [40] M. Rawal, A. Singh, and M. M. Amiji, "Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development," *Pharm. Res.*, vol. 36, no. 11, pp. 1–20, 2019, doi: 10.1007/s11095-019-2692-6.
- [41] M. Drahansky *et al.*, "Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery," *Intech*, vol. i, no. tourism, p. 13, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- [42] Y. Zhang *et al.*, "Advances in curcumin-loaded nanopreparations: improving bioavailability and overcoming inherent drawbacks," *J. Drug Target.*, vol. 2330, 2019, doi: 10.1080/1061186X.2019.1572158.
- [43] D. D. Shaw and L. F. Pease, "Release of pharmaceutical cocktails from small polymeric micelles," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 207, pp. 799–804, 2019, doi: 10.1016/j.ces.2019.05.052.
- [44] G. Noh *et al.*, "Development and Evaluation of a Water Soluble Fluorometholone Eye Drop Formulation Employing Polymeric Micelle," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, pp. 1–16, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040208.
- [45] A. Gomes, C. Teixeira, R. Ferraz, C. Prudencio, and P. Gomes, "Wound-healing peptides for treatment of chronic diabetic foot ulcers and other infected skin injuries," *Molecules*, vol. 22, no. 10, pp. 1–18, 2017, doi: 10.3390/molecules22101743.
- [46] M. Marcinkowska, M. Stanczyk, A. Janaszewska, E. Sobierajska, A. Chworos, and B. Klajnert-Maculewicz, "Multicomponent Conjugates of Anticancer Drugs and Monoclonal Antibody with PAMAM Dendrimers to Increase Efficacy of HER-2 Positive Breast Cancer Therapy," *Pharm. Res.*, vol. 36, no. 11, 2019, doi: 10.1007/s11095-019-2683-7.
- [47] S. K. Upadhaya, D. R. Swanson, D. A. Tomalia, and A. Sharma, "Analysis of polyamidoamine dendrimers by isoelectric focusing," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 2, pp. 455–458, 2014, doi: 10.1007/s00216-013-7458-0.
- [48] A. K. Jain and S. Thareja, "In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery," *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 47, no. 1, pp. 524–539, 2019, doi: 10.1080/21691401.2018.1561457.
- [49] H. I. Labouta and M. Schneider, "Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: Current status and critical review," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 39–54, 2013, doi: 10.1016/j.nano.2012.04.004.

- [50] W. Zhu, J. Zhao, Q. Chen, and Z. Liu, “Nanoscale metal-organic frameworks and coordination polymers as theranostic platforms for cancer treatment,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 398, p. 113009, 2019, doi: 10.1016/j.ccr.2019.07.006.
- [51] Y. Hao, X. Zhou, R. Li, Z. Song, and Y. Min, “Advances of functional nanomaterials for cancer immunotherapeutic applications,” vol. 2, no. April, pp. 1–25, 2019, doi: 10.1002/wnan.1574.
- [52] S. Bagheri *et al.*, “Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. sup1, pp. 462–471, 2018, doi: 10.1080/21691401.2018.1430585.
- [53] D. Liu and Y. Guang Bi, “Controllable fabrication of hollow TiO<sub>2</sub> spheres as sustained release drug carrier,” *Adv. Powder Technol.*, vol. 30, no. 10, pp. 2169–2177, 2019, doi: 10.1016/j.apt.2019.06.032.
- [54] S. S. Nasr, M. M. A. Nasra, H. A. Hazzah, and O. Y. Abdallah, “Mesoporous silica nanoparticles, a safe option for silymarin delivery: preparation, characterization, and in vivo evaluation,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, pp. 968–979, 2019, doi: 10.1007/s13346-019-00640-3.
- [55] A. Maleki, H. Kettiger, A. Schoubben, J. M. Rosenholm, V. Ambrogi, and M. Hamidi, “Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs,” *J. Control. Release*, vol. 262, no. June, pp. 329–347, 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.047.
- [56] Z. A. Allothman, “A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials,” *Materials (Basel)*, vol. 5, no. 12, pp. 2874–2902, 2012, doi: 10.3390/ma5122874.
- [57] E. M. Rivera-Muñoz and R. Huirache-Acuña, “Sol Gel-derived SBA-16 mesoporous material,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 9, pp. 3069–3086, 2010, doi: 10.3390/ijms11093069.
- [58] A. Gignone, “Ordered Mesoporous Silica for Drug Delivery in Topical Applications,” no. December, p. 137, 2016, doi: 10.6092/polito/porto/2652565.
- [59] D. Psimadas, P. Georgoulas, V. Valotassiou, and G. Loudos, “Mesoporous Silicon in Drug Delivery Applications,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 2271–2280, 2012, doi: 10.1002/jps.
- [60] “<https://alfatest.it/tecniche/fisisorbimento>.”
- [61] M. Muttakin, S. Mitra, K. Thu, K. Ito, and B. B. Saha, “Theoretical framework to evaluate minimum desorption temperature for IUPAC classified adsorption isotherms,” *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 122, no. January, pp. 795–805, 2018, doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2018.01.107.
- [62] M. D. Donohue and G. L. Aranovich, “Classification of Gibbs adsorption isotherms,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 76–77, pp. 137–152, Jul. 1998, doi: 10.1016/S0001-8686(98)00044-X.
- [63] Micromeritics Instrument Corporation, “Gas Adsorption Theory Poster,” p. 42901, 2019.
- [64] N. Mazzeo, “Silici mesoporese come carrier di idrocortisone,” *Torino, Politec. DI*, 2018.
- [65] Uniroma, “Spettroscopia FT-IR,” pp. 1–2.
- [66] M. Di Foggia, “Studio di biomateriali usati come scaffold per Tissue Engineering e loro caratterizzazione con tecniche spettroscopiche vibrazionali e di analisi termica,” no. May 2009, 2014.
- [67] D. J. McCaldin, “The chemistry of ninhydrin,” *Chem. Rev.*, vol. 60, no. 1, pp. 39–51, 1960, doi: 10.1021/cr60203a004.
- [68] Huimin Sui, Lei Chen, Xiao Xia Han, Xiaolei Zhang, Xiaolei Wang, and Bing Zhao, “Quantitative determination of total amino acids based on SERS and ninhydrin derivatization,” *Anal. Sci.*, vol. 33, no. January, pp. 53–57, 2017.
- [69] C. H. Salamanca, A. Barrera-Ocampo, J. C. Lasso, N. Camacho, and C. J. Yarce, “Franz

- diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–10, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030148.
- [70] J. E. Seo, S. Kim, and B. H. Kim, “In vitro skin absorption tests of three types of parabens using a Franz diffusion cell,” *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, vol. 27, no. 3, pp. 320–325, 2017, doi: 10.1038/jes.2016.33.
- [71] J. Ambati *et al.*, “Engineered silica nanocarriers as a high-payload delivery vehicle for antioxidant enzymes,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 6, pp. 2096–2103, 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.02.012.
- [72] S. Liu *et al.*, “The Influence of the Alcohol Concentration on the Structural Ordering of Mesoporous Silica: Cosurfactant versus Cosolvent,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 38, pp. 10405–10411, 2003, doi: 10.1021/jp034410w.
- [73] R. Mortera, S. Fiorilli, E. Garrone, E. Verné, and B. Onida, “Pores occlusion in MCM-41 spheres immersed in SBF and the effect on ibuprofen delivery kinetics: A quantitative model,” *Chem. Eng. J.*, vol. 156, no. 1, pp. 184–192, 2010, doi: 10.1016/j.cej.2009.10.018.
- [74] V. Meynen, P. Cool, and E. F. Vansant, “Verified syntheses of mesoporous materials,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 125, no. 3, pp. 170–223, 2009, doi: 10.1016/j.micromeso.2009.03.046.
- [75] A. S. Khan *et al.*, “Vibrational spectroscopy of selective dental restorative materials,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 52, no. 6, pp. 507–540, 2017, doi: 10.1080/05704928.2016.1244069.
- [76] A. Patel and P. Solanki, “12-Tungstophosphoric acid functionalized MCM-41 : synthesis , characterization and study of controlled in vitro release of L -arginine,” *J. Porous Mater.*, vol. 23, no. 4, pp. 1113–1123, 2016, doi: 10.1007/s10934-016-0169-0.
- [77] T. R. Renato Cozzi, Pierpaolo Protti, “Bande di assorbimento ir,” *Elem. di Anal. Chim. Strutt.*, vol. 24, no. 1962, pp. 10815–10837, 2000, doi: 10.1016/j.mee.2015.02.038.
- [78] G. Chen, Z. Teng, X. Su, Y. Liu, and G. Lu, “Unique biological degradation behavior of stöber mesoporous silica nanoparticles from their interiors to their exteriors,” *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 11, no. 4, pp. 722–729, 2015, doi: 10.1166/jbn.2015.2072.
- [79] J. J. Kirkland, M. A. van Straten, and H. A. Claessens, “High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns,” *J. Chromatogr. A*, vol. 691, no. 1–2, pp. 3–19, 1995, doi: 10.1016/0021-9673(94)00631-I.