

Politecnico di Torino

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Tesi di laurea Magistrale

Nanobiomateriali con proprietà antiadesive/antibatteriche per la rigenerazione dei tessuti



Relatore:

Prof.^{ssa} Sonia Fiorilli

Candidato:

Barbara Pirani

Anno accademico 2019/2020

Indice dei contenuti

Abstract	1
Capitolo 1- Struttura e funzionalizzazione dei vetri bioattivi mesoporosi per la rigenerazione del tessuto osseo e il rilascio locale di farmaco	3
1.1 Le infezioni batteriche del tessuto osseo	3
1.2 Biofilm	4
1.3 Ceppi batterici diffusi in infezioni del tessuto osseo	8
1.3.1 <i>Stafilococco.Aureus</i>	8
1.3.2 <i>Escherichia.Coli</i>	9
1.4 Biomateriali per il rilascio di specie terapeutiche.....	9
1.4.1 Silici mesoporose come carrier di agenti antibatterici	9
1.4.4.1 Formazione della silice mesoporosa.....	10
1.4.4.2 Le silici mesoporose come carriers di farmaci.....	11
1.4.2 I vetri bioattivi.....	12
1.4.2.1 Meccanismo di bioattività di Hench	13
1.4.2.2 Principali metodi di sintesi dei vetri bioattivi	15
1.4.3 Vetri bioattivi mesoporosi (MBGs)	16
1.5 Scopo del lavoro.....	21
Capitolo 2 – Materiali e metodi.....	24
2.1 Sintesi di matrici bioattive contenenti ioni rame	24
2.2.1 Matrici nanometriche bioattive: sintesi sol-gel in ambiente basico	24
2.2.2 Matrici micrometriche bioattive: sintesi sol-gel accoppiata all’utilizzo della tecnica spray-drying	25
2.2 Funzionalizzazione di matrici bioattive contenenti ioni rame.....	28
2.3 Incorporazione di rifampicina all’interno delle matrici	30
2.4 Metodi di caratterizzazione	31
2.4.1 Adsorbimento e desorbimento di azoto.....	31
2.4.2 Microscopia elettronica a scansione ed emissione di campo (FESEM)	33
2.4.3 Spettroscopia a dispersione di energia (EDS)	34
2.4.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	35
2.4.5 Spettroscopia ad emissione atomica al plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES)	36
2.4.6 Spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FTIR)	38

2.4.7 Spettroscopia UV-visibile	40
2.4.8 Analisi termogravimetrica (TGA)	41
2.4.9 Analisi elementari	43
2.5 Test di rilascio per le matrici contenenti ioni e rifampicina	44
2.6 Saggio antibatterico in modelli planctonici	44
 Capitolo 3 – Risultati e discussione	 46
3.1 Caratterizzazione delle nanoparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica sol-gel in ambiente basico	46
3.1.1 SG 2% Cu	46
3.2 Caratterizzazione delle microparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica sol-gel assistita dall'utilizzo di uno spray-drying	51
3.2.1 SD 2% Cu	51
3.3 Caratterizzazione delle nanoparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica sol-gel in ambiente basico e funzionalizzate	56
3.3.1 SG 2% Cu Funzionalizzate	56
3.4 Caratterizzazione delle microparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica spray-drying e funzionalizzate	62
3.4.1 SD 2% Cu Funzionalizzate	62
3.5 Confronto tra i campioni sol-gel in ambiente basico e sol-gel accoppiata all'utilizzo della tecnica spray-drying	68
3.6 Caratterizzazione delle matrici sol-gel in ambiente basico e spray-drying funzionalizzate e caricate con rifampicina.....	69
3.7 Test di rilascio di rifampicina	71
3.8 Saggio antibatterico in modelli planctonici	74
 Capitolo 4 – Conclusioni	 79
4.1 Conclusioni caratterizzazione nano-micro matrici.....	79
4.2 Sviluppi futuri	82
 Bibliografia.....	 83

Abstract

Ancora oggi, un problema di grande rilievo con notevoli implicazioni cliniche e socioeconomiche è rappresentato dall'infezione ossea. Questa patologia viene descritta come un processo infiammatorio che porta alla distruzione del tessuto osseo, causata solitamente da un'infezione microbica. Attualmente viene trattata con terapie convenzionali, che consistono nella somministrazione sistemica di antibiotici, nella chirurgia e in alcuni casi nella rimozione degli impianti, che spesso però hanno un esito fallimentare attribuibile alla capacità dei batteri di sviluppare un'alta resistenza, attraverso la formazione di un biofilm, ovvero una comunità di microrganismi che crescono attaccati ad una superficie e successivamente si incorporano in una matrice extracellulare autoprodotta.

L'obiettivo generale di questo lavoro di tesi, condotta presso *Biomaterials Laboratory-Gruppo IRIS* nel dipartimento DISAT del Politecnico di Torino e il dipartimento di chimica inorganica dell'università Complutense di Madrid, è quello di sviluppare delle matrici multifunzionali che presentino un effetto sinergico, ottenuto grazie all'azione antiadesiva batterica di superfici funzionalizzate e dal rilascio di ioni e farmaci antibatterici, che curino le infezioni e favoriscano la rigenerazione ossea.

Tra i vari biomateriali, i vetri bioattivi mesoporosi (Mesoporous Bioactive Glasses), risultano essere molto promettenti, grazie alla loro eccellente bioattività e alle loro caratteristiche strutturali.

Essi presentano la stessa composizione dei vetri bioattivi la quale favorisce gli scambi ionici, determinando un comportamento osteoinduttivo estremamente spiccato e hanno una struttura altamente ordinata tipica della silice mesoporosa, con pori di diametro compreso fra 2 e 50 nm, che permette di incorporare e rilasciare agenti terapeutici (farmaci).

Inoltre, è possibile rendere la superficie antiadesiva attraverso una funzionalizzazione con specie zwitterioniche (ugual numero di cariche positive e negative) per favorire un'alta resistenza all'adesione batterica ed evitare la formazione di biofilm.

Nello specifico, in questo lavoro di tesi, sono stati sintetizzati dei vetri bioattivi mesoporosi attraverso le tecniche sol-gel in ambiente basico e sol-gel accoppiato all'uso della tecnica spray-drying, dove in entrambe, in fase di sintesi, è stato inserito un precursore di ione rame, date le proprietà antibatteriche di questo elemento. Le superfici degli MBGs sono state poi funzionalizzate per impartire proprietà di anti-adesione sfruttando la chimica dei silani e, infine, per potenziarne l'effetto terapeutico, i campioni sono stati caricati con rifampicina, antibiotico ampiamente studiato in letteratura come modello per il rilascio controllato.

Successivamente sono state effettuate delle caratterizzazioni dei materiali, sotto l'aspetto morfologico, strutturale e chimico. La funzionalizzazione e l'incapsulamento del farmaco non influiscono sulla morfologia sferica e la dimensione delle particelle.

Per valutare le potenzialità antibatteriche dei materiali sviluppati sono stati condotti dei test di rilascio del rame e della rifampicina dai quali è risultato una cinetica di rilascio sostenuta nel tempo con rilascio totale dell'80% del farmaco caricato.

Infine, è stato valutato l'effetto antibatterico tramite test antibatterici in modelli planctonici, utilizzando i batteri *Escherichia.Coli* e *Stafilococco.Aureus*.

Capitolo 1- Struttura e funzionalizzazione dei vetri bioattivi mesoporosi per la rigenerazione del tessuto osseo e il rilascio locale di farmaco

1.1 Le infezioni batteriche del tessuto osseo

Il trattamento di difetti ossei, soprattutto di quelli più estesi derivanti da traumi, infezioni, tumori o malformazioni genetiche, rappresenta una grande sfida nel campo biomedico.

Infatti, dopo un trauma, in condizioni normali il tessuto osseo si rigenera completamente in 6-8 settimane [1]. Nonostante il processo avvenga in tempi brevi e mostri un'impressionante capacità rigenerativa da parte dell'osso, il 10-15% dei pazienti aventi una frattura presenta un percorso di guarigione compromesso, che può portare ad una guarigione ritardata o persino ad una frattura non unita. A causa dell'invecchiamento della popolazione, il numero totale di pazienti che soffrono di ritardo della guarigione ossea o di non-unione è previsto in drastico aumento, in quanto i pazienti anziani presentano un rischio più elevato di soffrire di malattie ossee (es. osteoporosi), che possono portare ad una condizione di guarigione compromessa. Nonostante i progressi promettenti nella progettazione di nuovi biomateriali e dagli approcci terapeutici, l'effettivo trattamento delle fratture ossee, risulta ancora essere un problema clinico altamente rilevante.

Ad oggi, le infezioni batteriche, che possono coinvolgere sia il tessuto osseo che i tessuti molli, rappresentano un importante fattore di rischio in grado di compromettere la guarigione delle ossa. Un'infezione del tessuto osseo che causa alta morbilità e mortalità è l'osteomielite cronica, che può manifestarsi in varie situazioni tra cui traumi, chirurgia ortopedica ricostruttiva e altri interventi chirurgici locali[2].

Per contrastare le infezioni batteriche, le terapie classiche a cui si ricorre includono la somministrazione sistemica di antibiotici, drenaggio della ferita e, nel caso in cui sia presente un impianto, la sua rimozione[3].

Questi approcci, tuttavia, possono risultare inefficaci a causa dell'elevata capacità dei batteri di sviluppare un'alta resistenza verso gli antibiotici, formando un biofilm. Le condizioni create sono tali da poter comportare delle importanti limitazioni e significative ripercussioni sulla qualità della vita del paziente, in particolar modo soggiorni ospedalieri prolungati, interventi chirurgici aggiuntivi, effetti collaterali elevati e alto tasso di morbilità. Alla luce di quanto appena esposto, emerge la necessità di ricercare delle terapie alternative e innovative come soluzione a questo problema; a tal fine una delle strategie per ottenere un trattamento più efficace, consiste nella somministrazione di agenti terapeutici direttamente nel sito patologico. I vantaggi di questo trattamento includono: elevata efficienza, azione continua, ridotta tossicità. Con questa prospettiva, un approccio molto promettente è il design di biomateriali multifunzionali, in quanto bioattivi e allo stesso tempo capaci di rilasciare specie terapeutiche (farmaci, ioni) aventi proprietà antibatteriche, pro-osteogeniche e pro-angiogeniche utili per la rigenerazione del tessuto osseo, riducendo il rischio di infezioni e favorendo i processi di guarigione.

Tra i vari biomateriali, i vetri bioattivi mesoporosi hanno attratto un interesse crescente grazie alle loro proprietà. In particolare, mostrano un'eccellente bioattività, che avviene tramite la formazione di legami all'interfaccia con i tessuti viventi e delle caratteristiche strutturali interessanti. La loro

composizione permette scambi ionici che determinano un comportamento osteoconduttivo e inoltre, grazie alla loro struttura mesoporosa è possibile incapsulare farmaci e ottenerne il rilascio nel sito di interesse.

Gli agenti infettivi di maggior rilievo in chirurgia ortopedica sono identificati da varie specie di *Stafilococco*; a tal fine, la profilassi che viene adottata negli interventi di osteosintesi, sia nelle fasi pre-operatoria che post-operatoria, negli interventi di osteosintesi si focalizza in modo da debellare questi ceppi batterici, nello specifico Gram positivi e Gram negativi[4].

I batteri, come meccanismo di difesa formano un biofilm, struttura all'interno della quale riescono ad attuare misure difensive sia nei confronti delle difese immunitarie dell'ospite che alla somministrazione di antibiotici.

1.2 Biofilm

Il termine "biofilm" nasce per indicare la presenza di una matrice polisaccaridica, che, come una pellicola, che ricopre la comunità microbica. Il biofilm è composto principalmente da cellule e da una matrice, detta sostanza polimerica extracellulare (SPE), autoprodotta dalle cellule stesse. La matrice è responsabile della morfologia e delle proprietà chimico-fisiche del biofilm. La percentuale di SPE si aggira tra il 50% e il 90% ed è considerata la materia prima del biofilm. La sua composizione e il suo spessore sono dinamici e possono dipendere da molti parametri biologici e non biologici. Tra i componenti della matrice ritroviamo esopolisaccaridi, proteine e acidi nucleici.

Le principali caratteristiche del biofilm sono:

- Trattenere acqua e nutrienti
- Protezione dai "predatori"
- Protezione da stress ambientali come disidratazione, variazioni di temperatura e pressione osmotica
- Favorire la comunicazione intercellulare in quanto i batteri sono molto vicini tra loro (quorum sensing). La formazione del biofilm è un processo quorum-sensing dipendente
- Facilitare il trasferimento del materiale genetico

Sono state proposte due ipotesi che spiegano il motivo per cui i microrganismi formano il biofilm[5]:

- I. L' esistenza di superfici che fungono da attivatori catalitici promuovendo la crescita batterica, in particolare tra queste superfici sono presenti quelle protesiche;
- II. La formazione del biofilm offre protezione da diversi cambiamenti ambientali, come esposizione a raggi UV, tossicità da metalli, esposizione ad acidi, deidratazione e salinità, fagocitosi e agenti antimicrobici.

Lo sviluppo del biofilm e le principali fasi della sua formazione possono essere riassunte nei seguenti passaggi [6][7]:

- Adesione
- Formazione della micro-colonia
- Maturazione

➤ Dissolvimento

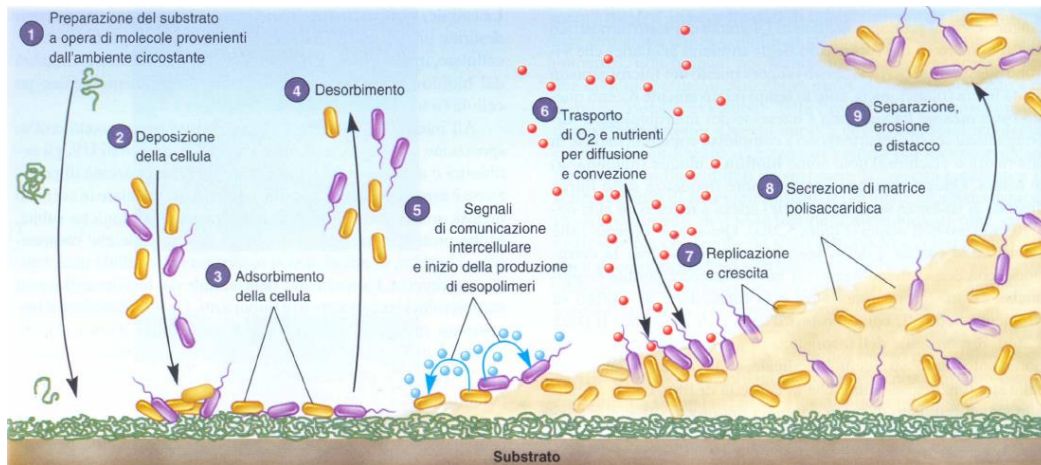


Figura 1: Meccanismi e fasi della formazione del biofilm[8]

❖ Adesione batterica al substrato

Inizialmente i batteri si trovano in forma libera e incominciano a sondare il territorio circostante; quando avvertono la presenza di sostanze nutritive, si dirigono verso il substrato (chemiotassi) e inizia il processo di adesione.

Il processo di adesione è composto da due fasi:

Adesione reversibile

Questa fase basata su interazioni deboli tra i batteri e il substrato risulta critica a causa di possibili repulsioni dovute alle cariche elettriche. I batteri presentano una carica di superficie complessivamente negativa, e anche le particelle presenti sulla superficie, spesso risultano cariche negativamente. Perciò quando i batteri avvertono la presenza di nutrienti, cercano di vincere le forze repulsive attraverso risposte fisiologiche. Ad esempio, il flagello, un'appendice cellulare lunga e sottile, utile ai batteri per svolgere la funzione motoria, diviene particolarmente importante nella fase di adesione reversibile perché si muove per vincere le forze repulsive.

Se l'adesione reversibile permane e il batterio trova nutrimento, avviene una modifica di alcune funzioni fisiologiche e si passa all'adesione irreversibile.

Adesione irreversibile

In questa fase, invece, si ha la perdita del flagello, in quanto il batterio rimanendo adeso al substrato non necessita più di esso. Questa adesione è favorita dalla cellula microbica, che, in risposta all'evento di adesione iniziale, produce fattori di adesione specifici, in risposta all'evento di adesione iniziale (fimbrie, polisaccaridi), che rafforzano il legame con la superficie.

I polisaccaridi secreti in questa fase non sono quelli che formeranno il biofilm, ma hanno il compito di migliorare l'adesione.

❖ Formazione della microcolonia

Se la cellula microbica ha a disposizione una quantità notevole di nutrienti, dopo l'adesione si susseguono una serie di eventi di duplicazione cellulare sulla superficie colonizzata, che portano alla formazione di una microcolonia.

La microcolonia offre la possibilità ai diversi microorganismi di associarsi ad essa, favorendo così la condizione di eterogeneità tipica dei biofilm microbici. In questa fase viene raggiunta un'elevata densità cellulare con successivo inizio dei meccanismi di *quorum sensing* ovvero un sistema utilizzato frequentemente dalle cellule batteriche per comunicare tra loro.

Infine, dalla microcolonia si passa a strutture più articolate sia come dimensioni che come forma (i biofilm assumono struttura tridimensionale simile a un fungo). Queste strutture non rappresentano solo degli ammassi di batteri e matrice extracellulare, ma al loro interno si distingue un'architettura ben precisa.

❖ Maturazione del biofilm

Vi è una netta differenza tra microcolonia e biofilm maturo, non solo per le maggiori dimensioni di quest'ultimo, ma anche per la presenza di un'organizzazione spaziale, che permette l'esposizione diretta di gran parte delle cellule del biofilm alle sostanze nutritive dell'ambiente esterno. Si produce una fitta rete di canali, che ha il compito sia di garantire la distribuzione dei nutrienti che la sopravvivenza dei batteri situati nelle regioni più profonde del biofilm.

❖ Dissolvimento del biofilm

Oltre una certa dimensione, si ha la rottura meccanica del biofilm: questo causa il rilascio di flocculi o di piccoli gruppi di cellule che possono ritornare alla condizione planctonica ed eventualmente colonizzare una nuova superficie, dando così inizio ad un nuovo ciclo.

I principali batteri responsabili di infezioni protesiche e articolari associati a produzione di biofilm sono gli *Stafilococchi* e *Pseudomonas*. Il genere *Staphylococcus* è composto da cocci Gram-positivi colonizzanti specifiche nicchie ambientali, tra i quali tessuti umani e diverse specie di mammiferi.

Lo *Stafilococco Epidermidis*, è un normale membro della flora batterica a livello cutaneo nell'uomo e come tale viene definito non patogeno; tuttavia, proprio a causa della sua ubiquità, è frequentemente isolato da infezioni impianto associate.

Lo *Stafilococco Aureus*, viene solitamente isolato dalle infezioni associate a impianti protesici; una sua caratteristica è quella di colonizzare naso e orecchie di individui sani, incluso il personale sanitario, che costituiscono un "reservoir" per la diffusione del germe stesso [9]. Uno dei maggiori supporti al meccanismo etio-patogenetico di queste infezioni, risiede proprio nella capacità di questi microrganismi di formare biofilm su bio superfici.

La *Pseudomonas Aeruginosa*, è un batterio molto virulento ed ubiquitario, colpisce persone con difese immunitarie basse o barriere fisiche compromesse. A volte, tuttavia, se infetta il meato urinario può provocare infezioni estese, che possono causare la morte dei tessuti e il decesso per setticemia [9].

1.2.1 Resistenza del biofilm agli agenti antimicrobici e strategie di intervento

Nei protocolli ospedalieri, l'impiego inadeguato di dosi e tempi della terapia antibiotica ha come conseguenze sia l'inefficacia della terapia stessa che l'insorgenza di ceppi resistenti (meticillino-resistenza che non dovrebbe superare il 30-40%). La situazione che ne deriva ha impatti negativi sia in termini biologici che economici, diretti e indiretti[4]. A supporto di quanto appena esposto, negli Stati Uniti il costo annuale dell'antibiotico-resistenza di un solo patogeno è circa 122 milioni di dollari.

Vi sono determinati comportamenti che favoriscono la crescita e lo sviluppo dei batteri, ad esempio:

- L'utilizzo di antibiotici per trattare infezioni virali, dove non hanno alcuna utilità
- Prendere farmaci in maniera diversa da come scritto nella prescrizione medica, a dosi inferiori o per un tempo differente da quello raccomandato
- L'abitudine in molti ospedali di prescrivere a scopo preventivo antibiotici

La resistenza dei biofilm agli agenti biocidi può essere spiegata attraverso tre meccanismi. Il primo è dato dall'effetto barriera della matrice dal quale si evince che per gli elementi allo stato ionico (per esempio metalli), immunoglobuline o antibiotici, esiste la possibilità che vengano neutralizzati o legati dalla sostanza polimerica extracellulare, nonché diluiti a concentrazioni sub letali prima che possano raggiungere le cellule bersaglio. Il secondo meccanismo è possibile identificarlo come il tipico stato fisiologico degli organismi che producono biofilm. Nonostante molti antibiotici possano penetrare la sostanza polimerica extracellulare, le cellule all'interno del biofilm sono spesso in una fase di quiescenza. Tutti gli antibiotici, infatti, richiedono un minimo grado di attività cellulare e/o replicativo per agire. Infine, il terzo meccanismo riguarda l'esistenza di una sottopopolazione "persistente". In particolare, i microrganismi "persistenti" costituiscono una piccola frazione dell'intera biomassa nel biofilm; tutt'oggi rimane ancora poco chiaro se questi rappresentino un distinto fenotipo o se siano semplicemente cellule più resistenti, ubicate negli strati più profondi, all'interno della popolazione.

Per contrastare la formazione, l'attecchimento e lo smantellamento del biofilm nelle infezioni croniche e in quelle protesiche, si possono adottare diverse possibilità di intervento. Una di queste è la prevenzione verso la contaminazione iniziale, mediante l'utilizzo di tecniche asettiche e di profilassi antibiotica appropriata, la quale consente di minimizzare e contrastare l'iniziale legame batterico. Successivamente si potrebbe procedere con l'utilizzo di protesi imbibite di sostanze sia antibiofilm che antimicrobiche, aventi caratteristiche farmacodinamiche locali specifiche, capaci di penetrare nella matrice del biofilm a concentrazioni idonee. Infine, se gli approcci precedenti, sono fallimentari, non resta che la chirurgia attraverso la rimozione della protesi infetta e di un conseguente re-impianto.

L'efficacia di una terapia antibiotica mirata dipende da una buona vascolarizzazione del segmento e dalla possibilità di ottenere una concentrazione efficace nel sito di interesse.

1.3 Ceppi batterici diffusi in infezioni del tessuto osseo

1.3.1 *Stafilococco. Aureus*

Lo *Stafilococco.Aureus*, risulta essere il più pericoloso tra tutti i numerosi e comuni batteri appartenenti al genere degli *stafilococchi*[9]. Questo batterio, appartiene al ceppo dei Gram-positivi, è di forma sferica (cocchi) e può provocare infezioni cutanee ma anche patologie più gravi come polmoniti, infezioni alle valvole cardiache e infezioni ossee. Si diffonde attraverso il contatto diretto con un individuo infetto, usando, ad esempio, un oggetto contaminato o inalando goccioline infette disperse attraverso gli starnuti o la tosse. Le infezioni cutanee sono comuni e si possono manifestare sotto forma di vescicole, ascessi, arrossamento e gonfiore, ma i batteri possono diffondersi anche attraverso il sangue e infettare organi distanti.

La diagnosi si basa sull'aspetto della pelle e sull'identificazione dei batteri in un campione di materiale infetto.

Inoltre, l'infezione da stafilococco è una delle cause principali di PJI (Prothetic Joint Infection), in quanto sia i dispositivi protesici che l'interfaccia osso-protesi risultano poco vascolarizzate, perciò sono difficili da trattare. Nel caso in cui l'infezione fosse già in atto, si procede con la rimozione della protesi. In questo contesto, i tipi di infezione che possono verificarsi sono due: infezioni precoci di giunti protesici (normalmente a 30 giorni dall'impianto) e infezioni croniche.

Le prime, si manifestano in forma di ferite profonde e come sintomi il paziente presenta: febbre, infiammazioni e versamento nel giunto.

Le seconde, invece sono più acute e talvolta manifestano un leggero dolore cronico, senza segni evidenti di infezione.

Emartrosi, gotta, debris metallici che inducono sinovite (infiammazione cronica della membrana sinoviale che può estendersi fino a cartilagine e tendini) possono essere facilmente scambiate per PJIs. L'unico modo per diagnosticare una PJI dovuta a *Staphylococcus aureus*, è isolare l'organismo da campioni di fluido presenti nel giunto o da campioni di tessuto periprotetico e analizzare le culture positive.

Gli antibiotici vengono scelti in base alle probabilità che siano efficaci contro il ceppo specifico che sta provocando l'infezione.



Figura 2: *Stafilococco.Aureus*

1.3.2 *Escherichia.Coli*

Il batterio *Escherichia.Coli* è un batterio appartenente al ceppo dei Gram-negativi e risiede nell'intestino delle persone sane. Le infezioni da parte di questo batterio si possono contrarre mangiando cibo contaminato, toccando animali infetti e inghiottendo acqua contaminata[10].

La maggior parte degli *E.Coli* risulta innocua, tranne alcuni ceppi che hanno acquisito geni, che consentono loro di causare infezioni del tratto digerente provocando diarrea, infezioni delle vie urinarie, dell'apparato respiratorio, con insorgenza di polmoniti ed ulteriori complicanze.

Le infezioni da *E.Coli* esterne al tratto digerente e la maggior parte delle infezioni intestinali sono efficacemente curabili con terapia antibiotica.

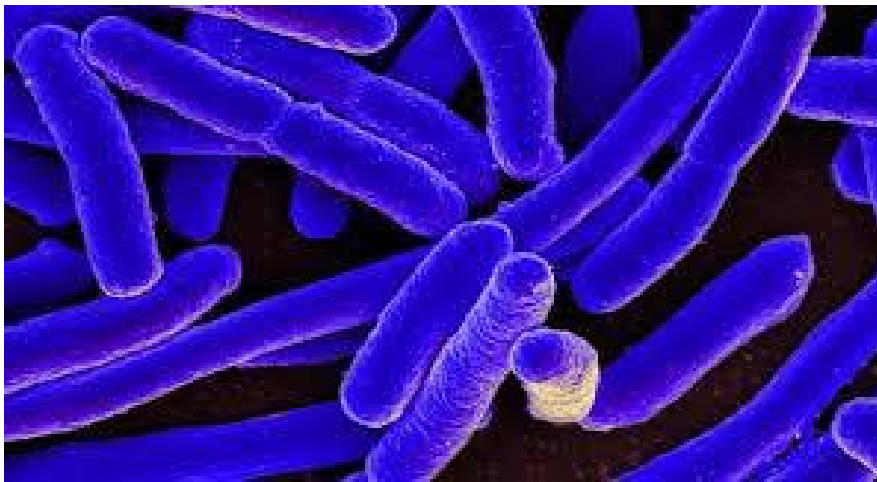


Figura 3: *Escherichia.Coli*

1.4 Biomateriali per il rilascio di specie terapeutiche

1.4.1 Silici mesoporose come carrier di agenti antibatterici

Secondo la classificazione IUPAC, i materiali mesoporosi presentano pori con diametri compresi tra 2 e 50 nm.

I materiali mesoporosi a base di silice, furono contemporaneamente sintetizzati per la prima volta intorno agli anni novanta, da due gruppi di ricercatori: il primo guidato dal professore Kuroda, dell'università Waseda e il secondo guidato da Kresge appartenente alla Mobil Oil Company[11].

La sintesi di materiali mesoporosi richiede l'utilizzo di tensioattivi come agenti templanti e di precursori inorganici del framework siliceo. Il tensioattivo o surfattante è una molecola anfifilica formata da una parte idrofobica (coda) e da una parte idrofilica (testa polare). Possono essere di natura ionica come il bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB) oppure non ionica come i copolimeri a blocchi, tra cui i più comuni sono il Pluronic P123 e il Pluronic 127. Grazie alla loro struttura anfifilica, quando vengono immersi in una soluzione acquosa, al di sopra della prima concentrazione micellare critica (CMC₁), i tensioattivi si assemblano in micelle [12].

In questo stato si presentano come strutture sferiche o cilindriche che mantengono le parti idrofiliche del tensioattivo a contatto con l'acqua e quelle idrofobiche verso l'interno.

All'aumentare della concentrazione di tensioattivo, si raggiunge la seconda concentrazione micellare critica (CMC_2), che determina l'autoorganizzazione delle micelle in mesofasi esagonali, cubiche, lamellari o periodiche, come è possibile osservare in figura 4 [13].

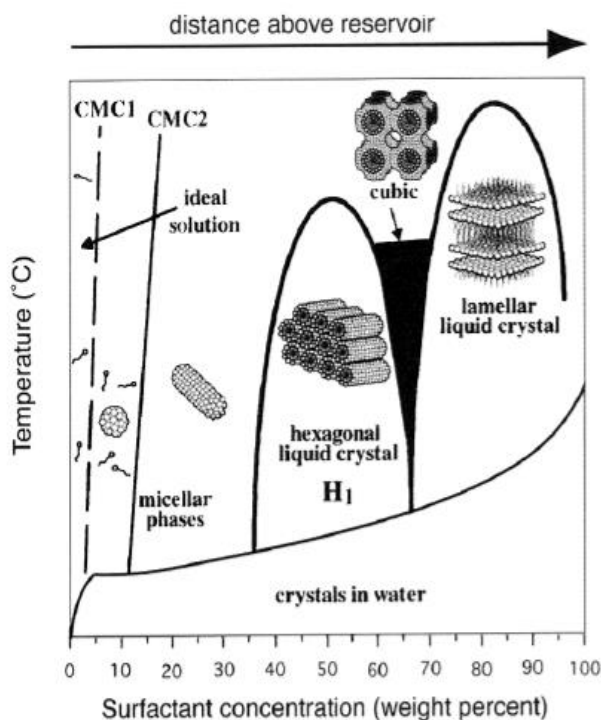


Figura 4: Autoassemblaggio del surfattante cationico CTAB

1.4.4.1 Formazione della silice mesoporosa

I ricercatori di Mobil proposero come metodo di preparazione delle silici mesoporese proposero il True Liquid Templating Mechanism (TLCT). Esso si basa sull'interazione tra una fase micellare acquosa e un precursore siliceo.

Nella figura 5 [14], sono rappresentati due diversi metodi per la formazione di silice mesoporosa.

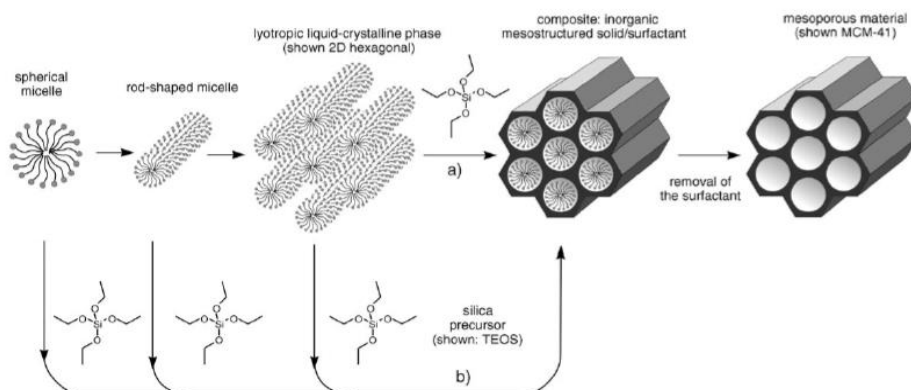


Figura 5: Meccanismo di formazione della silice mesoporosa (TLCT)

Nell' ipotesi di meccanismo (a), le molecole di surfattante si assemblano per formare le micelle, le quali si aggregano in strutture cilindriche che successivamente, assemblandosi, generano cristalli liquidi. In questo primo caso, la concentrazione del surfattante risulta essere elevata tale da rendere possibile la formazione della fase liquido-cristallina senza l'aggiunta del precursore siliceo, esso viene infatti aggiunto che avviene in un secondo momento, condensandosi intorno alle nanostrutture astiformi. La struttura finale mesoporosa è ottenuta rimuovendo il surfattante organico tramite calcinazione.

Nell' ipotesi di meccanismo (b) invece, il precursore della silice viene addizionato prima della formazione delle micelle ed interagisce con le molecole di surfattante formando micelle inorganiche-organiche. Quest'ultime, tendono ad aggregarsi in strutture astiformi, che assemblandosi generano cristalli liquidi che, sottoposti a calcinazione, danno vita alla mesostruttura. In questo secondo caso è evidente che la fase liquido-cristallina si possa ottenere anche a basse concentrazioni di surfattante in presenza delle specie silicee. Questo secondo processo viene definito Cooperative Self-Assembly e risulta essere quello più riconosciuto per la sintesi di materiali mesoporosi.[15]

1.4.4.2 Le silici mesoporose come carriers di farmaci[11]

Generalmente, i materiali a base di silice mesoporosa mostrano alcune peculiari caratteristiche strutturali, tra le quali:

- Elevata area superficiale specifica 1000 (m²/g);
- Elevato volume dei pori (circa 1 cm³/g);
- Dimensione dei pori regolabile (2-50 nm) in base alla scelta del tensioattivo;
- Morfologia e taglia omogenea dei pori che permette incapsulamento e rilascio sostenuto di farmaco;
- Quantità elevata di gruppi silanoli sulla superficie, che permettono funzionalizzazioni superficiali.

Grazie a queste eccellenti proprietà, questo biomateriale è stato proposto per varie applicazioni, dall'ambito del drug delivery a quello bio-sensoristico e catalitico.

In particolare, nel 2001, il gruppo di ricerca guidato dalla prof.ssa Vallet-Regi ha proposto l'uso della silice mesoporosa MCM-41[11], sintetizzata per la prima volta negli anni '90 come DDS (drug delivery system). Questo sistema, infatti, permette il caricamento di molecole biologicamente attive di varie dimensioni, da piccoli farmaci (200 Da) a grandi molecole come peptidi e proteine (700 kDa) vengono caricate nei pori del biomateriale, attraverso vari metodi come l'adsorbimento, incipient wetness e melt infiltration, per poi essere rilasciate in modo controllato nel sito di interesse[16].

La sfida che si pongono i DDS sta nella capacità di trasportare una quantità efficace di farmaco con una cinetica di rilascio controllata, rispetto alle terapie attuali, nel sito di interesse. I requisiti necessari, perché ciò avvenga sono riscontrabili in una buona biocompatibilità, nella protezione del farmaco, in modo che non venga rilasciato prima che venga raggiunto l'obiettivo e in un assorbimento cellulare efficace, con una cinetica di rilascio controllata e un targeting efficace[17].

Uno studio successivo, sempre condotto dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Vallet-Regi[18], ha messo a confronto due metodi diversi di caricamento del farmaco, in matrici mesoporose. Il primo

metodo tramite impregnazione (IP) e il secondo tramite il caricamento di farmaco, assistito da tensioattivi (indicato anche come one-pot, OP). Sono state poi valutate, le caratteristiche delle matrici bioattive, sotto diversi aspetti: fisico-chimico, risposta cellulare, profili di somministrazione del farmaco e attività antibatterica. I profili di rilascio e i risultati dell'attività antimicrobica suggeriscono l'uso di queste matrici IP e OP come un'ottima strategia di drug delivery nei trattamenti di osteomielite e in altre infezioni ossee. Il farmaco utilizzato è la levofloxacina, potente antibiotico che agisce uccidendo i batteri responsabili delle infezioni dell'organismo.

Questi sistemi sono utili anche in un gran numero di applicazioni mediche e farmaceutiche, come ortopedia e odontoiatria.

1.4.2 I vetri bioattivi

I biovetri o vetri bioattivi sono una sottocategoria appartenente ai bioceramici con specifiche caratteristiche di bioattività, che consentono di formare legami all'interfaccia con i tessuti viventi. La velocità con cui si forma il legame chimico dipende dalla composizione della fase vetrosa: si ha una rapida cristallizzazione di HCA (in due ore) quando si raggiunge una percentuale molare vetrosa del 42-53%, se la percentuale molare vetrosa è nel range 53-62% lo strato di HCA tende a formarsi in due o tre giorni, mentre se è superiore al 62% il materiale è inerte. Data questa proprietà di formare legami all'interfaccia con i tessuti viventi, questi materiali vengono definiti osteoconduttivi perché se messi a contatto con una soluzione fisiologica simulata (in vitro) o a contatto con fluidi biologici (in vivo) favoriscono la deposizione di idrossicarboapatite (HCA) che rappresenta la fase inorganica dell'osso. Questa caratteristica ha consentito un loro grande impiego in ambito biomedico.

Il primo biovetro è stato brevettato dal Prof. L. Hench[19], University of Florida, nel 1968, il quale sosteneva la necessità di ottenere un nuovo materiale che potesse instaurare un legame tessuto-impianto, in quanto i biomateriali presenti a quel tempo erano tutti bioinerti e causavano la formazione di una capsula fibrotica. La composizione del biovetro brevettato da L. Hench e i suoi collaboratori nel 1971 è denominata 45S5 (Bioglass®). Tale sigla implica il 45% di silice e rapporto (calcio su fosforo) Ca/P=5. Nello specifico, questo biovetro è composto da 45% SiO₂, 24.5% CaO, 24.5% Na₂O e 6% P₂O₅.

Il Bioglass® è stato il primo materiale inorganico che ha mostrato la tendenza a legarsi al tessuto nativo. La bioattività di questo tipo di materiale è da attribuire ad una serie di fattori, tra cui le reazioni che hanno luogo all'interfaccia tessuto-materiale. Esse che contribuiscono alla creazione di un'ambiente ideale per la colonizzazione, proliferazione e differenziazione di osteoblasti e quindi per la formazione di nuovo tessuto osseo[2].

Hench e i suoi collaboratori identificarono diversi comportamenti dei vetri a base di silice al variare della loro composizione. Questi possono essere descritti attraverso il digramma ternario Na₂O-CaO-SiO₂ rappresentato in figura 6.

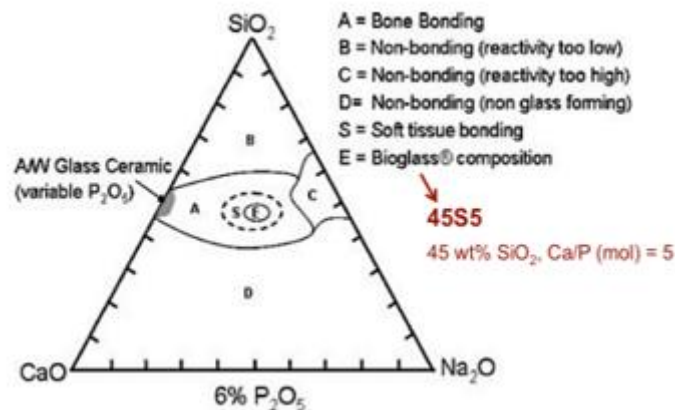


Figura 6: Mappa di bioattività di composizioni del sistema SiO₂-NaO₂-CaO [18]

I sistemi vetrosi appartenenti alla regione A, ottenuti mantenendo fissa la percentuale molare di P₂O₅ al 6%, formano un legame con l'osso, dovuto alla formazione di uno strato di gel di silice, creatosi in seguito alla precipitazione di ioni Ca²⁺ e PO₄³⁻, e possono quindi essere ritenuti bioattivi. Nella regione B, invece, sono inclusi i vetri che non creano legame con l'osso, a causa della loro bassa reattività e vengono quindi considerati inerti. Nello specifico essi formano una capsula fibrotica all'interfaccia tra l'impianto e il tessuto. Nella regione C, vi sono alcune composizioni, che vengono riassorbite in 10-30 giorni dall'impianto; nella regione D, invece, sono presenti materiali realizzabili dal punto di vista tecnologico e che per questo motivo non sono testati. La regione S è la regione tipica dei materiali osteoconduttivi e osteoproduttivi, dove si trova il Bioglass. Infine, i vetri con il più alto livello di bioattività si trovano all'interno della regione E; essi infatti, sono capaci anche di legarsi ai tessuti molli, in quanto la loro composizione è molto vicina all'eutettico ternario e sono quindi di facile fusione.

La composizione del biovetro può essere modificata al fine di incrementare il potenziale terapeutico. Ad esempio, l'effetto antibatterico può essere ottenuto attraverso l'utilizzo di diversi ioni, come l'argento (Ag), lo zinco (Zn) e il rame (Cu); la loro attività battericida[20] è in prevalenza associata ad un incremento del pH della soluzione che porta ad una modifica della morfologia superficiale dei batteri, e ad un conseguente danneggiamento delle loro pareti cellulari.

1.4.2.1 Meccanismo di bioattività di Hench

Quando un vetro bioattivo viene posto a contatto con una soluzione acquosa, la sua superficie subisce dei cambiamenti chimici e strutturali in funzione del tempo. Questi cambiamenti, tra cui la formazione di uno strato di (HCA) sulla superficie del vetro e il rilascio di prodotti di dissoluzione nei tessuti circostanti, risultano essenziali per favorire il legame chimico fra vetro e tessuto e quindi per stimolare la crescita di nuovo osso (osteogenesi).

Il meccanismo di bioattività e della formazione del legame in soluzione acquosa, si basa sui seguenti step[21]:

1. Rapido scambio di ioni Na⁺ e Ca⁺ con ioni H⁺ o H₃O⁺ dai fluidi corporei, incremento del pH all'interfaccia con l'osso e formazione di gruppi Si-OH (silanoli);

2. Perdita di silice solubile in forma SiOH_4 (acido silicico), ottenuta dalla rottura dei legami Si-O-Si, in seguito all'azione degli ioni H^+ dell'acqua e con conseguente formazione di silanoli ($\text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Si-OH} + \text{OH-Si}$);
3. Reazioni di condensazione e ripolimerizzazione con formazione di uno strato superficiale sul vetro: ricco in SiO_2 e impoverito in alcali;
4. Migrazione di gruppi $\text{Ca}^{2+} [\text{PO}_4]^{3-}$ dal vetro e dai fluidi biologici;
5. Cristallizzazione della fase amorfa ricca in CaO_2 e P_2O_5 avvenuta per incorporazione di anioni OH^- , Ca_3^{2-} e F^- aventi lo scopo di formare uno strato misto di idrossiapatite (HA) e idrossicarbonatoapatite (HCA);
6. Adsorbimento e desorbimento nell'HCA di fattori di crescita, avente come effetto quello di stimolare il differenziamento cellulare (tale fenomeno perdura per tutta la durata del processo);
7. Azione dei macrofagi con l'obiettivo di liberare i siti superficiali che verranno occupati in seguito dalle cellule;
8. Adesione delle cellule staminali sulla superficie bioattiva precedentemente preparata dai macrofagi;
9. Proliferazione e differenziamento delle cellule staminali in forma di osteoblasti;
10. Produzione e mineralizzazione della matrice del tessuto osseo;
11. Cristallizzazione della matrice ossea.

La criticità del meccanismo di bioattività sta quindi nelle cinetiche con cui le reazioni avvengono nei primi due step.

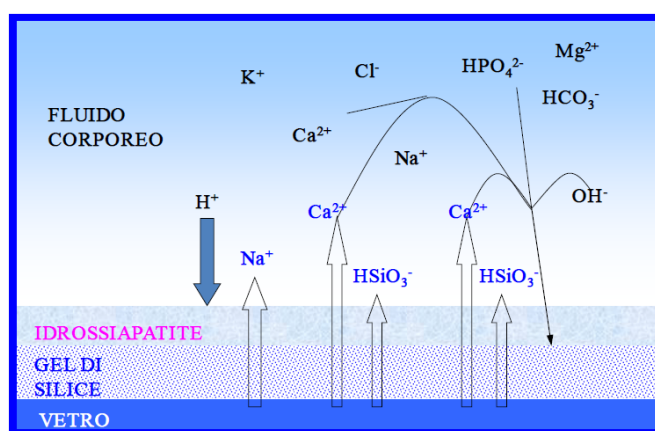


Figura 7: Meccanismo di bioattività del biovetri

Grazie alle proprietà osteoconduttive e osteostimolative dei vetri bioattivi è possibile favorire la deposizione di nuovo tessuto osseo. Tale processo si basa su una serie di reazioni chimiche interfacciali, atte a formare uno strato di idrossiapatite (HA). Quello che si verifica, è un aumento locale del pH, causato dallo scambio di ioni sodio con i protoni, presenti all'interno dei fluidi biologici. Il rilascio di ioni sodio dal vetro, può causare un aumento notevole del pH all'interno dei fluidi corporei, arrivando fino ad 11 nelle prime 8h e rimanere costante per oltre 48h. La neutralizzazione del pH agisce eliminando gli effetti batterici, che allo stesso tempo potrebbe avere effetti negativi sulle cellule. L'entità di questo processo dipende: dal tipo di vetro, dal rapporto area superficiale/volume, dal dosaggio del campione e dall'agitazione del sistema.

1.4.2.2 Principali metodi di sintesi dei vetri bioattivi [22]

I primi vetri bioattivi furono sintetizzati attraverso la fusione di una miscela di ossidi formatori, tra cui la silice (SiO_2) e il pentossido di fosforo (P_2O_5), e ossidi modificatori, come l'ossido di calcio (CaO) e di sodio (Na_2O), posti ad una temperatura al di sopra del loro punto di fusione, il tutto all'interno di un crogiolo di platino. Successivamente venivano temprati in uno stampo in grafite o in acqua.

Nel 1991, Rounan Li, Clark e Hench dimostrarono che attraverso l'uso del metodo sol-gel era possibile accrescere il tenore di SiO_2 fino a quasi il 90%, mantenendo la bioattività del biovetro. Questa tecnica permette di aumentare l'area superficiale grazie alla formazione di una struttura porosa (pori compresi tra 1-30 nm), che risulta avere un'importanza rilevante nel meccanismo di bioattività, agendo da sito di nucleazione per lo strato di apatite. Tale metodo prevede la formazione di un reticolo tridimensionale e interconnesso, detto gel, a partire da una sospensione di particelle colloidali molto piccole con un diametro compreso tra 1 e 100 nm.

Il metodo sol-gel per la preparazione di vetri bioattivi consiste in 5 stadi:

1. Preparazione della miscela:

il precursore siliceo, tipicamente un alcossido come il tetraetilortosilicato (TEOS), viene idrolizzato in acqua in presenza di un catalizzatore, acido o basico, generando un sol a bassa viscosità. L'idrolisi del precursore produce specie ($\text{Si}(\text{OH})_4$) che reagendo tramite reazioni di policondensazione danno legami silossanici (Si-O-Si), aumentando così la viscosità del sol. La scelta del catalizzatore risulta molto importante perché da esso dipende la struttura finale del gel.

Se la sintesi avviene in condizioni basiche, l'idrolisi procede lentamente e la sua velocità aumenta contestualmente alla sostituzione dei gruppi alcossidi con i gruppi ossidrilici; viceversa, mentre la condensazione risulta più veloce e procede per addizione di monomeri ai gruppi Si-O^- del cluster in crescita, generando piccole nanoparticelle sferiche e un network fortemente reticolato.

Invece, utilizzando un catalizzatore acido si ottiene l'effetto opposto. Infatti l'idrolisi procede con una velocità maggiore, mentre la cinetica di condensazione diminuisce con l'avanzare del grado di sostituzione. Così facendo, i monomeri si aggregano formando delle particelle più grandi con catene poco ramificate.

2. Gelificazione

All'aumentare dei legami Si-O-Si , aumenta la viscosità del sol. Le nanoparticelle continuano a legarsi tra loro formando un idrogel, causato dall'eccesso di acqua e di alcool, prodotti durante le reazioni di condensazione. Il tempo di gelificazione, dipende sia dalla concentrazione del solvente che dalla quantità di acqua utilizzata per l'idrolisi oltre che dal precursore.

3. Invecchiamento

Il gel viene mantenuto in immersione in un liquido per diverse ore. Durante questa fase si modificano sia la struttura che le proprietà.

4. Essiccamento

In questo step il gel non è ancora completamente rigido, perciò attraverso un trattamento termico, si procede con una contrazione proporzionale al volume di liquido evaporato. Dopo

l'evaporazione dei prodotti di condensazione, si ottiene un reticolo costituito da pori interconnessi.

5. Stabilizzazione mediante trattamento termico

Al fine di rimuovere i silanoli dalla superficie, si sottopone il gel essiccato ad un trattamento termico ad una temperatura di almeno 600°. Questo procedimento permette di controllare sia la stabilità del materiale che la velocità di formazione dello strato di HCA.

1.4.3 Vetri bioattivi mesoporosi (MBGs)

I vetri bioattivi mesoporosi (MBGs) sono stati sintetizzati nel 2004 dal team di Zhao[23] e successivamente dal gruppo di Vallet Regí [24]; entrambi si sono ispirati ai primi gel derivati dai vetri bioattivi, scoperti nei primi anni '90, da Larry Hench e dai suoi collaboratori. Attualmente, sono stati identificati come uno dei membri più interessanti della famiglia dei vetri bioattivi sulla base delle loro proprietà peculiari. Infatti, un vetro bioattivo mesoporoso (MBG), è un materiale bioceramico, avente le stesse proprietà strutturali della silice mesoporosa e la medesima composizione dei vetri sol-gel convenzionali.

Gli MBG hanno una superficie molto più elevata rispetto ai tradizionali vetri sol-gel e una struttura porosa regolare con un diametro dei pori compreso tra 5 e 20 nm, che consente il caricamento di diverse biomolecole. Inoltre, la loro composizione può essere modificata ed arricchita con specifici ioni, come il rame (Cu), lo stronzio (Sr), lo zinco (Zn) o il cobalto (Co), al fine di incrementare il loro potenziale terapeutico. La possibilità, quindi, di modificare la struttura con ioni terapeutici e di caricare biomolecole, scelte in base all'applicazione finale, permette di ottenere una piattaforma multifunzionale, in grado di rilasciare nel sito patologico diverse specie terapeutiche.

In particolare, lo ione rame è riconosciuto per diverse proprietà come la sua azione antibatterica, la capacità di modulare la risposta infiammatoria e di stimolare la proliferazione delle cellule endoteliali umane; tuttavia, ad elevate concentrazioni, può risultare citotossico.

Il rame svolge diversi ruoli all'interno del corpo umano[25]:

- *Ruolo nel sistema nervoso:* concorre alla formazione di mielina e alla sintesi dei neurotrasmettitori, la prima, sostanza primaria per la trasmissione dei segnali nervosi e il secondo, permette la comunicazione tra le cellule nervose;
- *Ruolo nel sistema immunitario:* in cui la sua presenza risulta necessaria al fine di mantenere un numero consono di globuli bianchi, aventi il compito di eliminare microrganismi estranei;
- *Ruolo nel sistema circolatorio:* permette che non vengano alterati i parametri di elasticità dell'aorta e di altre piccole arterie;
- *Ruolo nell'apparato cardiaco:* risulta elemento essenziale nella sintesi del collagene, situato nel tessuto connettivo, ragione per cui è possibile mantenere tono e funzionalità muscolare del tessuto cardiaco;
- *Ruolo in gravidanza:* in quanto il quantitativo di rame assorbito dal feto attraverso la madre, durante i primi mesi di gestazione, risulterà dopo la nascita fondamentale per il corretto svolgimento dei ruoli sopra elencati.

Le proprietà antibatteriche del rame si basano sul principio del “contact killing”[26]. In una prima fase del processo, gli ioni rame vengono rilasciati dalla superficie causando un danno cellulare e conseguente rottura della membrana cellulare, portando ad una perdita del potenziale di membrana e del contenuto citoplasmico. Nella seconda fase, gli ioni rame inducono la generazione di specie reattive dell’ossigeno (ROS), causando ulteriori danni alla cellula, come la degradazione del DNA genomico e plasmidico.

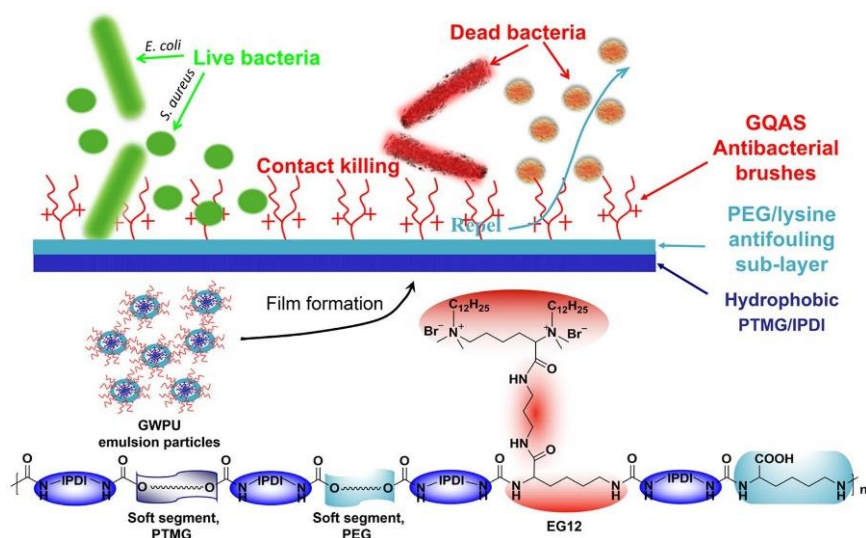


Figura 8: Contact killing ad opera del rame

Molti studi sono stati effettuati per dimostrare le proprietà del rame; come ad esempio quello condotto dal gruppo di ricerca di Wu[26], che ha confermato le proprietà del rame, in termini di azione antibatterica e pro-osteogenica. Nello specifico, un altro studio, condotto da Bari[27], ha valutato l’effetto antibatterico del rame rilasciato dai vetri bioattivi mesoporosi, contro tre diversi tipi di batteri, molto comuni nell’insorgenza di infezioni ossee, quali lo *Staphylococcus aureus*, lo *Staphylococcus epidermidis* e l’*Escherichia coli*. In particolare, è stata osservata la capacità degli ioni rame, di inibire la crescita dei suddetti batteri e di inibire la formazione del biofilm prodotta dal batterio *S.epidermidis* favorendone persino la dispersione.

Tuttavia, se in eccesso, gli ioni rame possono avere un effetto tossico verso tutti i tipi di cellule e non solo verso i batteri, causando lo sviluppo di varie patologie neurodegenerative, fra cui l’Alzheimer.

Un’altra proprietà del rame è la capacità di promuovere il processo di angiogenesi. La formazione di nuovi vasi sanguigni è un processo che si attiva in seguito a dei cambiamenti presenti nell’ambiente fisiologico, ed è responsabile della crescita e della riparazione dei tessuti. Questa sua capacità di guidare processi angiogenici è riscontrabile sia nella forma ossidata che in quella ridotta. Gli ioni rame sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule endoteliali che formano i capillari, formando così nuovi vasi sanguigni da quelli già esistenti.

Tra i vari fattori di crescita coinvolti nel processo angiogenico, il principale è il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF).

Lo stronzio ha invece funzioni pro-osteogeniche e anti-osteoclastogeniche; lo zinco ha proprietà antibatteriche, antiinfiammatorie e pro-osteogeniche e il cobalto favorisce il riassorbimento osseo, agendo sugli osteoclasti e in elevate concentrazioni risulta cito-tossico.

Gli MBG, grazie alla composizione tipica dei vetri bioattivi, presentano quindi un eccellente comportamento bioattivo motivo per il quale sono largamente utilizzati come materiali per la rigenerazione ossea. Presentano anche una bassa alterazione del pH circostante durante la loro dissoluzione, garantendo ottime proprietà di citocompatibilità. Le caratteristiche strutturali tipiche della silice mesoporosa favoriscono, invece, il caricamento di agenti terapeutici (quali ioni e/o farmaci) inducendo proprietà terapeutiche specifiche, come pro-osteogenicità, pro-angiogenicità e/o antibattericità.

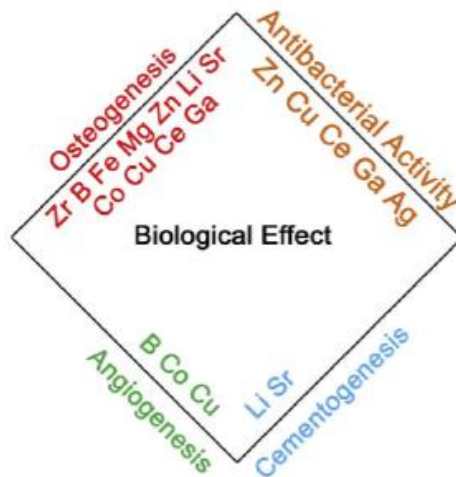


Figura 9: La figura mostra gli ioni che è possibile incapsulare negli MBG e rispettivamente il loro effetto biologico

La sintesi degli MBG prevede i medesimi meccanismi validi per la sintesi delle silici mesopore, come mostrato nella figura 10.

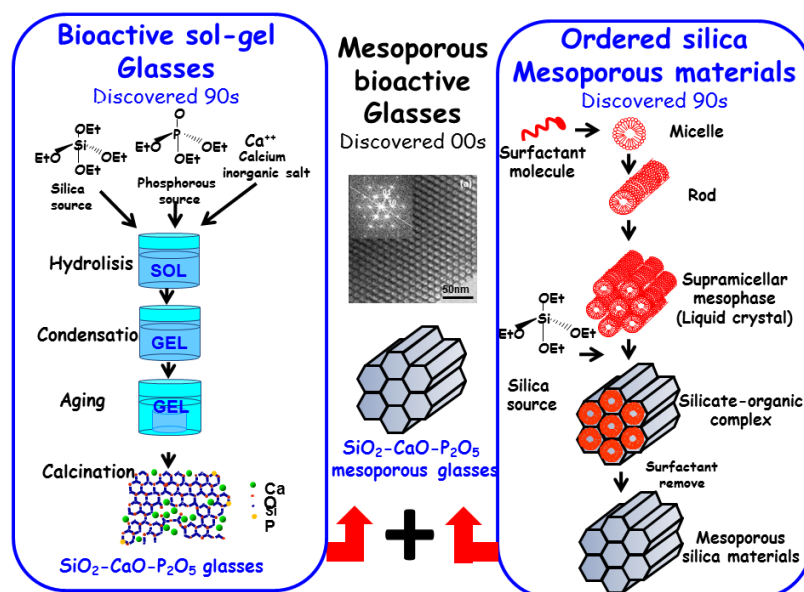


Figura 10: Confronto di tecniche di sintesi tra vetri bioattivi e vetri bioattivi mesopore [28]

In particolare, una delle tecniche maggiormente utilizzate per la sintesi dei vetri bioattivi mesopore è quella di autoassemblaggio indotto da evaporazione (EISA), come mostrato in figura 10. Con questa tecnica si utilizza l'evaporazione di un solvente per raggiungere la concentrazione

micellare critica dei tensioattivi, consentendo così la formazione di una fase liquido-cristallina. A seguito di tale processo, avviene la condensazione dei precursori inorganici intorno alla struttura micellare. Tramite un trattamento termico di calcinazione viene infine rimosso il surfattante[13][29], ottenendo la struttura mesoporosa.

La tecnica EISA è semplice, efficiente e consente di regolare facilmente le caratteristiche del prodotto finale attraverso il controllo di alcuni parametri fisici, come la temperatura, il tempo e l'umidità relativa e chimici come la composizione della miscela di sintesi ed il pH. La maggiore criticità associata a questo approccio di sintesi consiste nella morfologia delle particelle ottenute, che non presentano forma regolare, in quanto ottenute per macinazione.

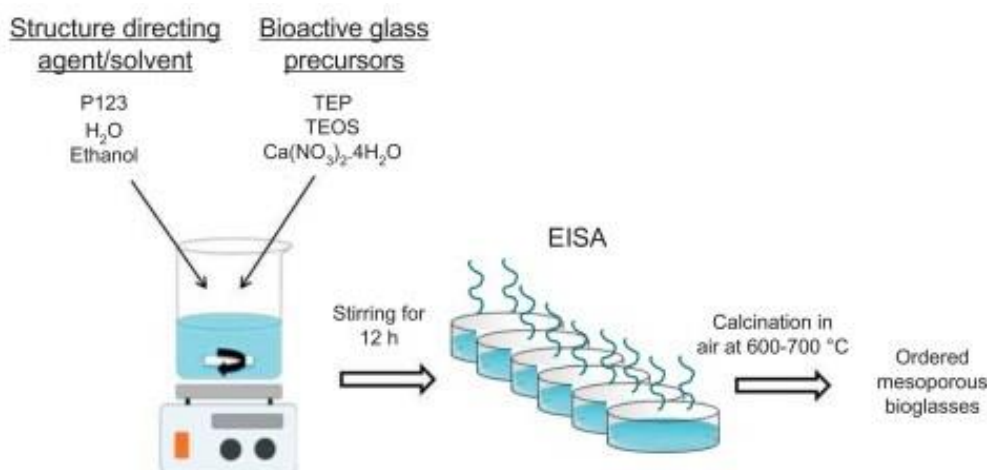


Figura 11: Processo EISA (meccanismo di sintesi per gli MBG)

In una tipica sintesi degli MBG, si parte da una soluzione omogenea contenente surfattante (solitamente CTAB, F127 o P123), precursori delle specie inorganiche (come ad esempio il TEOS, il TEP e il $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), solvente volatile (solitamente etanolo), acqua e un catalizzatore (come l'HCl). Questa viene posta in agitazione su uno stirrer e dopo di che viene trasferita in un disco di Petri dove avviene il processo EISA. Al termine del processo si ottiene il gel, che viene dapprima essiccato e successivamente calcinato per rimuovere il surfattante (Figura 8).

In questo lavoro di tesi, sono stati sintetizzati vetri bioattivi mesoporosi utilizzando due tecniche differenti che, rispetto al processo EISA, permettono di controllare con maggior precisione la morfologia e la taglia delle particelle ottenute, consentendo così di sviluppare sistemi più affidabili e riproducibili. La prima sintesi realizzata è di tipo sol-gel condotta in ambiente basico utilizzando, come surfattante, il CTAB mentre la seconda è una tecnica sol-gel accoppiato all'utilizzo di uno spray-drying che consiste nell'evaporare molto rapidamente una soluzione di sintesi in ingresso grazie ad un carrier gassoso ad alta temperatura. Nel primo caso si ottengono particelle con forma sferoidale di dimensioni comprese nel range 60-200 nm mentre nel secondo caso le particelle presentano la medesima forma ma con dimensioni maggiori comprese fra 0.5 e 5µm.

Parametri	BG	MBG
Area superficiale [m^2/g]	100-250	200-600
Volume dei pori [cm^3/g]	0.2-0.4	0.5-0.7

Tabella 1: Confronto tra vetri bioattivi e vetri bioattivi mesoporosi

Le differenze tra i vetri bioattivi sol-gel e i vetri mesoporosi bioattivi sono relative ad un aumento significativo dell'area superficiale e ad un volume poroso maggiore. I valori caratteristici di BG e MBG sono riportati nella tabella seguente.

Confrontando i dati esposti nella tabella, con quelli presenti nel capitolo della silice mesoporosa, è possibile affermare che i vetri bioattivi mesoporosi presentano proprietà intermedie tra quelle dei vetri bioattivi e quelle della silice mesoporosa.

Inoltre, i vetri bioattivi mesoporosi, esibiscono un comportamento bioattivo migliore rispetto ai biovetri. Infatti, mentre i vetri ottenuti tramite tecnica di fusione e sol-gel mostrano un comportamento bioattivo in presenza di ioni fosfato nella soluzione circostante (SBF), dopo 7-3 giorni rispettivamente, i vetri bioattivi mesoporosi esibiscono il medesimo comportamento dopo solo 4 ore. Per questo motivo i vetri bioattivi mesoporosi dimostrano un enorme potenziale per la rigenerazione ossea. [11]

Un'altra peculiarità tipica degli MBG è la possibilità di essere funzionalizzati, sia durante la sintesi del materiale, (metodo *one-pot*), sia in una fase successiva ad essa (funzionalizzazione post sintesi), grazie all'elevata densità di silanoli presenti nelle pareti interne dei pori o sulla superficie.

La differenza principale tra i due i metodi è lo stadio di addizione del precursore funzionalizzante. Nei metodi *one-pot*, i gruppi organici R sono legati agli atomi di silicio situati nelle pareti di silice; riducendone il grado di funzionalizzazione. Al contrario, nei metodi post-sintesi gli agenti modificanti essendo situati sulla superficie esterna assicurano un grado maggiore di funzionalizzazione [33].

Inoltre, tramite funzionalizzazione, è possibile creare, modificare la superficie, incrementando ulteriormente il potenziale terapeutico degli MBG. La funzionalizzazione zwitterionica, ad esempio, è stata ampiamente studiata per progettare superfici con capacità antiadesive[30]. Le superfici zwitterioniche sono caratterizzati da un numero uguale di cariche positive e negative e le proprietà antiadesive sono impartite da uno strato di molecole d'acqua che funge da barriera contro l'adsorbimento di proteine e batteri. Infatti, la presenza di uno spesso strato di idratazione consente alle proteine e ai batteri di preservare una conformazione stabile quando si avvicinano alla superficie del substrato, evitando così l'adsorbimento irreversibile[31]. Negli ultimi decenni, la funzionalizzazione zwitterionica è stata ampiamente studiata dalla comunità scientifica nell'ambito della rigenerazione ossea, in quanto la resistenza all'adesione batterica e di proteine aspecifiche permette di inibire gli stadi iniziali della formazione del biofilm.

Infine, uno dei vantaggi della funzionalizzazione è il controllo della cinetica di rilascio dei farmaci caricati all'interno delle matrici MCM-41. In caso di ibuprofene, che contiene un gruppo acido, la funzionalizzazione delle matrici MCM-41 con gruppi aminopropile causa una riduzione della cinetica di rilascio.

1.5 Scopo del lavoro

Ad oggi, una delle sfide più importanti nell'ambito della terapia in seguito ad infezione ossea, è la progettazione di biomateriali in grado di proteggere, trasportare e rilasciare agenti antimicrobici in modo controllato direttamente al sito patologico di interesse. In questa prospettiva, la somministrazione mirata di farmaci, attraverso l'utilizzo di nanocarriers, è uno degli approcci più interessanti per il trattamento di infezioni batteriche. A tal scopo, il rilascio simultaneo di agenti antibatterici e fattori di crescita nei siti dei tessuti danneggiati, è efficace sia per inibire la patologia, sia per stimolare la rigenerazione ossea.

Tra i vari biomateriali presenti, i vetri bioattivi mesoporosi (MBGs), sono ottimi candidati come sistemi di rilascio di farmaci ad azione mirata. Essi presentano delle eccellenti proprietà in termini di: elevata area superficiale specifica, elevato volume e struttura regolabile dei pori e superfici, facilmente funzionalizzabili, grazie alla presenza di gruppi silanoli (Si-OH). Le caratteristiche fornite da questi biomateriali (MBG), garantiscono un'elevata efficienza di rilascio, un'azione terapeutica continua, una ridotta tossicità e un miglioramento di vita per i pazienti.

In contrapposizione agli aspetti positivi suggeriti da questo nuovo approccio [32][11], sono stati evidenziati anche delle criticità, come un rapido burst release, che non consente un rilascio sostenuto di farmaci e ioni, scarse proprietà meccaniche e impossibilità di essere impiantati da soli nel sito di interesse. Proprio da quest'ultima peculiarità, nasce l'idea di combinare i vetri bioattivi mesoporosi con una fase veicolante, per creare uno scaffold tridimensionale che possa favorire il processo di guarigione in vivo.

Una possibile strategia di intervento, per curare le infezioni batteriche è stata proposta dal gruppo di lavoro della prof.ssa Vallet-Regi[33]. Si tratta di scaffold 3D multifarmaco, in grado di evitare la crescita batterica, la resistenza ai farmaci e altri effetti collaterali. I farmaci caricati all'interno sono agenti antimicrobici, la rifampicina, la levofloxacina e la vancomicina; sono stati inseriti in parti diversi dello scaffold per ottenere delle cinetiche di rilascio differenti e per far sì che la terapia combinata sia più efficace. I risultati ottenuti mostrano delle cinetiche di rilascio veloci per la rifampicina, mentre un profilo di rilascio prolungato per la vancomicina e levofloxacina. Questa terapia combinata è in grado di inibire la crescita e distruggere i batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Inoltre, questi scaffold esibiscono un'eccellente bioattività e una buona biocompatibilità, garantendo una buona rigenerazione ossea.

In questo contesto, il presente lavoro di tesi ha come principale obiettivo la progettazione di innovative matrici multifunzionali e intelligenti per favorire la rigenerazione ossea, compromessa in caso di infezioni batteriche. Lo scopo principale è quello di conferire al materiale proprietà sinergiche in termini di azioni antiadesive, mediante funzionalizzazione superficiale zwitterionica, e antibatteriche, grazie alla presenza di precursori di ioni rame inseriti in fase di sintesi del materiale e al caricamento del farmaco rifampicina nella struttura mesoporosa.

A tal scopo, tra i vari materiali ampiamente studiati in letteratura, il presente lavoro di tesi è focalizzato nello studio e sintesi di vetri bioattivi mesoporosi (MBGs) contenenti ioni rame, selezionati grazie alla loro eccellente bioattività, tipica dei vetri bioattivi, e alle promettenti caratteristiche strutturali, tipiche della silice mesoporosa. Gli MBGs sono stati resi multifunzionali grazie alla sinergia tra azione antiadesiva (proprietà superficiale) e antibatterica (proprietà bulk).

In questa prospettiva, la funzionalizzazione zwitterionica è stata individuata come approccio innovativo e promettente al fine di rendere antiadesiva la superficie dei MBG, conferendole un comportamento elettricamente neutro, grazie alla presenza di ugual numero di cariche positive e negative, date dall'esposizione di gruppi superficiali -COO^- e -NH_3^+ ottenuti rispettivamente dall'impiego di agenti funzionalizzanti quali CES e APST.

Le proprietà antibatteriche invece sono date dall'azione combinata tra farmaco antibatterico rifampicina e i precursori dello ione rame, al fine di mitigare la resistenza dei ceppi batterici (es. *E.coli* e *S.aureus*) all'antibiotico.

Il farmaco rifampicina è stato appositamente selezionato in quanto agisce uccidendo i batteri sensibili alla sua azione, o bloccandone la crescita attraverso l'inibizione delle sintesi del RNA.

L'innovazione del presente lavoro di tesi è data dall'inserimento dello ione rame durante la fase di sintesi, selezionato grazie alle sue elevate proprietà antibatteriche e pro-angiogeniche. La concentrazione usata pari a 2%, è stata scelta da studi precedenti[27] come finestra terapeutica più idonea al fine di limitare le elevate proprietà citotossiche tipiche del rame.

Il presente studio è stato svolto presso il gruppo di ricerca "*Biomaterials Laboratory-Gruppo IRIS*" - dipartimento DISAT, del Politecnico di Torino, in collaborazione con il dipartimento di chimica inorganica dell'università Complutense di Madrid.

La sintesi dei vetri bioattivi mesoporosi (MBGs) è stata effettuata presso i laboratori DISAT del Politecnico di Torino, utilizzando due tecniche, quali il metodo sol-gel in ambiente basico e sol-gel accoppiato all'uso della tecnica spray-drying, dove in entrambe, in fase di sintesi, è stato inserito il precursore ione rame alla concentrazione 2% molare. A seguire è stata effettuata la funzionalizzazione zwitterionica delle superfici dei MBGs. Successivamente, per potenziarne l'effetto terapeutico antibatterico, i campioni sono stati caricati con rifampicina.

Le matrici sintetizzate, funzionalizzate e infine caricate con farmaco, sono state poi analizzate mediante diverse tecniche di caratterizzazione aventi l'obiettivo di indagare le proprietà strutturali, tramite la tecnica di adsorbimento e desorbimento di azoto, studiarne la morfologia attraverso la microscopia elettronica a scansione ed emissione di campo (FESEM), la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), e le caratteristiche composizionali con la tecnica di spettroscopia a dispersione di energia (EDS), la spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FTIR), la spettroscopia ad emissione atomica al plasma accoppiato induttivamente (ICP) e mediante analisi termogravimetrica (TGA).

Presso l'università Complutense di Madrid sono stati effettuati i test di rilascio degli ioni rame e della rifampicina, per valutarne sia l'aspetto antibatterico che per osservarne la cinetica di rilascio. Inoltre, per studiare le proprietà antibatteriche del rame, sono stati condotti dei test antibatterici in modelli planctonici, con l'utilizzo dei batteri *Escherichia.Coli* e *Stafilococco.Aureus*.

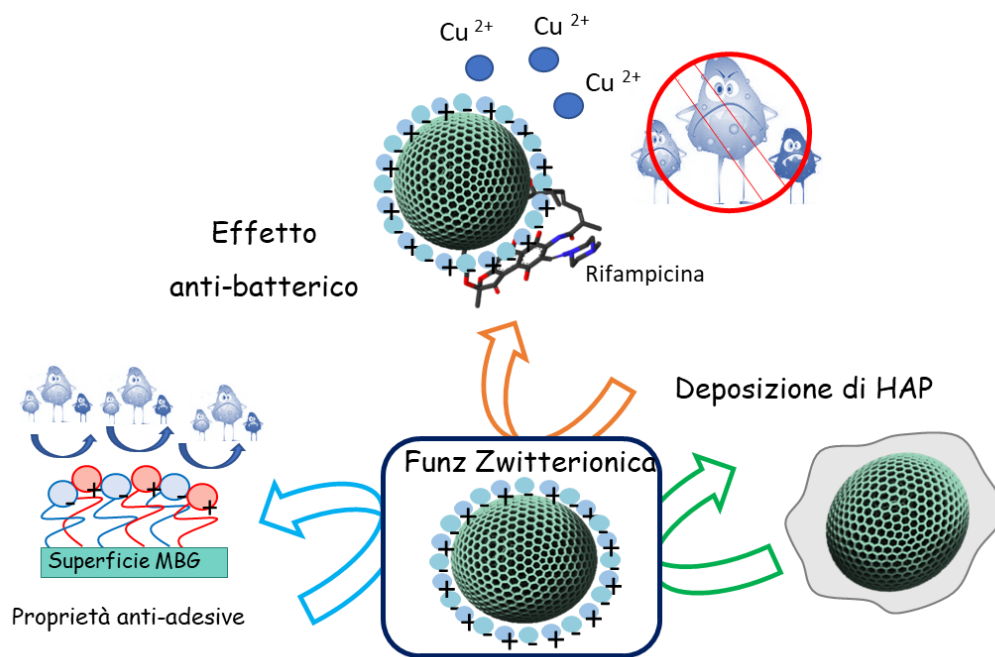


Figura 12: Proprietà dei vetri bioattivi mesoporosi con funzionalizzazione zwitterionica

Capitolo 2 – Materiali e metodi

In questo lavoro di tesi, sono stati prodotti dei vetri bioattivi mesoporosi utilizzando due procedure di sintesi differenti che, a differenza del processo EISA, consentono di controllare la morfologia delle particelle ottenute, permettendo quindi di sviluppare sistemi più affidabili e riproducibili.

Sono state sintetizzate delle matrici mesoporose, con composizione binaria a base $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, contenenti precursori di ioni rame al 2% mol mediante due procedure differenti: la prima realizzata è di tipo sol-gel condotta in ambiente basico, mentre la seconda è di tipo sol-gel accoppiata all'utilizzo di uno spray dryer. Nel primo caso si ottengono particelle con forma sferoidale di dimensioni comprese tra 60-200 nm mentre nel secondo caso le particelle presentano la medesima forma ma con dimensioni maggiori comprese fra 0.5 e 5 μm .

La superficie dei MBGs è stata poi funzionalizzata, sfruttando la chimica dei silani, per ottenere una superficie zwitterionica, che prevede un numero uguale di cariche positive e negative, mostrando così un comportamento elettricamente neutro. Questa funzionalizzazione favorisce un'alta resistenza all'adsorbimento proteico aspecifico, all'adesione batterica e quindi, alla formazione di biofilm.

Oltre ad arricchire le matrici con ioni terapeutici, sono state sfruttate le caratteristiche mesoporose delle matrici per incorporare la rifampicina, farmaco con azione antibiotica.

Successivamente, le matrici sintetizzate, poi funzionalizzate e infine caricate con farmaco, sono state analizzate mediante diverse tecniche di caratterizzazione aventi l'obiettivo di indagare le proprietà strutturali, quelle morfologiche e quelle composizionali.

Come ultimi test, sono stati eseguiti il test di rilascio per valutare la cinetica con la quale viene rilasciata la rifampicina, e gli ioni rame. Successivamente sono stati effettuati i saggi antibatterici in modelli planctonici per verificare il comportamento antibatterico delle matrici sviluppate.

2.1 Sintesi di matrici bioattive contenenti ioni rame

Sono stati sintetizzati vetri bioattivi mesoporosi con composizione $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ contenenti ioni rame con percentuale molare del 2%, mediante due procedure: sol-gel in ambiente basico (SG) e sol-gel accoppiata all'utilizzo di uno spray-drier (SD).

2.2.1 Matrici nanometriche bioattive: sintesi sol-gel in ambiente basico

In questo lavoro di tesi la procedura sol-gel usata per la produzione di nanomatrici mesoporose fa riferimento ad uno studio condotto da Wu et al [34] e dal gruppo di ricerca di Vallet-Regi [35].

La procedura è stata modificata introducendo il 2% di rame e la composizione molare ottenuta è la seguente: **85 SiO_2 /13 CaO /2 CuO** .

I reagenti utilizzati sono mostrati nella tabella 1:

Precursore della silice	Tetraetil-ortosilicato (TEOS- $C_8H_{20}O_4Si$, $\geq 98\%$, Sigma Aldrich)	30 mL
Precursore dell'ossido di calcio	Nitrato di calcio tetraidrato (CaNT – $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 99%, Sigma Aldrich)	4.88 g
Tensioattivo	(CTAB - $C_{19}H_{42}BrN$, $\geq 98\%$, Sigma Aldrich)	6.6 g
Solvente polare	Acqua ultra-pura (H_2O)	600 mL
Precursore dello ione rame	Cloruro di rame ($CuCl_2$, 99%, Sigma Aldrich)	0.428 g
Catalizzatore basico	Idrossido di ammonio (NH_4OH , Sigma Aldrich)	12 mL

Tabella 1: Reagenti e relative quantità per la sintesi sol-gel

La metodologia utilizzata è la seguente:

1. Dissolvere 6.6 g di CTAB e 12 mL di NH_4OH in 600 mL di acqua ultra-pura, utilizzando un agitatore magnetico;
2. Trascorsi 30 minuti, sempre sotto agitazione, aggiungere 30 mL di TEOS. Per le quantità da aggiungere di CaNT e $CuCl_2$ seguire la tabella 1;
3. Dopo 3 ore di agitazione meccanica, centrifugare (*Hermle Labortechnik Z326*) la soluzione del punto 2. Impostare una velocità di rotazione pari a 10000 rpm per 5 minuti, in seguito effettuare dei lavaggi una volta con acqua bidistillata e due volte con etanolo assoluto in modo da rimuovere l'idrossido di ammonio;
4. Raccogliere il precipitato in un disco di Petri e lasciarlo asciugare a 70° per 12 ore in stufa;
5. Infine, rimuovere il tensioattivo mediante calcinazione, avvenuta in un forno a camera (*Carbolite 1300 CWF 15/5*) a 600° per 5 ore con una rampa di riscaldamento e di raffreddamento di $1^\circ C/min$ e $10^\circ C/min$ rispettivamente.

2.2.2 Matrici micrometriche bioattive: sintesi sol-gel accoppiata all'utilizzo della tecnica spray-drying

Questa tecnica viene anche chiamata essiccamento per atomizzazione, ed è uno dei metodi più usati per la produzione di un materiale secco, a partire da una soluzione o sospensione acquosa.

Il fluido viene essiccato e ridotto, sotto forma di particelle solide uniformi mediante l'utilizzo di un gas caldo (normalmente aria o azoto).

Il processo spray-drying è composto da quattro fasi[36]:

- Atomizzazione della corrente
- Contatto aria-spray
- Essiccamento dello spray
- Separazione del prodotto secco dall'aria

Nel primo step dell'**atomizzazione**, si ha la dispersione di una soluzione sotto forma di particelle fini dette aerosol.

Nel secondo step il **contatto** tra aria e spray può avvenire attraverso tre differenti configurazioni: equicorrente, controcorrente e a flusso misto. La scelta della configurazione utilizzata condiziona la dimensione della particella, la densità finale del prodotto, la massima temperatura a cui la polvere è sottoposta e il tempo di residenza.

Il terzo step riguardante l'**essiccamento** dello spray si svolge in due fasi successive: la prima, a velocità costante, finché la superficie della goccia viene mantenuta umida dall'umidità proveniente dal suo interno, mentre la seconda, avviene a velocità decrescente e si ha la formazione di un guscio solido essiccato in superficie.

Le caratteristiche chimico-fisiche della sostanza da essiccare e il tipo di camera di essiccamento condizionano la forma e la porosità delle particelle.

Come ultimo step si ha la **separazione del prodotto**; questo processo inizia nella camera di essiccamento, dove è possibile raccogliere le particelle più grosse, per poi terminare con l'uso di un separatore secco e umido: il primo separa le particelle più fini dalla corrente di aria e il secondo purifica l'aria in uscita.

Questa tecnica presenta molti vantaggi, infatti la dimensione regolabile delle particelle ottenute può essere regolata a seconda del tipo di ugello usato, la qualità delle polveri si mantiene costante per l'intero processo, l'operazione risulta facile da gestire e continua e permette l'impiego di sostanze termolabili.

In questo lavoro di tesi, il dispositivo usato per lo Spray drying è il *Mini Spray Dryer B-290 BÜCHI*, riportato in figura 1; in particolare, questo strumento prevede l'atomizzazione del feed attraverso un ugello a doppio fluido, all'interno del quale fluiscono sia la soluzione, pulsata da una pompa rotativa peristaltica, che l'azoto ad alta temperatura. L'ugello adoperato è costituito da una punta con un foro avente diametro di 0.7 mm e da un coperchio con diametro 1.4 mm.

L'azoto riscaldato, posto all'interno della camera del cilindro di atomizzazione, viene spruzzato nella stessa direzione del prodotto atomizzato (flusso co-corrente) e questo, unitamente all'elevata area superficiale della goccia, permette di ottenere un intenso trasferimento di calore, favorendo l'evaporazione del liquido. Per mezzo dell'azione esercitata dall'aspiratore, le particelle vengono trasportate dal cilindro al ciclone dove avviene la separazione del prodotto dalla corrente del gas. Le particelle essiccate, così ottenute, vengono raccolte nell'apposito recipiente di raccolta, mentre l'azoto passa attraverso un filtro che permette di raccogliere il particolato più fine[37].



Figura 1: Mini Spray Dryer B-290 BÜCHI

Anche in questo caso, si ottengono particelle con la seguente composizione: **85 SiO₂ / 13 CaO/2 CuO**.

I reagenti utilizzati in questa sintesi sono illustrati nella seguente tabella:

Precursore della silice	Tetraetil-ortosilicato (TEOS-C ₈ H ₂₀ O ₄ Si, ≥98%, Sigma Aldrich)	10.73 g
Precursore dell'ossido di calcio	Nitrato di calcio tetraidrato (CaNT – Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O, 99%, Sigma Aldrich)	1.86 g
Tensioattivo	Pluronic P123 (EO20PO70EO20, Mn ~5,800, Sigma Aldrich)	2.030 g
Solvente polare	Acqua ultra-pura (H ₂ O)	85 g
Precursore dello ione rame	Cloruro di rame (CuCl ₂ , 99%, Sigma Aldrich)	0.163 g
Catalizzatore acido	Acido cloridrico (HCl a pH 2).	5 g

Tabella 2: Reagenti e relative quantità della tecnica spray-drying

La procedura utilizzata prevede i seguenti passaggi[37]:

1. Preparare una prima soluzione in cui 2.030 g di Pluronic si disciolgono in 85 g di H₂O ultra-pura, attraverso l'utilizzo di un agitatore meccanico;

2. Preparare una seconda soluzione in cui 10.73 g di TEOS vengono uniti a 5 g di HCl, sempre utilizzando l'agitazione meccanica in modo da promuovere l'idrolisi del precursore della silice;
3. Mantenere entrambe le soluzioni in agitazione meccanica per 3 ore, oppure fino a quando le soluzioni non appaiono limpide;
4. Passate le 3 ore, versare goccia a goccia la seconda soluzione nella prima e mantenere la nuova soluzione in agitazione per un'ora;
5. Aggiungere alla soluzione ottenuta allo step 4, il precursore dello ione rame secondo le quantità presenti nella tabella 3, mantenendo il sistema in agitazione per circa 10/15 minuti;
6. Passati 10/15 minuti aggiungere il CaNT e lasciare in agitazione il sistema per 15 minuti;
7. Spruzzare la soluzione usando l'azoto come gas atomizzante e impostare la temperatura del gas in ingresso pari a 220° C, la portata percentuale in uscita dell'aspiratore pari al 100%, la portata percentuale in uscita della pompa pari al 10% e una frequenza di pulizia dell'ugello pari a 5.
8. Le polveri ottenute vengono raccolte e poste in un forno a camera, (*Carbolite 1300 CWF 15/5*) a 600° per 5 ore con una rampa di riscaldamento di 1°C/min e una di raffreddamento di 10°C/min, per il processo di calcinazione.

2.2 Funzionalizzazione di matrici bioattive contenenti ioni rame

In questo lavoro di tesi, la funzionalizzazione della superficie dei vetri bioattivi mesoporosi è stata condotta attraverso la chimica dei silani e si è posta come obiettivo quello di ottenere una superficie zwitterionica[38].

Il processo di zwitterizzazione è stato ampiamente sfruttato e proposto come uno degli approcci più promettenti, per progettare superfici con azione antiadesiva e antibatterica.

Per entrambe le sintesi, sol-gel e spray-drying, il processo di funzionalizzazione post-sintesi eseguito è il medesimo[31]:

1. Pesare 600 mg di SG 2% Cu e SD 2% Cu in un pallone a tre colli;
2. Degasare le polveri per 24 ore;
3. Per effettuare la funzionalizzazione usare la linea Schlenk, mostrata in figura 2 (dx): collegare dapprima il pallone a 3 colli alla linea Schlenk e successivamente porlo a bagnomaria a 70°C sopra uno stirrer;
4. Effettuare 3 cicli di vuoto/N₂ con la linea Schlenk;
5. Aggiungere nel pallone a 3 colli 50 mL di etanolo e 540 µL di APST (3-aminopropylsilanetriol, 22–25% in acqua, ALFA Chemistry);
6. Dopo 30 minuti, aggiungere 180µL di CES (carboxyethylsilanetriol sodium salt, 25% vol in acqua, Carbosynth Limited);
7. Lasciare in agitazione per 24 ore. Infine, trascorse le 24 ore effettuare 3 lavaggi con etanolo e seccare in stufa a vuoto overnight la polvere ottenuta.

La quantità di agente funzionalizzante da inserire è stata dapprima calcolata mediante il numero di Zhuravlev (4.9 silanoli per nanometro quadrato), conoscendo l'area superficiale dei campioni e successivamente modificata, sulla base di studi precedenti[31], per ottenere superfici elettricamente neutre. I due agenti funzionalizzanti (APTS e CES) sono in rapporto 3:1 tra loro.

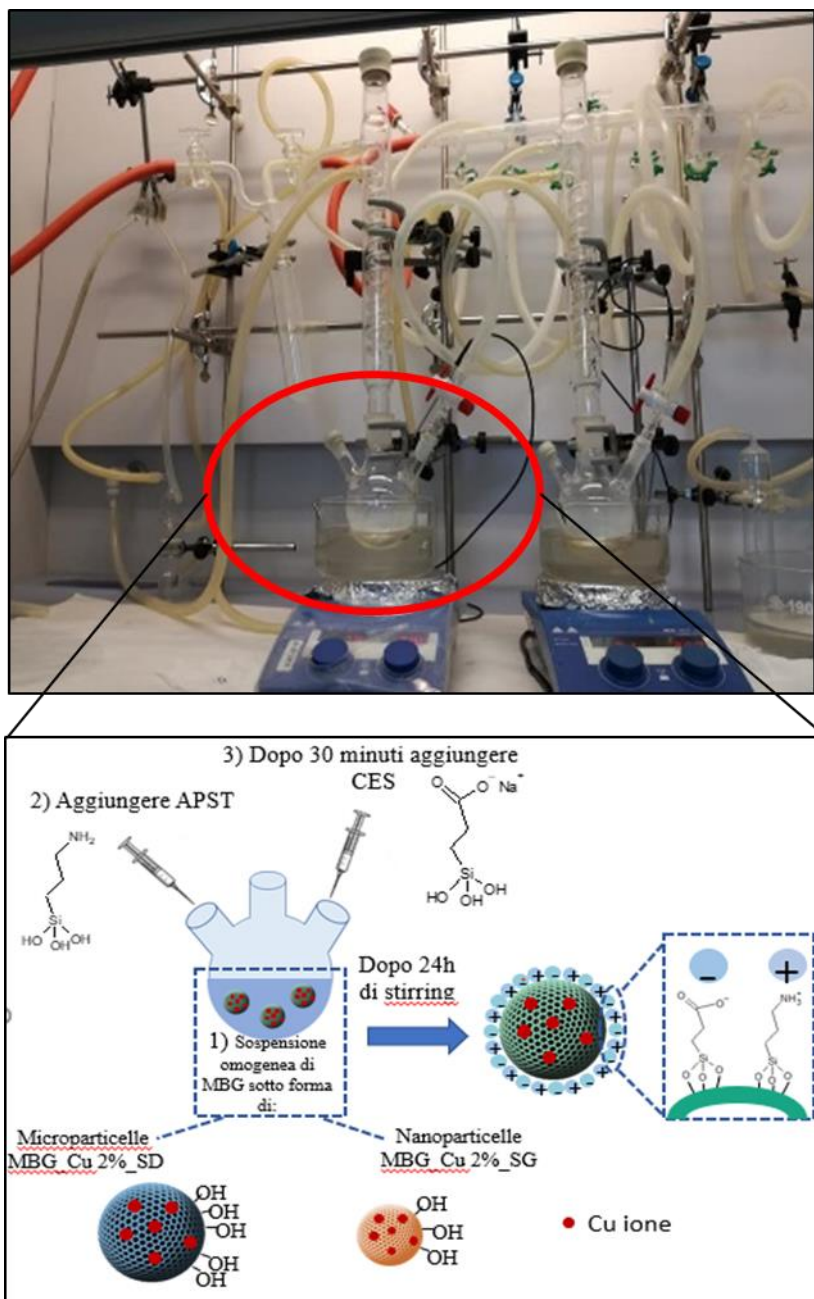


Figura 2: Linea Schlenk e metodo di funzionalizzazione

2.3 Incorporazione di rifampicina all'interno delle matrici

Nelle matrici prodotte, e in seguito funzionalizzate al loro interno è stata caricata la rifampicina ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, Sigma Aldrich), attraverso la procedura dell'impregnation method (figura 3).

Questa metodologia consiste nell'immergere i vetri bioattivi mesoporosi in una soluzione altamente concentrata contenente il farmaco e successivamente nell'essiccazione delle polveri caricate con la rifampicina[18]. I vantaggi offerti da questa tecnica sono da ricercare nella sua semplicità e nella sua efficienza; al contrario presenta delle limitazioni dovute alla possibile aggregazione di farmaco al di fuori del materiale, dando luogo solo ad un carico parziale di quest'ultimo all'interno dei pori.

La procedura usata fa riferimento ad uno studio condotto dal gruppo di ricerca di Vallet-Regi[33] ed è la stessa per tutti e quattro i campioni (SD, SD-funzionalizzata con APST e CES, SG, SG-funzionalizzata con APST e CES):

- Pesare 0.150 g di campione in una vial di vetro (A);
- Pesare 0.0822 g di rifampicina in una vial di vetro da 35 mL;
- Nella vial contenente la rifampicina aggiungere 20 mL di diclorometano (Sigma Aldrich), (B);
- Aggiungere nella vial contenente il campione (A) 5 mL di soluzione con rifampicina (B).
- Lasciare in agitazione per 4 ore;
- Passate le 4 ore, filtrare le soluzioni con un filtro di cellulosa da 0.22 μm , utilizzando un matraccio e una pompa. Dopo aver filtrato effettuare due lavaggi con diclorometano;
- Finito il lavaggio, mettere il filtro in un disco di Petri e porlo in stufa a 37° overnight.

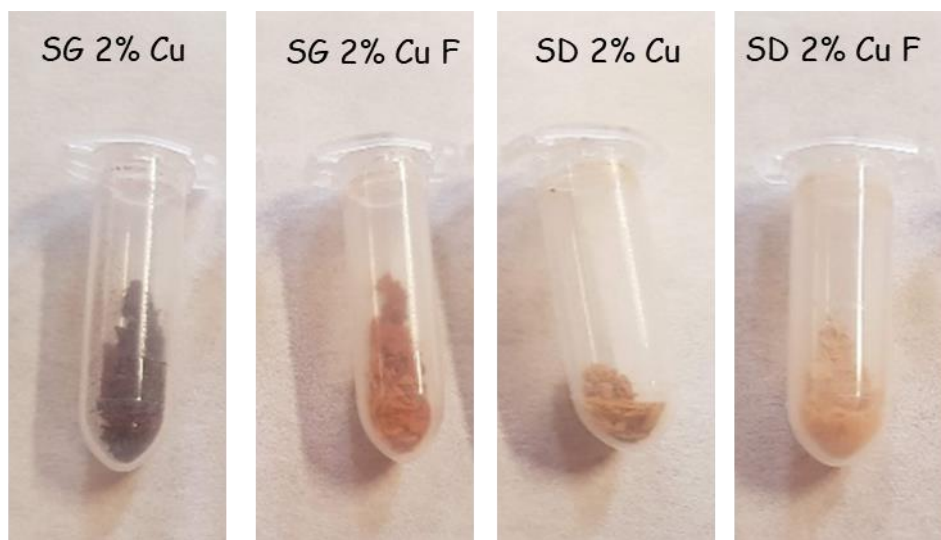


Figura 3: Campioni caricati con rifampicina, da sx a dx sono i seguenti: (SG 2 Cu, SG 2% Cu F, SD 2% Cu, SD 2% Cu F)

2.4 Metodi di caratterizzazione

2.4.1 Adsorbimento e desorbimento di azoto

Questa tecnica serve per ottenere informazioni riguardanti l'area superficiale e la porosità del materiale.

A determinare il volume adsorbito, contribuiscono sia la pressione alla quale si verifica l'adsorbimento che la natura del gas[39].

In una situazione ideale, quando la pressione è prossima allo zero, le molecole presenti sono poche e si muovono senza un ordine preciso; aumentando la pressione aumentano di conseguenza anche le molecole presenti e questo favorisce la probabilità che avvenga un fenomeno di adsorbimento sulla superficie.

Se si continua ad aumentare la pressione, si ha la creazione di un monostrato di particelle adsorbite sulla superficie e un ulteriore aumento di quest'ultima porta alla formazione di multistrati di particelle.

Ad una determinata pressione, aumentando l'area superficiale, aumenta anche la quantità di molecole, fondamentali per la formazione del monostrato e degli strati successivi.

Se la superficie in esame è reale si ha la presenza di pori e rugosità superficiale. Analizzando il comportamento del monostrato in adsorbimento e in desorbimento si possono dedurre informazioni relative alla struttura dei pori e all'area superficiale.

Durante la fase di adsorbimento, i pori si riempiono formando prima un monostrato e in seguito formandone altri uno sull'altro, fino a livellarne la superficie; tale comportamento non subisce modifiche sia in presenza di micro- (diametro inferiore ai 2 nm), meso- (diametro compreso tra i 2 e i 50 nm) o macropori (diametro maggiore di 50 nm), al contrario nel processo di desorbimento i pori non tendono a svuotarsi un monostrato alla volta, ma a menisco, lasciando così un sottile monostrato superficiale che viene rimosso in seguito alla completata eliminazione delle molecole di gas[39].

Diagrammando il volume di gas adsorbito, riferito all'unità di massa [cm^3/g] in funzione del rapporto tra la pressione parziale del gas (p) e la sua pressione di saturazione (p_0), si ottiene l'isoterma di adsorbimento; il diverso comportamento tra adsorbimento e desorbimento fa sì che nella curva compaia un'isteresi.

Dall'isoterma di adsorbimento è possibile quantificare il volume del monostrato adsorbito, che può essere definito come la quantità di gas adsorbito necessario a coprire con un monostrato molecolare la superficie.

In base alla classificazione IUPAC, le isoterme, come mostrato nella figura 4, possono avere sei forme diverse in funzione delle dimensioni dei pori dell'adsorbente e dalla temperatura del sistema[12].

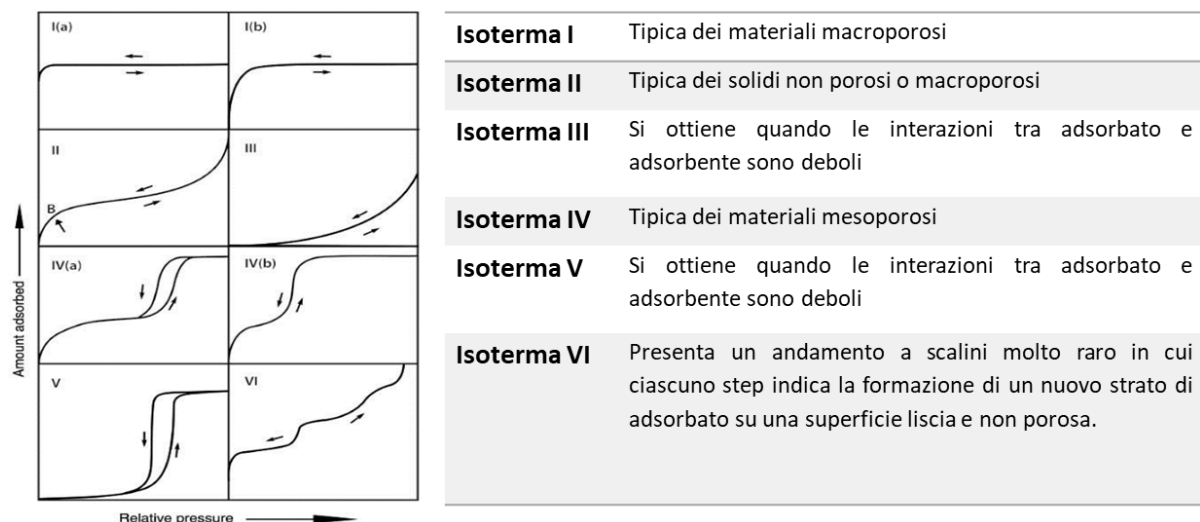


Figura 4: Classificazione delle VI isoterme secondo la nomenclatura IUPAC

In questo lavoro di tesi per descrivere l'adsorbimento su superfici da fase vapore è stata usata l'isoterma di BET (Brunauer– Emmett–Teller), sviluppata nel 1938, che considera l'adsorbimento multistrato. Studiando la curva, si riesce ad ottenere una stima più o meno accurata dell'area superficiale coinvolta durante l'adsorbimento.

La formula di BET è la seguente[40]:

$$\frac{p}{V(p_0 - p)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c - 1}{V_m c} \frac{p}{p_0}$$

Equazione 1: Descrive un'isoterma di adsorbimento

Dove:

- V è il volume di gas adsorbito in condizioni standard (temperatura pari a 273,15 K e pressione atmosferica pari a 1.013×10^5 Pa) ed è espresso in mL;
- V_m è il volume del monostrato di gas adsorbito sulla superficie del campione in condizioni standard ed è espresso in mL;
- c è la costante adimensionale relativa all'entalpia di adsorbimento del gas adsorbito.

Graficando il membro sulla sinistra dell'equazione 1, in funzione della pressione relativa, si ottiene una linea retta nel range di pressioni comprese fra 0,05 e 0,3; dalla retta è possibile ottenere il coefficiente angolare (A) e l'intercetta (I) utili a calcolare il volume del monostrato di gas (V_m) come segue[12]:

$$V_m = \frac{1}{A + I}$$

Equazione 2: Formula per calcolare il volume del monostrato di gas

Ricavato il volume del monostrato di gas adsorbito è possibile calcolare l'area superficiale specifica mediante la seguente relazione [6]:

$$S_{BET} = \frac{\sigma \cdot N_A \cdot V_m}{v}$$

Equazione 3: Formula per calcolare l'area superficiale specifica

Dove:

- S_{BET} è l'area specifica superficiale espressa in m^2/g ;
- σ è l'area trasversale occupata da una molecola di gas nel monolayer ($13,5 \text{ \AA}$ per l'azoto);
- N_a è il numero di Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$);
- v è il volume molare del gas adsorbito (22414 mL/mol per l'azoto).

Oltre all'area superficiale, è possibile ricavare la distribuzione dimensionale dei pori, che nel caso della presente tesi è stata ottenuta applicando il metodo della DFT (Density Functional Theory).

Durante lo svolgimento di questo lavoro di tesi, per effettuare questo tipo di analisi, è stato utilizzato lo strumento *ASAP2020 della Micrometrics* e le isoterme di adsorbimento e desorbimento sono state ricavate utilizzando come adsorbato l'azoto ad una temperatura di -196°C .

Prima di procedere con l'analisi, il campione è stato inserito all'interno di una buretta di vetro, degasato e contemporaneamente riscaldato in modo da rimuovere eventuali tracce di gas adsorbiti sul campione. In base al tipo di materiale utilizzato, viene scelta la temperatura di degasaggio; infatti nel caso delle matrici contenenti ioni rame è stata posta pari a 150°C . Effettuato il degasaggio, il campione viene poi sottoposto ad una pressione via via crescente di azoto, mediante lo spostamento graduale di una trappola contenente azoto liquido (dewar). Terminata la misura, durante la fase di desorbimento, lo strumento restituisce l'isoterma associata al campione.

2.4.2 Microscopia elettronica a scansione ed emissione di campo (FESEM)

La microscopia a scansione elettronica, è una tecnica di analisi che consente di studiare la morfologia del campione. Questa tecnica, sfrutta un fascio di elettroni secondario a bassa energia (da 0 a 50 eV) in grado di fornire informazioni riguardanti la profondità della superficie, con una risoluzione di pochi nanometri.

Il fascio di elettroni primario viene dapprima accelerato attraverso un sistema di lenti elettroniche, necessarie alla focalizzazione e alla deflessione, e in seguito collima verso il piatto contenente il campione in esame. Il campione, in risposta al bombardamento elettronico, emette elettroni secondari i quali vengono catturati da un rivelatore, convertiti in impulsi elettrici e inviati in tempo reale ad uno schermo che esegue una scansione[41].

Il risultato finale è un'immagine ad elevata risoluzione e grande profondità di campo in scala di grigio.

La sorgente utilizzata è un filamento di tungsteno appuntito tenuto ad un potenziale molto negativo.

La differenza tra la tecnica FESEM e quella SEM, è nel fascio di elettroni prodotto. In particolare, il raggio prodotto nella tecnica FESEM risulta essere circa 1000 volte più piccolo rispetto alla tecnica SEM, e la qualità dell'immagine risulta migliore, con una risoluzione spaziale inferiore a 2 nm [42].

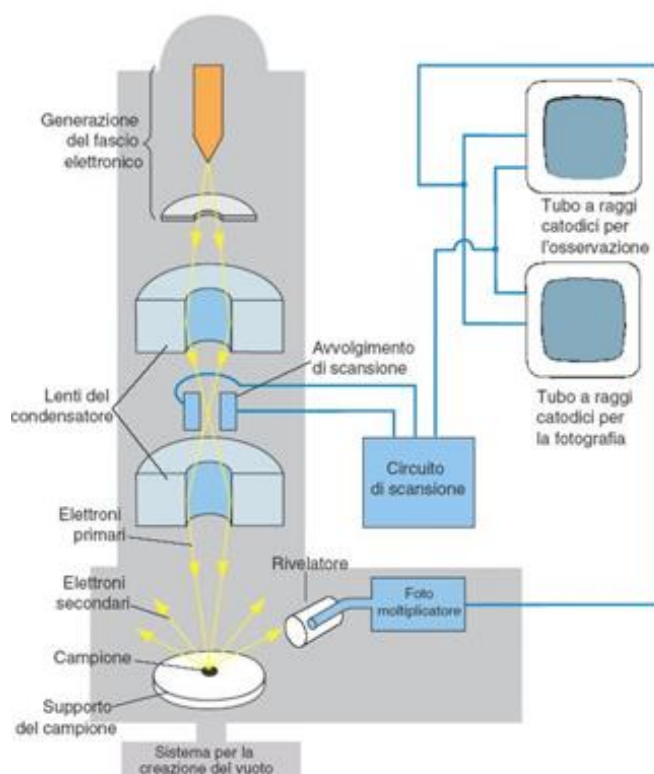


Figura 5: Dispositivo a scansione elettronica (SEM)

In questo lavoro di tesi, il dispositivo utilizzato per la procedura FESEM è il modello *ZEISS MERLIN*, con il quale è stato possibile analizzare la dimensione e la forma delle particelle sintetizzate.

Per l'analisi morfologica FESEM, le nanoparticelle ottenute attraverso la sintesi sol-gel sono state preparate sospendendone circa 10 mg in una soluzione di isopropanolo, mediante un bagno ultrasonico (*Digitec DT 103H, Bandelin*), per circa 5 minuti. In seguito, 5 μL della sospensione precedentemente preparata sono stati gocciolati su un retino di rame rivestito in carbonio, fissato al porta-campione (stub) mediante l'applicazione di nastro adesivo.

Le particelle ottenute con la sintesi spray-drier, sono state direttamente fissate al porta campione attraverso l'interposizione di un apposito nastro biadesivo a base di carbonio.

In entrambi i casi, le particelle, non essendo conduttive sono state metalizzate con un sottile strato di cromo.

2.4.3 Spettroscopia a dispersione di energia (EDS)

Questa tecnica consente di effettuare un'analisi qualitativa e semiquantitativa di un campione, permettendo di investigare una profondità massima di qualche micron[43].

In questo processo, si utilizza un fascio di elettroni primario che colpisce il campione e causa l'eccitazione degli elettroni dei livelli più interni creando così delle lacune. Questi spazi vengono poi riempiti da elettroni provenienti da livelli energetici più alti. Durante la transizione, da livelli energetici maggiori a quelli inferiori, gli elettroni emettono energia sotto forma di raggi X[44].

Il rivelatore a dispersione di energia (EDS), viene utilizzato per la rilevazione di radiazioni elettromagnetiche. Esso è costituito solitamente da un monocristallo di silicio, drogato con litio,

rivestito alle due estremità con uno strato conduttivo in oro e mantenuto in vuoto alla temperatura di -192°C [43].

Questo detector, ha il compito di trasformare l'energia dei fotoni X in impulsi elettrici di differente intensità che, una volta raccolti e analizzati, permettono di ottenere lo spettro del campione.

Esso riporta sulle ordinate il numero dei raggi X rivelati e sulle ascisse le corrispondenti energie ed è caratterizzato dalla presenza di picchi, le cui posizioni e altezze permettono rispettivamente di identificare e quantificare i vari elementi contenuti nel campione[45].

In questo lavoro di tesi tale analisi è stata effettuata con il medesimo strumento usato per l'analisi FESEM, in quanto equipaggiato con analizzatore EDS (figura), che ha consentito di indagare la quantità e la distribuzione degli ioni rame incorporati nelle polveri.

In questo caso, per la preparazione dei campioni si è scelto di usare il nastro biadesivo a base di carbonio anche per le particelle prodotte tramite tecnica sol-gel, in quanto la presenza del rame nel retino ostacolava la corretta rilevazione della quantità di ioni rame incorporati.



Figura 6: FESEM Merlin ZEISS equipaggiato con analizzatore EDS

2.4.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Questa tecnica permette di analizzare la morfologia superficiale del materiale, con livello di osservazione dei dettagli fino a qualche micron.

Il microscopio elettronico a trasmissione, ha come compito quello di produrre il fascio di elettroni. Questi vengono poi accelerati e fatti passare, sotto alto vuoto attraverso una colonna costituita da lenti magnetiche, attraversano poi il campione e infine collimano contro uno schermo fluorescente per formare l'immagine finale[46].

Le zone dell'immagine che appaiono scure, sono dovute ad atomi con elevato numero atomico, mentre le zone chiare sono quelle con atomi a basso numero atomico.

Questa metodologia ha un'elevata risoluzione. I campioni analizzati possono essere polveri, solidi o sospensioni, non è adatto ai liquidi in quanto l'analisi è eseguita in alto vuoto[47].

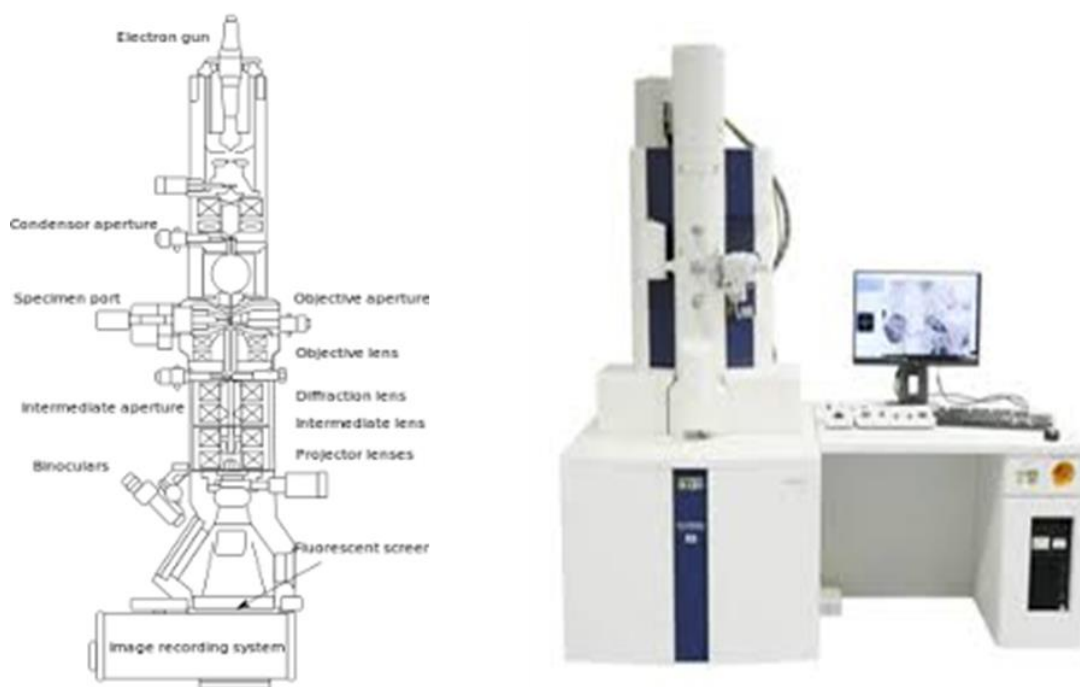


Figura 7: Meccanismo di funzionamento del dispositivo TEM (sx) e un esempio di dispositivo TEM (dx)

In questo lavoro di tesi, il dispositivo utilizzato è: *JEOL 3010 electron microscope (JEOL, Japan)* ha un funzionamento a 300 keV con un coefficiente dell'obiettivo (Cs) pari a 0,6 mm e una risoluzione pari a 1,7 Å, utilizzando una telecamera CCD (1024 x 1024 pixel, di dimensioni 24 x 24 lm).

2.4.5 Spettroscopia ad emissione atomica al plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES)

La spettroscopia atomica comprende una serie di tecniche analitiche utilizzate per detectare la composizione elementare di un campione, esaminandone lo spettro elettromagnetico o lo spettro di massa.

Il plasma accoppiato induttivamente o anche denominato ICP è una tecnica di tipo distruttivo, che permette l'analisi di numerosi elementi della tavola periodica, anche a concentrazioni molto basse (1-10 parti per miliardo o ppb)[48].

In questo processo il gas utilizzato è chiamato plasma e viene prodotto usando un flusso di Argon per ottenere ioni Ar^+ e elettroni liberi. Questo gas è elettricamente neutro ma altamente ionizzato

perché sono presenti ioni ed elettroni in medesimo numero, perciò questa caratteristica lo rende un buon conduttore elettrico e un'ottima sorgente di atomizzazione ed eccitazione.

Il plasma viene ottenuto innescando la formazione di ioni in un flusso di Argon, attraverso una scarica elettrica, prodotta da una bobina di induzione (solenoidale) a radiofrequenze che circonda un tubo di quarzo. La costante produzione di energia da parte della bobina permette di raggiungere temperature molto elevate, dell'ordine di 6000-7000 K nella zona di eccitazione-osservazione[49].

Il dispositivo utilizzato è chiamato torcia, perché il plasma assume visivamente la forma di una fiammella, ed è composto dai seguenti elementi[50]:

- Sistema di introduzione del campione: il campione viene aspirato attraverso l'utilizzo di una pompa peristaltica e successivamente introdotto nella torcia per azione di un nebulizzatore. I nebulizzatori di uso comune sono quelli pneumatici, nei quali il campione incontra un flusso di Argon che porta alla formazione di un aerosol. In seguito, l'aerosol entra in una camera di nebulizzazione dove vengono rimosse le gocce più grandi in modo tale che alla torcia arrivino solo le gocce più piccole;
- Torcia: è costituita da tre tubi concentrici normalmente di quarzo. In questo step arriva un flusso di argon in forma di plasma a temperature molto elevate (8000-9000 K), dopo di che fluisce nei tre tubi concentrici con funzioni diverse: per evitare la fusione del quarzo, nella parte più esterna del plasma si ha un'elevata velocità di flusso, mentre la corrente intermedia viene utilizzata per alimentare il plasma e infine nel tubo più interno per trasportare il campione nebulizzato;
- Monocromatore: serve per isolare la radiazione di interesse emessa dall'analita all'interno del plasma;
- Rilevatore: utile a convertire l'intensità della radiazione emessa in un segnale elettrico ad essa proporzionale;
- Sistema di registrazione del segnale.

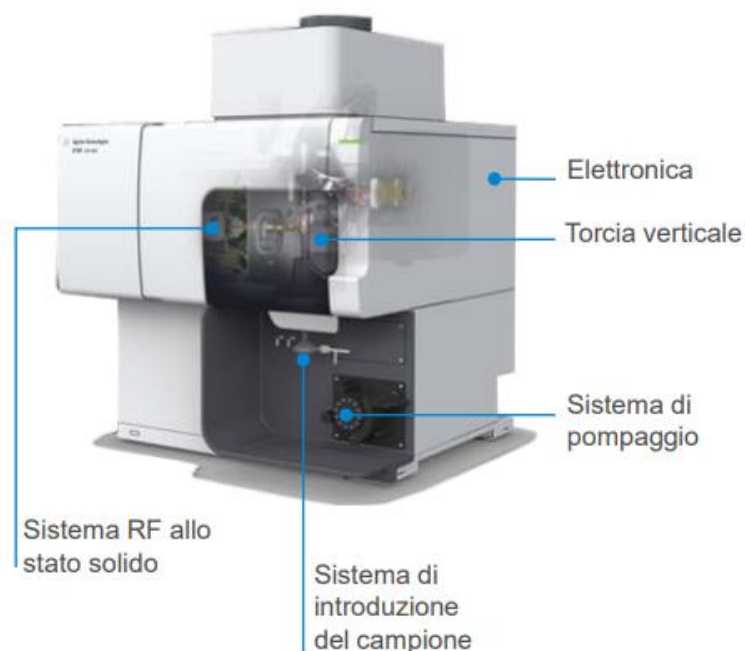


Figura 8: Schema di un dispositivo ICP

In questo lavoro di tesi si è utilizzato lo strumento *ICP-MS, Thermoscientific, ICAP Q* che ha permesso di misurare le quantità di rame rilasciate dalle matrici.

2.4.6 Spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FTIR)

La spettroscopia infrarossa è una tecnica spettroscopica di assorbimento che analizzando i legami chimici, sotto forma di un segnale, fornisce informazioni riguardanti la presenza di gruppi funzionali nella molecola.

Nello specifico, in questo lavoro di tesi, quest'analisi è stata utilizzata per poter confermare l'avvenuta funzionalizzazione, rilevabile dalla presenza dei gruppi caratteristici.

Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questo passa da uno stato fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato, avviene così una transizione tra livelli energetici vibrazionali: la differenza di energia tra questi due stati determina la lunghezza d'onda di assorbimento.

Poiché legami differenti assorbono la radiazione IR a lunghezze d'onda caratteristiche, dall'analisi degli spettri IR si ottengono informazioni sui gruppi funzionali presenti nel materiale[51].

I moti vibrazionali delle molecole, una volta raggiunte dalla radiazione infrarossa, possono essere di stretching o di bending.

- Vibrazione di stretching: modifica la lunghezza dei legami
- Vibrazione di bending: modifica gli angoli tra gli atomi

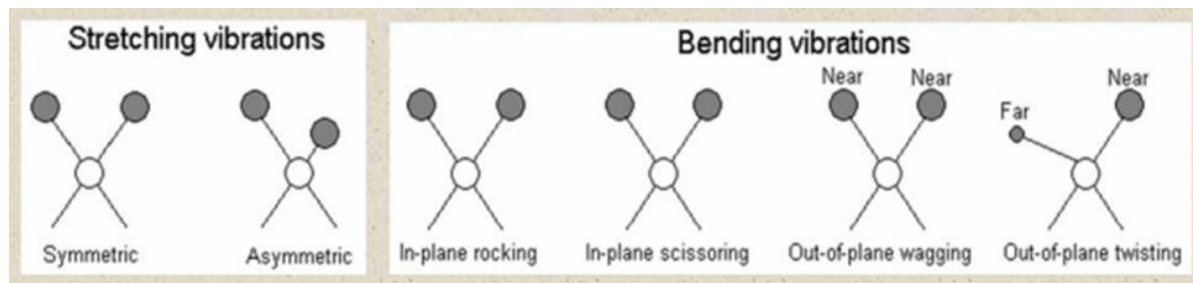


Figura 9: Modi di vibrazione: stretching vibrations (ν_s) e bending vibrations (ν_b)[52]

La vibrazione di stretching, consiste in un movimento ritmico attuato lungo l'asse di legame con conseguente aumento e diminuzione della distanza interatomica. Può essere di due tipi: simmetrico (ν_s) se i due atomi si allontanano contemporaneamente, o asimmetrico (ν_a) se i due atomi si allontanano alternativamente. Ogni tipo di stretching è associato ad una banda di assorbimento nello spettro IR. La vibrazione di bending, invece, può essere attribuita ad una variazione dell'angolo, nel caso in cui si abbiano legami con un atomo in comune, oppure ad un movimento di un gruppo di atomi rispetto al resto della molecola. [52].

In uno spettro tipico infrarosso, in ascissa si ha la scala di frequenze espresse in numero d'onda [cm^{-1}] e in ordinata la percentuale di trasmittanza e i picchi del segnale sono rivolti verso il basso.

Invece, se si preferisce visualizzare il grafico avendo sull'asse delle ordinate l'assorbanza, i picchi in questo caso saranno rivolti verso l'alto.

La relazione che lega l'assorbanza con la trasmittanza è la seguente:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

Equazione 4: Formula per calcolare l'assorbanza

Dove:

A → Assorbanza

T → Trasmittanza

I_0 → Intensità della radiazione incidente

I → Intensità della radiazione emergente

E' possibile affermare che la radiazione IR è la radiazione che cade tra il visibile e la regione delle microonde. Di grande rilievo è la zona tra 4.000 e 400 cm^{-1} .

Per l'esame prelimare di uno spettro IR, vi sono due importanti aree da considerare: la regione tra 4.000 e 1.300 cm^{-1} e quella tra 900 e 400 cm^{-1} [51].

La porzione ad alta frequenza viene identificata come regione dei gruppi funzionali. La mancanza di assorbimento, nei range associati ai vari gruppi funzionali, può evidenziare l'assenza di tali gruppi nella molecola. La porzione intermedia dello spettro (1.300- 900 cm^{-1}), viene definita regione di finger-print.

Per ottenere uno spettro infrarosso corretto è necessario sottrarre allo spettro del campione il background, ovvero lo spettro ottenuto in assenza del campione. Questo passaggio risulta imprescindibile, in quanto ogni misura può essere affetta non solo dalle proprietà di assorbimento del campione, ma anche da quelle dello strumento.

La spettroscopia FTIR la si realizza usando un interferometro che consente la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione IR generata dalla sorgente.

I vantaggi che offre questa tecnica sono i seguenti[52]:

- Notevole risparmio in termini di tempo, in quanto la radiazione con tutte le lunghezze d'onda viene registrata contemporaneamente dal rilevatore;
- Miglior rapporto segnale-rumore rispetto alla tecnica a scansione;
- Elevata precisione dei numeri d'onda
- Assenza di luce diffusa.

In questo lavoro di tesi, è stato utilizzato lo strumento *Bruker Equinox 55*, tale analisi ha permesso di verificare la presenza di gruppi funzionali sulla superficie delle matrici sol-gel e spray drier.



Figura 10: Schema di uno spettrofotometro FT-IR

2.4.7 Spettroscopia UV-visibile

Questa tecnica permette di ottenere informazioni sia quantitative che qualitative sul campione in esame, studiando la natura e l'intensità delle onde elettromagnetiche che la sostanza stessa è in grado di assorbire[53].

La spettrometria di assorbimento lavora in un range compreso tra 100-800 nm in particolare[12]:

- Tra 100-200 nm si ha la regione dell'UV-lontano, in questa zona si lavora in sottovuoto e in atmosfera completamente inerte, in modo tale da non avere alcuna presenza di specie chimica al di fuori da quella in esame;
- Tra 200-350 nm si ha la regione dell'UV-vicino, in questo caso il campione è inserito in contenitori di quarzo per far sì che le radiazioni non possano attraversare il vetro comune;
- Tra 350-800 nm si ha la regione del visibile, in questo caso il campione è messo in cuvette di vetro trasparente e come rivelatore è sufficiente l'occhio umano.

Uno spettrometro UV-visibile, ha una sorgente di radiazioni costituita da lampade ad incandescenza per il visibile o al deuterio per l'ultravioletto. Dopo la sorgente è posto un monocromatore, generalmente costituito da specchi concavi e da reticoli in riflessione, che ha il compito di disperdere la radiazione policromatica in bande monocromatiche. Le bande monocromatiche vengono inviate in successione al campione che verrà posto in cuvette, ovvero contenitori trasparenti alla lunghezza d'onda alla quale si lavora. Questi porta-campione, generalmente presentano forma rettangolare a base quadrata con uno spessore di 1 cm, talvolta possono essere composti da vetro o materiale plastico nel caso di analisi condotte nel campo del visibile, e da quarzo nel caso di analisi condotte nell'ultravioletto. Inoltre, lo strumento è dotato di un rivelatore in grado di convertire l'intensità della radiazione trasmessa in un segnale elettrico ad essa proporzionale. Il segnale proveniente dal rivelatore viene poi opportunamente amplificato e inviato ad un registratore o ad un calcolatore. Il risultato finale ottenibile è un diagramma che riporta l'intensità di assorbimento in funzione della lunghezza d'onda oppure l'assorbanza ad una lunghezza d'onda definita.

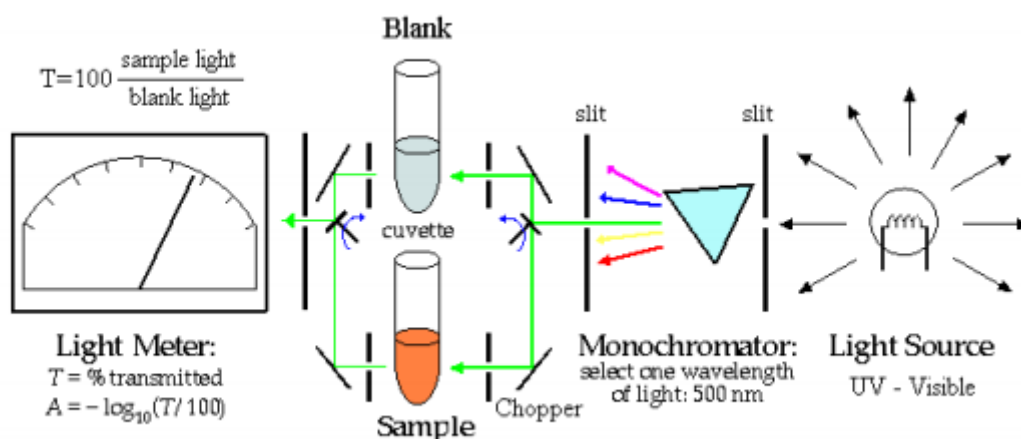


Figura 11: Schema di funzionamento del dispositivo di spettroscopia UV-visibile

L'assorbanza (A) rappresenta l'entità della radiazione assorbita ed è definita tramite la seguente relazione:

$$A = -\log \frac{I}{I_0}$$

Equazione 5: Formula usata per calcolare l'assorbanza

Dove:

I = intensità del raggio dopo l'attraversamento della cuvetta contenente il campione;

I₀ = intensità del raggio incidente.

Per un'analisi quantitativa è possibile ricavare la concentrazione del campione applicando la legge di Lambert-Beer[53]:

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

Equazione 6: Legge di Lambert-Beer

A = assorbanza del campione;

ε = coefficiente di estinzione molare, specifico per ogni sostanza;

d = cammino ottico [cm];

c = concentrazione della soluzione [mol/L];

L'assorbanza è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente, sia allo spessore dello strato attraversato, perciò più elevata sarà la concentrazione delle molecole che passano dallo stato fondamentale a quello eccitato, maggiore sarà l'assorbanza.

In questo lavoro di tesi, è utilizzato lo strumento *UV 500 UV-visible Spectrometer*. Tale analisi ci ha consentito di determinare la quantità di rifampicina rilasciata dalle particelle ottenute. La rifampicina possiede un picco di assorbimento caratteristico a 474 nm quindi misurando l'assorbanza di soluzioni di tale farmaco a concentrazioni note è stato possibile costruire la retta di taratura (anche detta curva di calibrazione).

Questo perché la legge di Lambert-Beer rappresenta una retta passante per l'origine degli assi in cui ε*d è il coefficiente angolare.

Successivamente si è risaliti alle concentrazioni incognite di rifampicina in soluzione nei diversi tempi di prelievo (definiti nella descrizione dei test di rilascio), e quindi è stato così possibile tracciare il profilo di rilascio.

Questa analisi è stata condotta utilizzando cuvette di quarzo a quattro facce ottiche con cammino ottico di 1 cm.

2.4.8 Analisi termogravimetrica (TGA)

La tecnica termogravimetrica indica una tecnica termoanalitica, che ha il compito di misurare variazioni di peso in un materiale quando viene sottoposto ad un graduale e controllato aumento di temperatura[54].

Pertanto, la TGA consente un'analisi quantitativa della composizione del campione, senza però identificare la natura dei componenti.

Il termogravimetro è uno strumento che misura la variazione di peso di un materiale, in conseguenza alle eventuali decomposizioni che esso subisce, in seguito allo sviluppo di prodotti gassosi; questo processo avviene quando il materiale viene riscaldato[55].

La strumentazione è semplice, ma molto delicata e precisa e necessita di controllo e calibrazione periodici.

Questo dispositivo è costituito da una bilancia di estrema precisione, in cui il campione viene riscaldato progressivamente dalla temperatura ambiente fino ad oltre 1000 °C, con rampe di salita in temperatura programmabili.

Riassumendo i componenti del dispositivo sono i seguenti:

- Bilancia analitica sensibile (di portata compresa tra 5 e 20 mg);
- Fornace (temperatura dai 25 ai 1500 °C);
- Sistema di gas di spurgo che assicura un'atmosfera inerte e la diffusione del calore in ogni punto;
- Elaboratore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati.

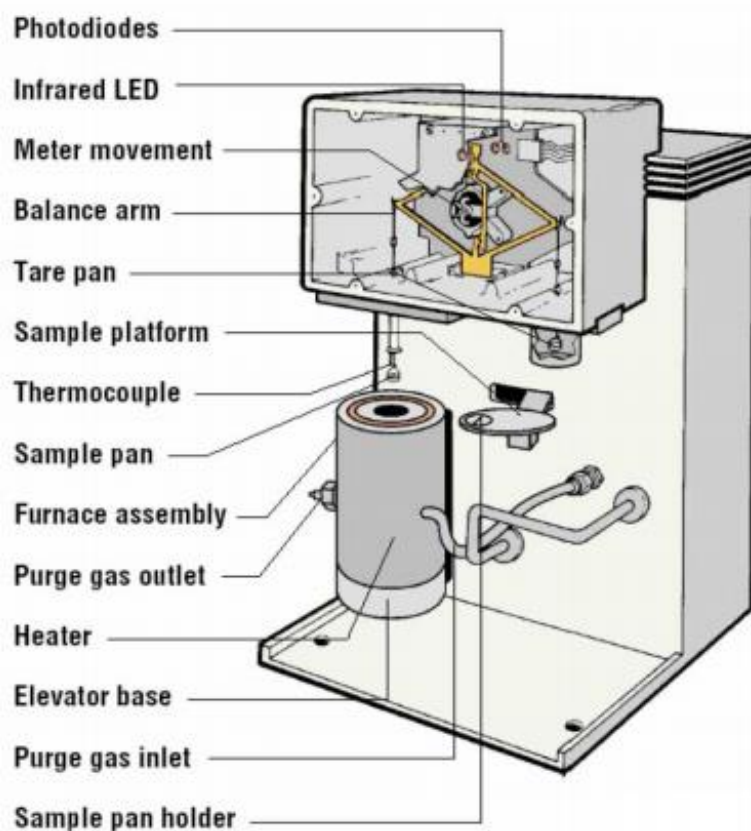


Figura 12: Meccanismo di funzionamento del dispositivo termogravimetrico

La misura viene condotta in presenza di aria o di una atmosfera inerte come elio o argon.

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato l'analizzatore termico *TGA/SDTA 851° Mettler-Toledo*, impostando un intervallo di temperature compreso tra 25°C e 800°C con una rampa di salita di 10°C/minuto e conducendo l'analisi in presenza di aria.

Questo tipo di analisi, è stata condotta per confermare l'avvenuta funzionalizzazione e accertare ulteriormente la presenza di rifampicina all'interno delle matrici.

2.4.9 Analisi elementari

L'analisi elementare è una tecnica che consente di determinare le percentuali degli elementi presenti in un composto. La quantità dei singoli elementi presenti viene poi solitamente espressa in forma percentuale.

Uno dei classici metodi[56] utilizzati per l'analisi elementare dei composti organici è la loro combustione. In questo modo, elementi come il carbonio, l'idrogeno e l'azoto formano rispettivamente: anidride carbonica, acqua e ossido nitrico, dai quali si può risalire al contenuto originario dell'elemento chimico cercato tramite analisi gravimetrica.

La strumentazione usata per questa tecnica, è costituita da una fornace per la combustione del campione che ha il compito di convertire gli elementi del campione in molecole volatili, le quali vengono poi inserite nei sistemi a separazione gascromatografica, dove i gas vengono separati per la successiva identificazione e quantificazione attraverso un opportuno rivelatore[57].



Figura 13: Dispositivo utilizzato per condurre analisi elementari

Nel presente lavoro di tesi lo strumento che ha permesso di ricavare le analisi elementari dei seguenti campioni(SG, SG F,SG RIF,SG F RIF, SD, SD F,SD RIF,SD F RIF) è *LECO CHNS-932*.

2.5 Test di rilascio per le matrici contenenti ioni e rifampicina

Il seguente metodo di rilascio di rame e rifampicina fa riferimento ad un lavoro del gruppo Vallet-Regi[33].

Il processo usato è il medesimo per tutti e otto i campioni (SG, SG-funzionalizzata, SD, SD-funzionalizzata, SG-rifampicina, SG-funzionalizzata-rifampicina, SD-rifampicina, SD-funzionalizzata-rifampicina):

- Pesare 1 mg di campione in un eppendorf;
- Aggiungere al campione 1 mL di PBS. Questa soluzione (A), dev'essere sonicata e vortexata in modo da sospendere il campione;
- Per questo saggio si devono usare transwell da 12 pozzetti: nel pozzetto aggiungere 1,5 mL di PBS e nel transwell aggiungere 500 μ L di soluzione A (per ogni campione si effettua una replica);
- Ai seguenti time-step: 1h-3h-6h-24h-48h-3g-7g prelevare 1.5 mL di soluzione contenuta nel pozzetto per analizzarne successivamente la concentrazione rilasciata. Dopo di che aggiungere nuovamente 1.5 mL di PBS nel pozzetto per mantenere il volume di rilascio costante.

I campioni prelevati vengono analizzati tramite spettrofotometro UV-visibile. Esso fornisce i valori di assorbanza della soluzione dai quali è possibile ricavare la concentrazione di rifampicina rilasciata nel tempo.

Per osservare la cinetica di rilascio del rame si procede con analisi ICP.

2.6 Saggio antibatterico in modelli planctonici

L'obiettivo di questo saggio è capire se il materiale preparato, attraverso sintesi sol-gel e spray drier, poi funzionalizzato con APST e CES e infine caricato con rifampicina ha proprietà antibatteriche. La procedura utilizzata fa riferimento al lavoro del gruppo della prof.ssa Vallet-Regi[58], ed è la stessa, sia per i batteri *Escherichia.coli* (ATCC 29213), che per gli *Stafilococco.aureus* (ATCC 25922).

La coltura batterica[18] viene preparata seminando i batteri *S. aureus*/*E. coli* su una piastra Trypic Soy Agar (TSA), posta nella stufa a 37°C per 16 ore. Questa fase la si effettua al fine di ottenere colonie isolate. Dopo 16 ore si seleziona una colonia isolata e la si pone in una falcon da 15 mL, contenente 10 mL di terreno di coltura liquido (THB). Si mette la falcon in un forno a 37°C per 4 ore con un'agitazione orbitale di 200 rpm.

Passate le 4 ore, si calcola la concentrazione batterica presente nella sospensione. Il dispositivo che effettua la misurazione è l'Optical Diffraction e l'intervallo che è di interesse ottenere è tra 0.4-0.5. Questo valore indica che la concentrazione di batteri presente è di 2×10^9 batteri/mL. Una volta raggiunto questo valore di assorbanza, si aggiunge in una falcon 40 μ L di sospensione batterica e 40 mL di PBS sterile per ottenere una concentrazione batterica di 2×10^6 batteri/mL.

Gli MBGs preparati inizialmente, vengono sospesi in PBS, poi sonicati e vortexati alla seguenti concentrazioni: 160, 80, 40, 20, 10 $\mu\text{g/mL}$.

Per questo test si utilizza una multiwell da 24 pozzetti. Si aggiunge in ogni pozzetto 0,5 mL di sospensione batterica e 0,5 mL di sospensione contenente il campione preparato precedentemente. Le concentrazioni finali ottenute sono 80, 40, 20, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$. Per ogni concentrazione occorre prepararne la replica. I controlli, ovvero solo sospensione batterica, si hanno mettendo nel pozzetto considerato 0,5 mL di sospensione batterica e 0,5 mL di PBS. Le multiwell vengono poi poste in un forno a 37°C con agitazione orbitale a 200 rpm per 16 ore.

Dopo 16 ore di incubazione, togliere le multiwell dalla stufa e preparare tre diluizioni di ogni pozzetto.

La prima diluizione (D1) è una diluizione di 1:100 rispetto alla concentrata, viene preparata aggiungendo 990 μL di PBS sterile e 10 μL prelevati dal pozzetto della multiwell.

La seconda diluizione (D2) è una diluizione 1:1000 rispetto alla concentrata, ed è preparata aggiungendo 900 μL di PBS sterile e 100 μL di diluizione D1, precedentemente vortexata.

Per ogni campione, viene utilizzata una piastra di agar divisa in 3 settori, identificati come diluizione 1 (D1), diluizione 2 (D2) e soluzione concentrata, all'interno di ognuno vengono gocciolate 5 gocce di 10 μL , rispettivamente delle due diluizioni e della soluzione concentrata.

Le piastre di agar vengono poi poste nella stufa per over night.



Figura 14: Piastra di Agar contenente i tre settori (soluzione concentrata, diluizione 1, diluizione 2)

Il giorno dopo si prelevano dalla stufa le piastre e si procede con il contare le CFU (colony forming units).

Capitolo 3 – Risultati e discussione

3.1 Caratterizzazione delle nanoparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica sol-gel in ambiente basico

Con la tecnica sol-gel in ambiente basico, si ottengono particelle con morfologia sferica, con dimensioni nanometriche e con area superficiale specifica elevata.

I campioni sintetizzati tramite questa tecnica sono stati caratterizzati dal punto di vista morfologico tramite FESEM e TEM, composizionale attraverso EDS e ICP-AES e strutturale mediante misure di adsorbimento e desorbimento di azoto.

3.1.1 SG 2% Cu

Il primo campione sintetizzato contiene il 2% molare di rame, l'85% di silice e il 13% di ossido di calcio. La morfologia delle nanoparticelle mesoporose dopate è stata osservata tramite FESEM.

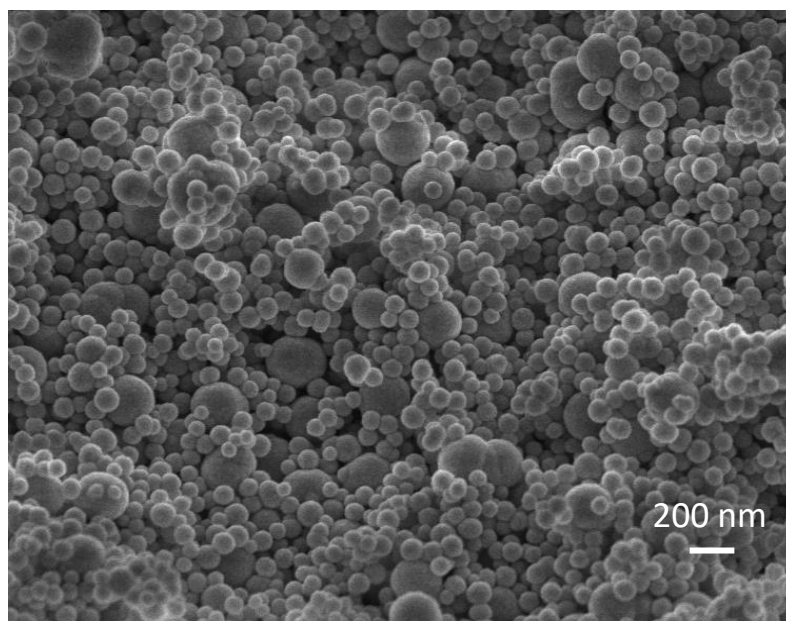


Figura 1: Immagine FESEM del campione SG 2% Cu

Le immagini, riportate in figura 1, rivelano la presenza di particelle con morfologia sferoidale e dimensioni uniformi nell'intorno a 100-200 nm.

È stata poi eseguita, con l'utilizzo di un dispositivo EDS, un'analisi quantitativa, individuando tre differenti aree di dimensioni 75x50µm. Le percentuali atomiche dei diversi componenti delle matrici, riportate in tabella 1, sono state ottenute mediando i valori acquisiti nelle tre diverse aree considerate.

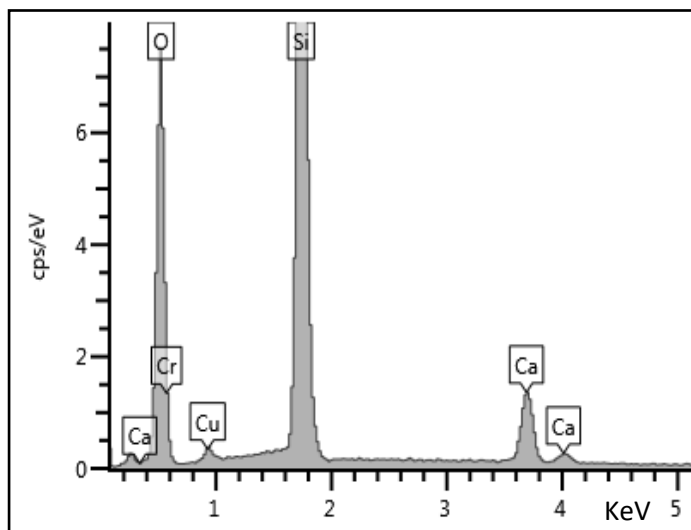


Figura 2: Spettro EDS del campione SG 2% Cu

Elemento	% Atomica
O	66.95
Si	28.63
Ca	3.73
Cu	0.70
Totale:	100.00

Tabella 1: Dati quantitativi EDS di SG 2% Cu

Il grafico riportato in figura 2 mostra i picchi di tutti i componenti del reticolo vetroso: ossigeno, silicio, calcio e rame. A questi si aggiungono i picchi del cromo, utilizzato per metallizzare i campioni nel caso dell'analisi FESEM.

Dai valori riportati in tabella 2, si sono ricavati i rapporti effettivi in modo da poterli confrontare con i rispettivi teorici.

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.13	0.15
Cu/Si	0.024	0.024

Tabella 2: Rapporti effettivi e teorici a confronto

Dai risultati ottenuti dalla tabella 2, si può osservare che il rame è stato effettivamente incorporato all'interno del reticolo vetroso. Inoltre, si deve considerare che l'EDS è una tecnica semiquantitativa e dunque è normale osservare dei rapporti effettivi leggermente diversi da quelli teorici.

L'analisi TEM è stata effettuata per studiare la struttura mesoporosa del campione e per confermare la morfologia ottenuta dall'analisi FESEM.

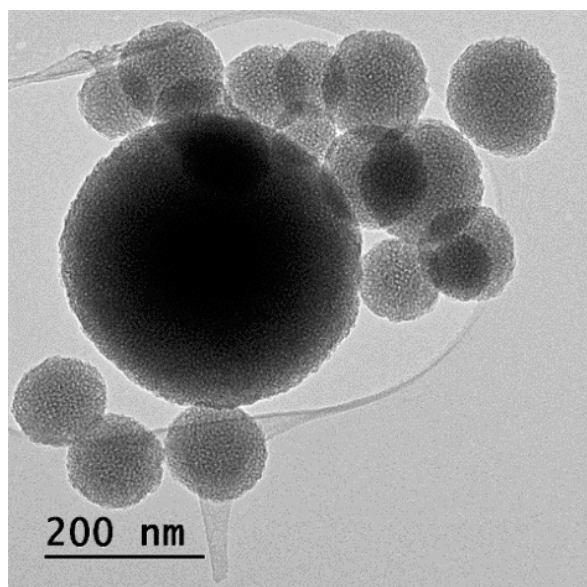


Figura 3: Immagine TEM del campione SG 2% Cu

Osservando la figura 3 si ha la conferma della morfologia sferoidale delle nanoparticelle e della loro dimensione nanometrica.

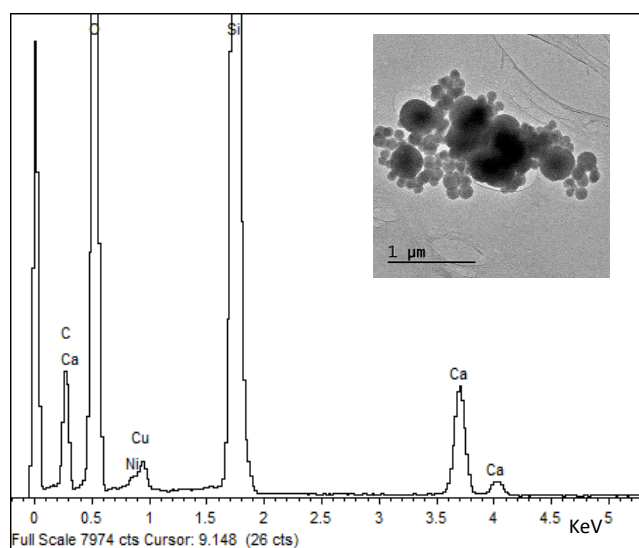


Figura 4: Spettro EDS del campione SG 2% Cu

Elemento	% Atomica
Si	88.60
Ca	9.43
Cu	1.96
Totale:	100.00

Tabella 3: Dati quantitativi EDS di SG 2% Cu

Il grafico riportato in figura 4 conferma lo spettro EDS sopra riportato (figura 2), mostrando che il rame è stato effettivamente incorporato all'interno del reticolo vetroso.

Dai valori riportati in tabella 4, si sono ricavati i rapporti effettivi in modo da poterli confrontare con i rispettivi teorici.

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.11	0.15
Cu/Si	0.022	0.024

Tabella 4: Rapporti effettivi e teorici a confronto

I rapporti reali sono molto simili a quelli teorici, indice quindi di un'incorporazione efficace di tutti gli elementi all'interno del reticolo vetroso.

La struttura mesoporosa delle nanoparticelle è stata investigata tramite l'analisi di adsorbimento e desorbimento di azoto.

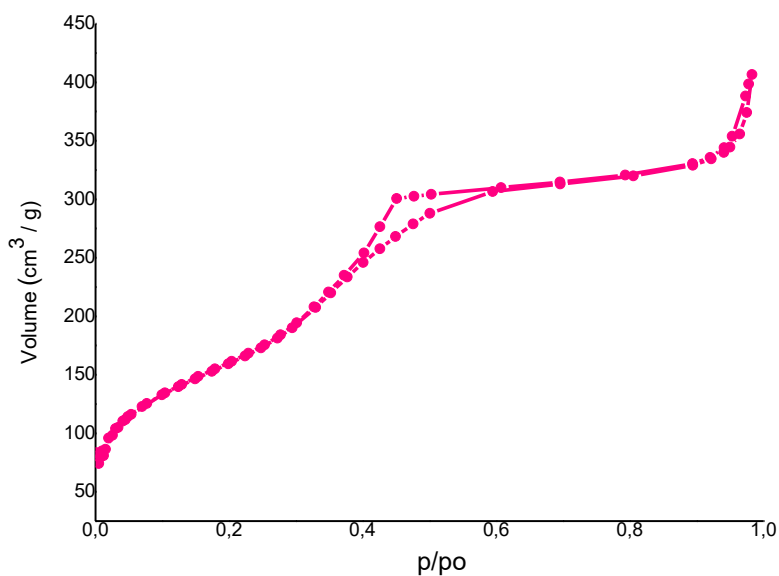


Figura 5: Isoterma di adsorbimento e desorbimento di azoto del campione SG 2% Cu

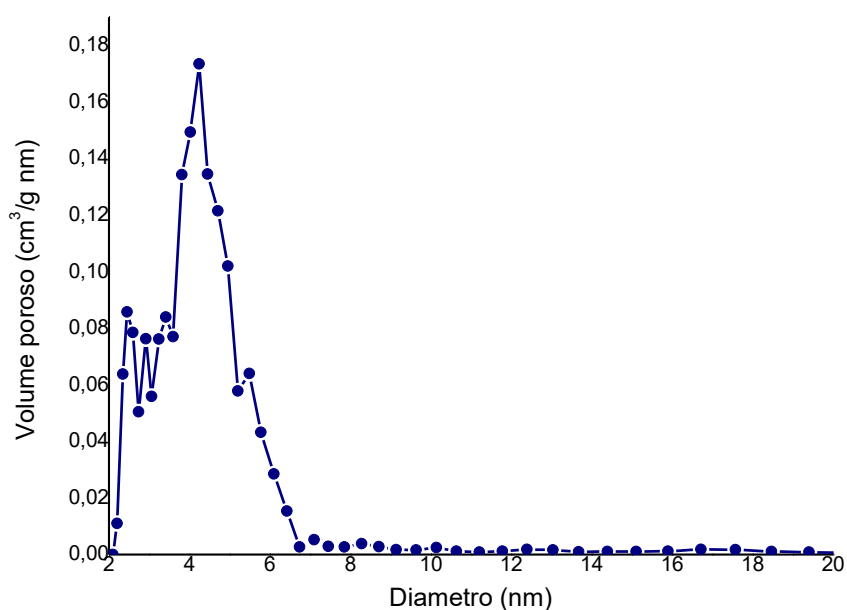


Figura 6: Distribuzione dimensionale dei pori del campione SG 2% Cu, ottenuta applicando l'algoritmo DFT

Da tale analisi, applicando gli algoritmi BET e DFT, descritti nel secondo capitolo, sono stati ricavati i seguenti valori mostrati in tabella 5:

$SSA_{BET} (m^2/g)$	Volume pori ($cm^3 g^{-1}$)	Dimensione pori (nm)
599.65	0.54	4-6

Tabella 5: Mostra la superficie specifica e il volume dei pori del campione SG 2% Cu

L'isoterma di adsorbimento e desorbimento, riportata in figura 5, conferma la struttura mesoporosa delle matrici prodotte. Si tratta, infatti, di un'isoterma di tipo IV caratterizzata dalla presenza di un'isteresi di ampiezza ridotta, in quanto si hanno pori di dimensione media di poco superiore a 4 nm, limite inferiore sopra il quale inizia a verificarsi il fenomeno di isteresi.

La distribuzione dimensionale dei pori molto stretta e centrata intorno a 4,2 nm indica la presenza di una nanoporosità regolare, di dimensioni in linea con quanto riportato in letteratura, riguardanti i sistemi ricavati utilizzando il CTAB come agente template[27].

3.2 Caratterizzazione delle microparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica sol-gel assistita dall'utilizzo di uno spray-drying

La tecnica spray-drying permette di ottenere delle particelle con una morfologia sferica e con dimensioni dell'ordine dei micrometri; quindi di un ordine di grandezza superiore a quello delle particelle ottenute con la sintesi sol-gel in ambiente basico. Inoltre, è possibile ottenere un controllo preciso sulla composizione del prodotto finale, modificando i parametri dello strumento. Nonostante questo, però, a differenza del metodo sol-gel, le particelle presentano dimensioni meno uniformi, causate dall'evaporazione rapida del solvente.

I campioni ottenuti con questa tecnica sono stati caratterizzati dal punto di vista morfologico tramite FESEM e TEM, composizionale attraverso EDS, ICP-AES e strutturale mediante misure di adsorbimento e desorbimento di azoto.

3.2.1 SD 2% Cu

La prima analisi effettuata ai campioni è stata un'analisi morfologica FESEM.

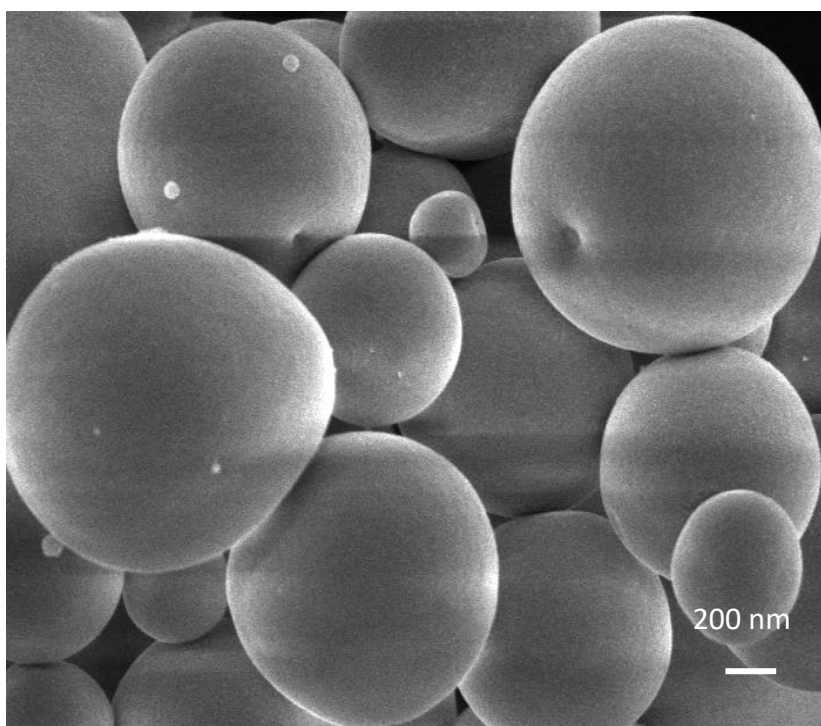


Figura 7: Immagine FESEM del campione SD 2% Cu

Dall' immagine FESEM (figura 7), è possibile osservare delle particelle con dimensione sferica dell'ordine dei micrometri, in particolare comprese nel range tra 1-5 μm .

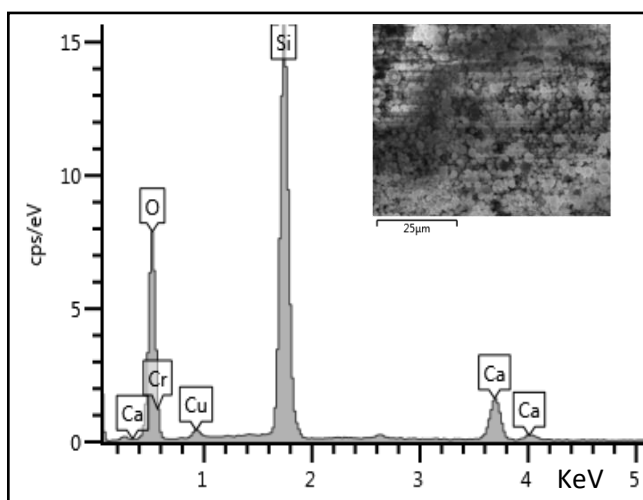


Figura 8: Spettro EDS del campione SD 2% Cu

Elemento	% Atomica
O	68.90
Si	25.88
Ca	4.31
Cu	0.92
Totale:	100.00

Tabella 6: Dati quantitativi EDS di SD 2% Cu

L'analisi EDS è stata effettuata analizzando tre diverse aree di dimensioni 75x50 μm. La tabella 6 mostra la percentuale atomica di ogni elemento, rilevata tramite analisi EDS. Nel grafico, riportato in figura 8, è possibile osservare i picchi associati a tutti gli elementi costituenti le particelle: ossigeno, silicio, calcio e rame. Anche in questo caso appare il picco relativo al cromo utilizzato per metallizzare il campione.

Dall'elaborazione dei dati quantitativi, riportati in tabella 6, sono stati poi calcolati i rapporti composizionali (tabella 7).

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.17	0.15
Cu/Si	0.035	0.023

Tabella 7: Rapporti effettivi e teorici a confronto

Come si può osservare in tabella 7, i valori reali superano in modo non significativo quelli teorici e questa differenza è attribuibile sia alla tecnica stessa, sia al fatto che sembra sia stato incorporato meno silicio rispetto al quantitativo teorico atteso.

Per confermare la morfologia ottenuta dall'analisi FESEM e studiare la struttura mesoporosa della matrice è stata effettuata l'analisi TEM.

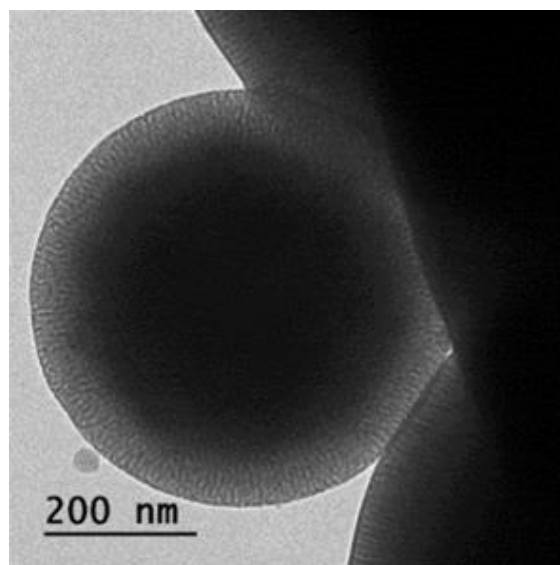


Figura 9: Immagine TEM del campione SD 2% Cu

Osservando la figura 9 si ha la conferma della morfologia sferica delle particelle e della dimensione micrometrica.

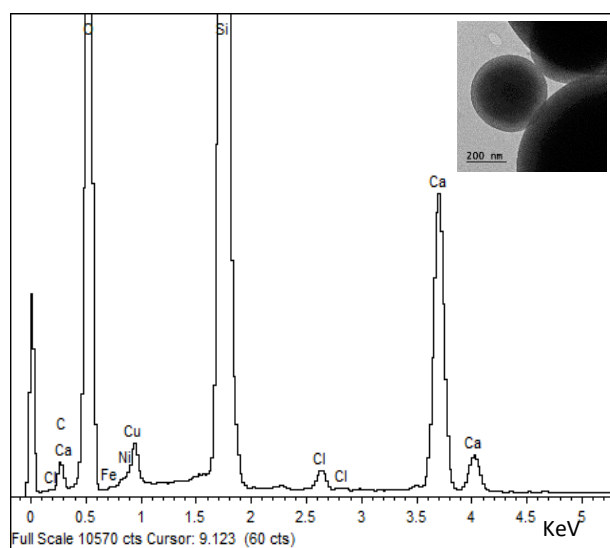


Figura 10: Spettro EDS del campione SD 2% Cu

Elemento	% Atomica
Si	85.41
Ca	12.56
Cu	2.04
Totale:	100.00

Tabella 8: Dati quantitativi EDS di SD 2% Cu

Il grafico riportato in figura 10 conferma lo spettro EDS sopra riportato (figura 8), mostrando che il rame è stato effettivamente incorporato all'interno del reticolo vetroso.

Dai valori riportati in tabella 9, si sono ricavati i rapporti effettivi in modo da poterli confrontare con i rispettivi teorici.

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.15	0.15
Cu/Si	0.024	0.023

Tabella 9: Rapporti effettivi e teorici a confronto

Il rapporto effettivo Cu/Si è molto simile a quello teorico e la lieve differenza potrebbe essere attribuita alla tecnica stessa, la cui precisione diminuisce al diminuire delle quantità da detectare, mentre il rapporto Ca/Si effettivo è identico a quello teorico atteso.

Successivamente, il campione è stato sottoposto all'analisi di adsorbimento e desorbimento di azoto dalla quale è stata ottenuta l'isoterma riportata in figura 11: si tratta di un'isoterma di tipo IV con un'isteresi di ampiezza maggiore rispetto alle polveri ottenute tramite sintesi sol-gel in ambiente basico.

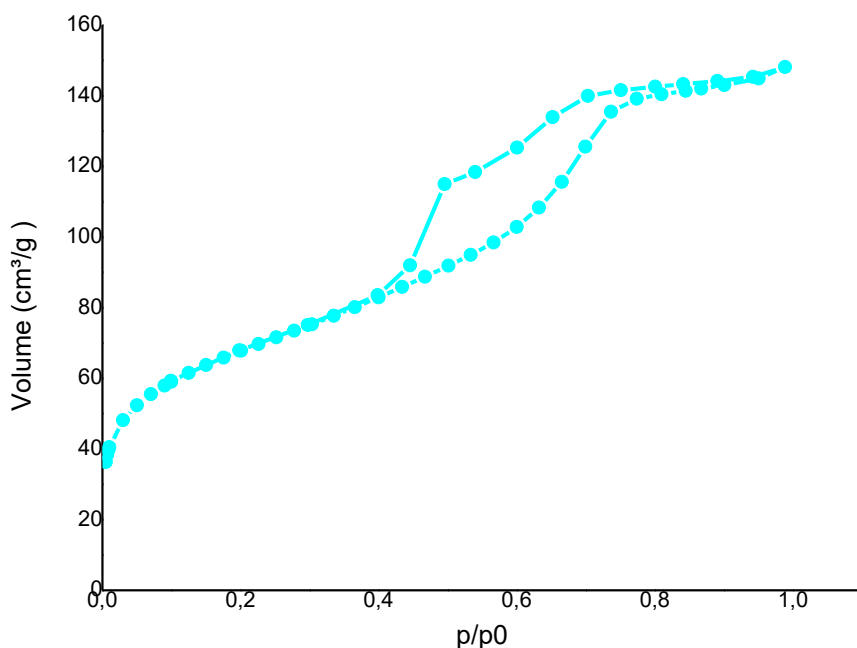


Figura 11: Isoterma di adsorbimento e desorbimento di azoto del campione SD 2% Cu

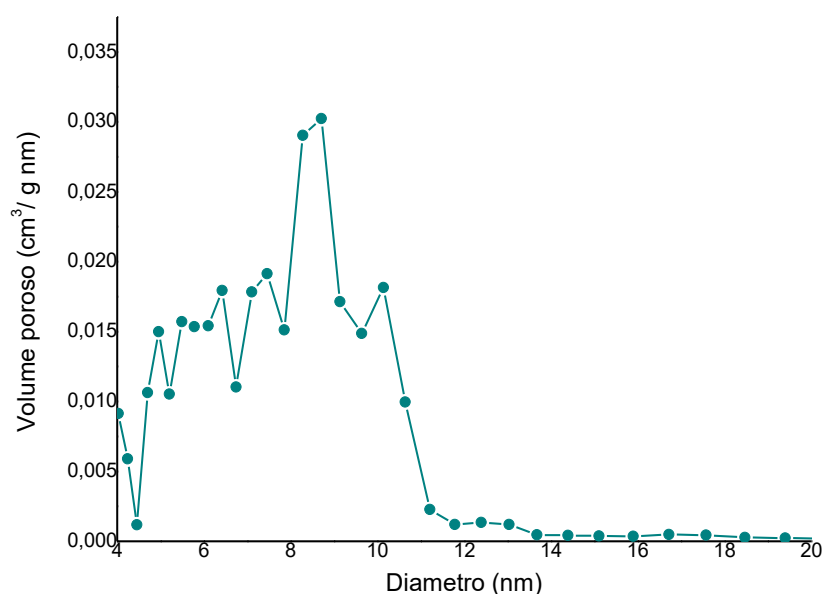


Figura 12: Distribuzione dimensionale dei pori del campione SD 2% Cu, ottenuta applicando l'algoritmo DFT

Applicando l'algoritmo DFT si è poi ricavata la distribuzione dimensionale dei pori, riportata in figura 12.

Essa mostra un picco centrato intorno a 9 nm. Oltre a questo, vi è un'altra famiglia di pori più piccoli (6-8 nm) che potrebbero essere legati alla parziale disorganizzazione del tensioattivo, durante la formazione delle micelle. I valori ottenuti confermano la mesoporosità del campione.

La dimensione media dei pori risulta più elevata rispetto a quella dei campioni ottenuti attraverso la procedura sol-gel in ambiente basico. Questa differenza è dovuta alle maggiori dimensioni del tensioattivo polimerico utilizzato: il Pluronic P123.

$SSA_{BET} (m^2/g)$	Volume pori ($cm^3 g^{-1}$)	Dimensione pori (nm)
234.22	0.21	6-8

Tabella 10: Mostra la superficie specifica e il volume dei pori del campione SD 2% Cu

Come si può notare dalla tabella 10 l'area superficiale ottenuta è minore rispetto a quella ottenuta tramite sintesi sol-gel, ma risulta comunque nettamente superiore all'area superficiale di un vetro bioattivo tradizionale (circa $150 m^2/g$)[24].

3.3 Caratterizzazione delle nanoparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica sol-gel in ambiente basico e funzionalizzate

3.3.1 SG 2% Cu Funzionalizzate

Per il campione funzionalizzato la prima analisi effettuata è stata di tipo morfologico.

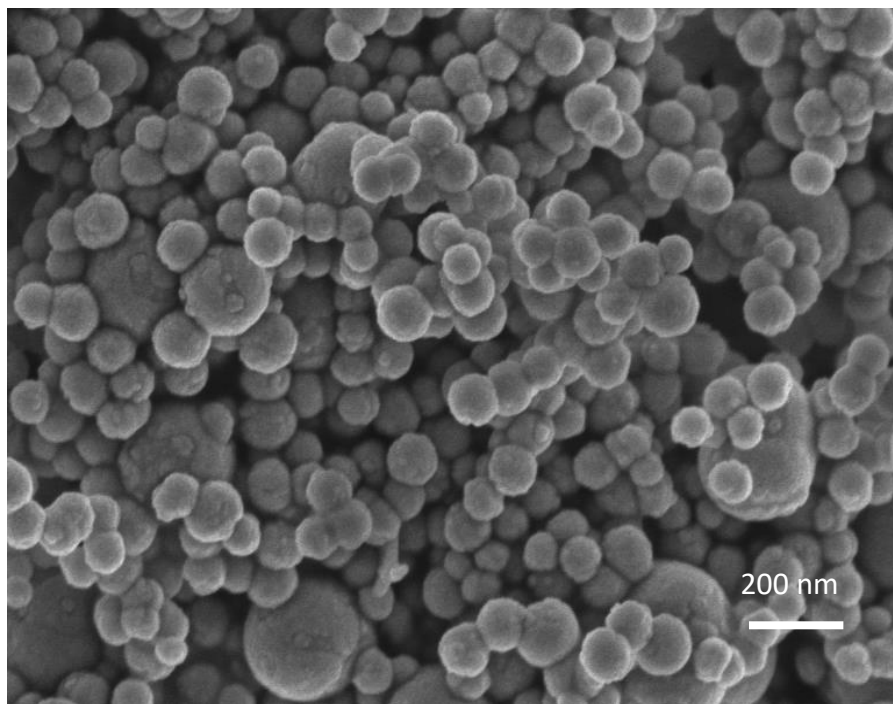


Figura 13: Immagine FESEM del campione SG 2% Cu F

Come si osserva dalla figura 13, la funzionalizzazione non ha influito sulla morfologia delle nanoparticelle, che continuano a mostrare una forma sferica e una dimensione nanometrica nel range di 100-200 nm.

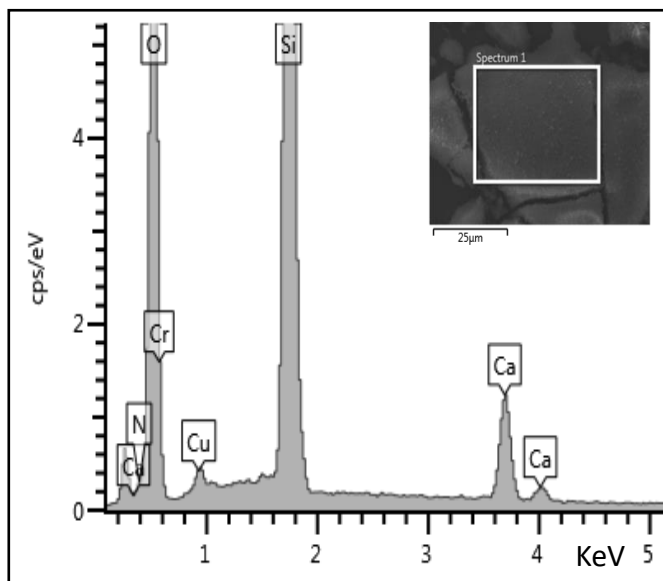


Figura 14: Spettro EDS del campione SG 2% Cu F

Elemento	% Atomica
O	68.40
Si	27.94
Ca	3.02
Cu	0.64
Totale:	100.00

Tabella 11: Dati quantitativi EDS di SG 2% Cu F

Lo spettro EDS, riportato in figura 14, evidenzia la presenza di tutti gli elementi costituenti il reticolo vetroso quali silicio, calcio e rame. Sono inoltre presenti i picchi relativi al cromo, necessario per rendere conduttivo il campione. I dati quantitativi derivanti dall'analisi EDS, condotta in tre diverse aree del campione, sono riportati in tabella 11.

Dai valori riportati in tabella 12, si sono ricavati i rapporti effettivi in modo da poterli confrontare con i rispettivi teorici.

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.10	0.15
Cu/Si	0.022	0.024

Tabella 12: Rapporti effettivi e teorici a confronto

Il rapporto effettivo Cu/Si è molto simile a quello teorico e la lieve differenza potrebbe essere attribuita alla tecnica stessa; mentre la differenza è maggiore nel rapporto Ca/Si e questo è dovuto al fatto che minori quantità di calcio siano state incorporate all'interno del reticolo vetroso, rispetto al quantitativo teorico atteso.

Per confermare che la funzionalizzazione non abbia influenzato la morfologia e la struttura mesoporosa del campione è stata condotta l'analisi TEM.

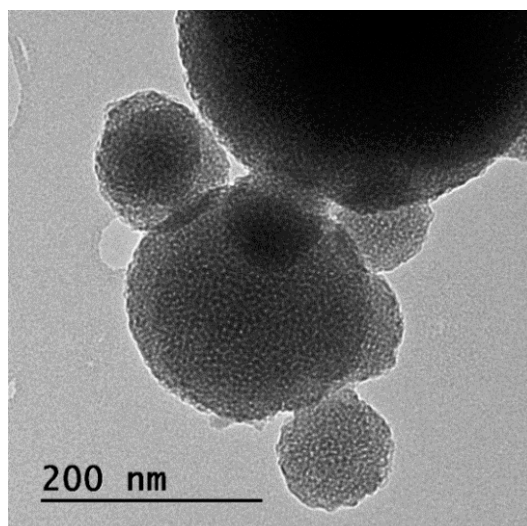


Figura 15: Immagine TEM del campione SG 2% Cu F

Osservando la figura 15 si ha la conferma che la funzionalizzazione non ha influito sulla morfologia sferica e sulla dimensione nanometrica delle particelle.

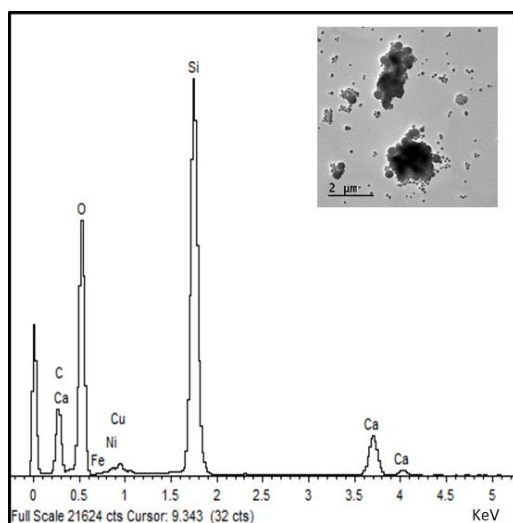


Figura 16: Spettro EDS del campione SG 2% CU F

Elemento	% Atomica
Si	89.45
Ca	8.99
Cu	1.57
Totale:	100.00

Tabella 13: Dati quantitativi EDS di SG 2% Cu F

Il grafico riportato in figura 16 conferma lo spettro EDS sopra riportato (figura 14), mostrando che il rame è stato effettivamente incorporato all'interno del reticolo vetroso.

Dai dati quantitativi si sono ricavati i rapporti tra il calcio e il silicio e tra il rame e il silicio realmente presenti nelle polveri (tabella 14).

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.10	0.15
Cu/Si	0.017	0.024

Tabella 14: Rapporti effettivi e teorici a confronto

I rapporti reali sono molto simili a quelli teorici, indice quindi di un'incorporazione efficace di tutti gli elementi all'interno del reticolo vetroso.

Successivamente il campione è stato sottoposto a un'analisi di adsorbimento e desorbimento dalla quale si sono ottenuti i grafici riportati in figura 17 e 18.

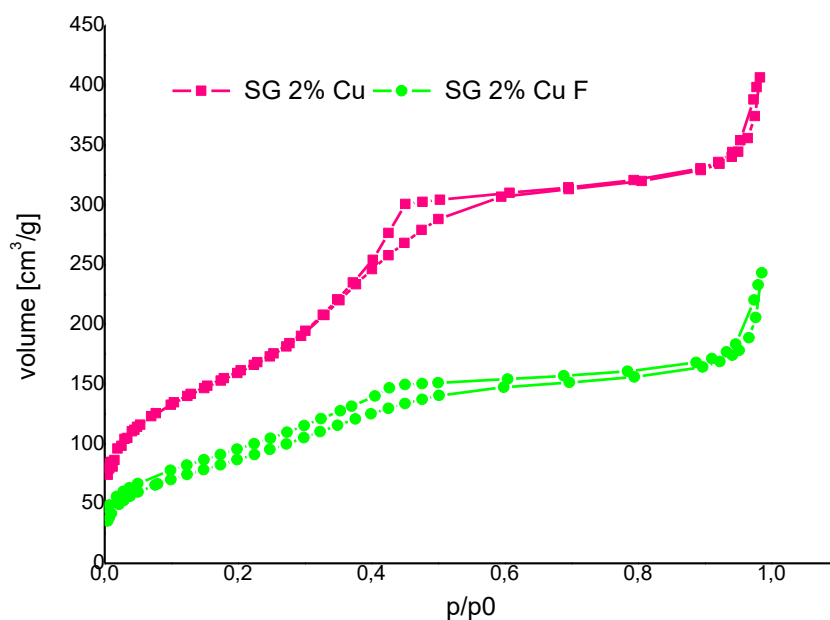


Figura 17: Isotherma di adsorbimento e desorbimento di azoto dei campioni a confronto SG 2% Cu e SG 2% Cu F

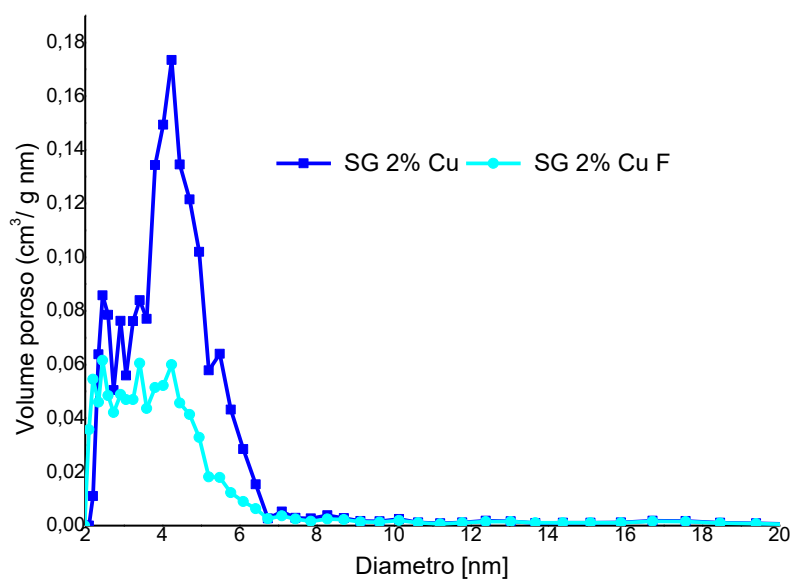


Figura 18: Distribuzione dimensionale dei pori dei campioni a confronto SG 2% Cu e SG 2% Cu F, ottenuta applicando l'algoritmo DFT

Applicando gli algoritmi BET e DFT sono stati ricavati i seguenti valori:

	$SSA_{BET} (m^2/g)$	Volume pori ($cm^3 g^{-1}$)	Dimensioni pori (nm)
SG 2% Cu	599.65	0.54	4-6 nm
SG 2% Cu F	333.76	0.29	2-4 nm

Tabella 15: Mostra la superficie specifica e il volume dei pori del campione SG 2% Cu F

Questo materiale presenta eccellenti proprietà, sia in termini di superficie molto elevata che di volume dei pori, come riportato nella Tabella 15. Dopo la funzionalizzazione, si ha una modifica dell'isoterma con una drastica diminuzione dell'area superficiale visibile in figura 17 e altresì una diminuzione del diametro e del volume dei pori visibile in figura 18. La riduzione della dimensione dei pori è data dalla presenza dei gruppi organosilani presenti all'imboccatura degli stessi, che porta ad una riduzione dell'area superficiale. Infatti, se gli organosilani reagiscono agli ingressi dei pori durante le fasi iniziali di reazione, la diffusione dei precursori all'interno dei mesopori può essere compromessa, causando una distribuzione irregolare e, in alcuni casi, alla quasi chiusura dei pori.

Successivamente, il campione è stato sottoposto ad analisi FTIR, per poter confermare l'avvenuta funzionalizzazione, rilevabile dalla presenza dei gruppi caratteristici.

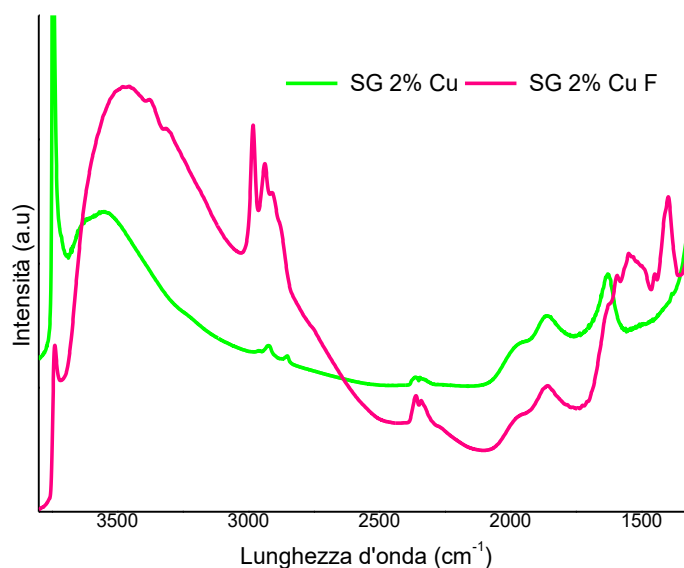


Figura 19: Analisi FTIR dei campioni a confronto SG 2% Cu e SG 2% Cu F

La figura 19 mostra gli spettri FT-IR dei campioni non funzionalizzati e zwitterionici. Entrambi gli spettri presentano nel range tra 3750–3000 cm^{-1} le tipiche bande di assorbimento, corrispondenti alle frequenze vibrazionali di stretching degli idrossili. Osservando la figura sono evidenti le differenze tra i due spettri, in particolare nello spettro funzionalizzato compaiono diverse bande: a 1550 e 1407 cm^{-1} , attribuibili rispettivamente alla vibrazione asimmetrica (mas) e simmetrica (ms) di stretching del gruppo carbossilato COO^- , a 1650 cm^{-1} corrispondenti al bending del gruppo di

ammine protonate NH_3^+ e a $1930\text{-}1870\text{ cm}^{-1}$ corrispondenti allo stretching dei gruppi CH. Al contrario, la banda di assorbimento C=O del gruppo COOH a 1706 cm^{-1} e la banda a 1595 cm^{-1} , attribuibile al bending dell'ammina NH_2 non appaiono nello spettro FTIR dei campioni zwitterionici. Queste osservazioni rivelano che gli MBG Cu2% SG F presentano una superficie carica mista, dovuta alla co-presenza dei gruppi NH_3^+ e COO^- , rispettivamente.

Infine, si può concludere affermando che la funzionalizzazione è avvenuta e che i campioni sono effettivamente carichi.

Per stimare i componenti organici ancorati sulla superficie, in base alla perdita di peso è stata condotta un'analisi termogravimetrica.

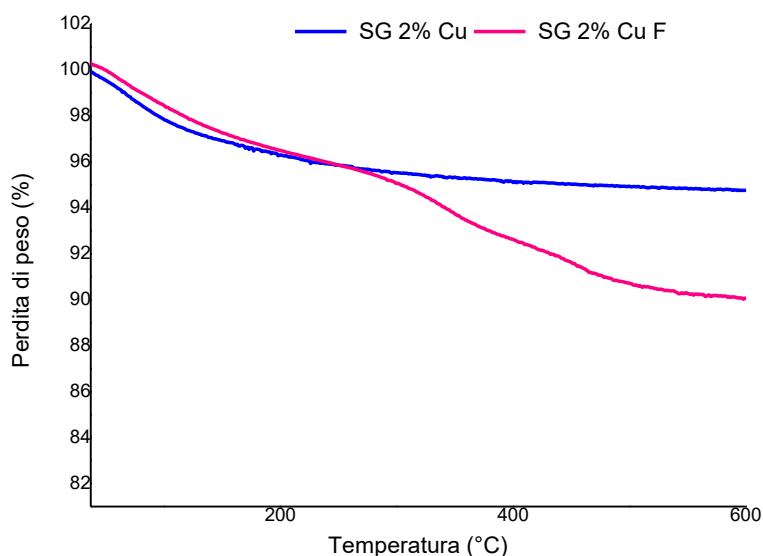


Figura 20: Analisi TGA dei campioni a confronto SG 2% Cu e SG 2% Cu F

Dal grafico si può osservare una perdita in peso del campione tal (SG 2% Cu) quale intorno ai 100°C dovuta all'eliminazione dell'acqua adsorbita mentre il campione funzionalizzato (SG 2% Cu F) ha una netta perdita in peso tra i $300\text{-}600^\circ\text{C}$ dovuta alla decomposizione dei composti organici.

3.4 Caratterizzazione delle microparticelle con ioni rame sintetizzate tramite tecnica spray-drying e funzionalizzate

3.4.1 SD 2% Cu Funzionalizzate

Per il campione funzionalizzato la prima analisi effettuata è stata di tipo morfologico.

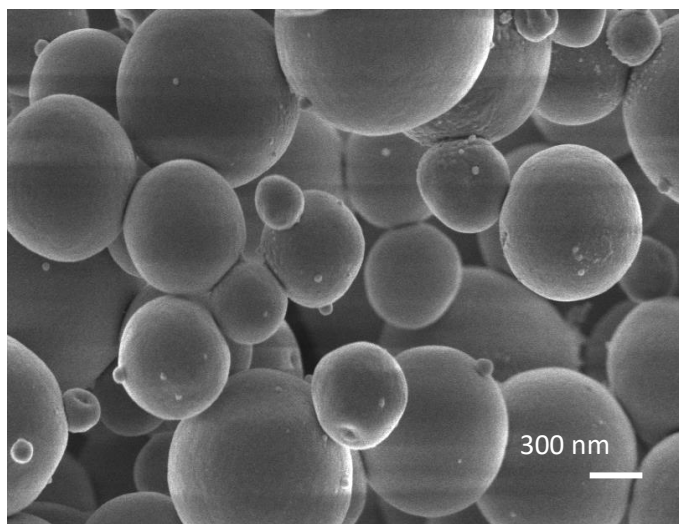


Figura 21: Immagine FESEM del campione SD 2% Cu F

Come si osserva dalla figura 21 la funzionalizzazione non ha influito sulla morfologia delle particelle che continuano a mostrare una forma sferica e una dimensione micrometrica.

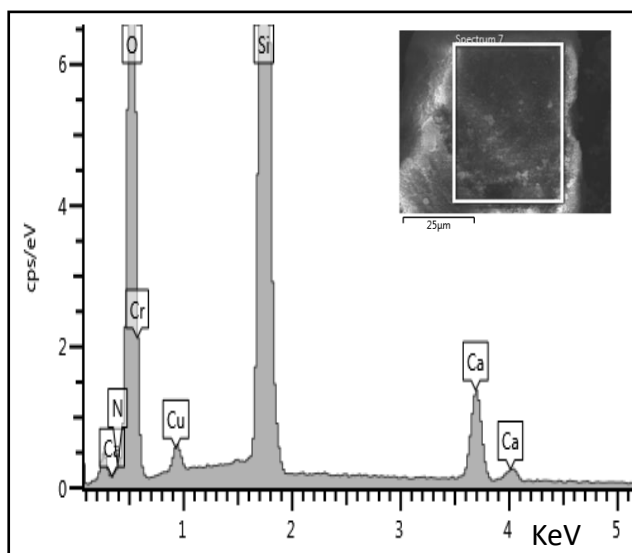


Figura 22: Spettro EDS del campione SD 2% Cu F

Elemento	% Atomica
O	71.83
Si	24.45
Ca	2.85
Cu	0.92
Totale:	100.00

Tabella 16: Dati quantitativi EDS di SD 2% Cu F

Lo spettro EDS, riportato in figura 22, evidenzia la presenza di tutti gli elementi costituenti il reticolo vetroso quali silicio, calcio e rame. Sono inoltre presenti i picchi relativi al cromo, necessario per

rendere conduttivo il campione. I dati quantitativi derivanti dall'analisi EDS, condotta in tre diverse aree del campione, sono riportati in tabella 16.

Dai valori riportati in tabella 17, si sono ricavati i rapporti effettivi in modo da poterli confrontare con i rispettivi teorici.

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.12	0.15
Cu/Si	0.038	0.023

Tabella 17: Rapporti effettivi e teorici a confronto

Questi risultati indicano che il rame è stato effettivamente incorporato all'interno del reticolo vetroso mentre si sono incorporate minori quantità di silicio e calcio. Inoltre, bisogna considerare che l'EDS è una tecnica semiquantitativa e dunque è normale osservare dei rapporti effettivi leggermente diversi da quelli teorici.

Per confermare che la funzionalizzazione non abbia influenzato la morfologia e la struttura mesoporosa del campione è stata condotta l'analisi TEM.

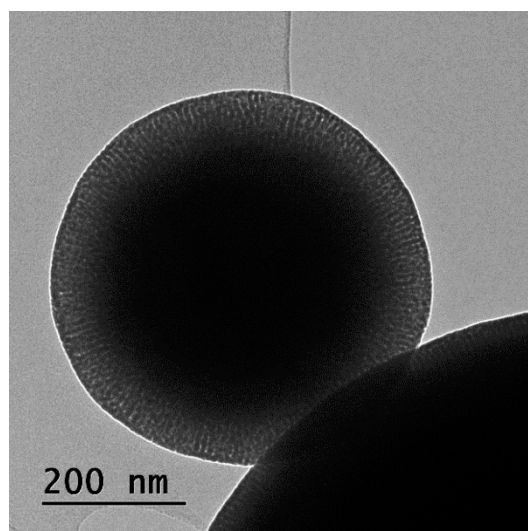


Figura 23: Immagine TEM del campione SD 2% Cu F

Osservando la figura 23 si ha la conferma che la funzionalizzazione non ha influito sulla morfologia sferica e sulla dimensione micrometrica delle particelle.

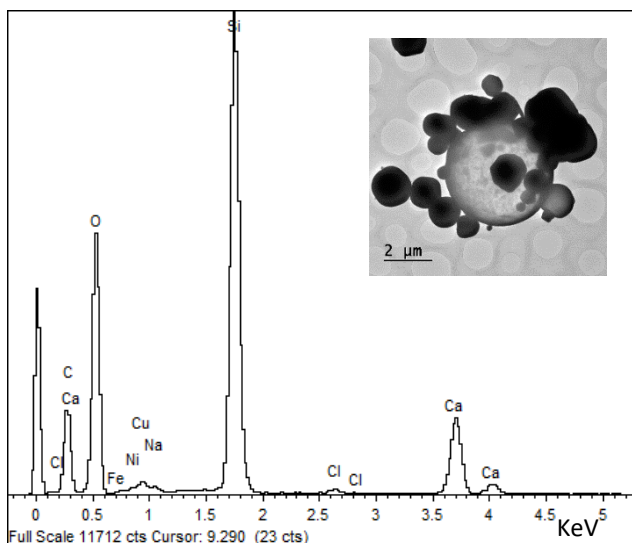


Figura 24: Spettro EDS del campione SD 2% Cu F

Elemento	% Atomica
Si	85.18
Ca	12.96
Cu	1.86
Totale:	100.00

Tabella 18: Dati quantitativi EDS di SD 2% Cu F

Il grafico riportato in figura 24 conferma lo spettro EDS sopra riportato (figura 22), mostrando che il rame è stato effettivamente incorporato all'interno del reticolo vetroso.

Dai dati quantitativi si sono ricavati i rapporti tra il calcio e il silicio e tra il rame e il silicio realmente presenti nelle polveri.

Rapporti elementi	Rapporto effettivo	Rapporto teorico
Ca/Si	0.15	0.15
Cu/Si	0.021	0.023

Tabella 19: Rapporti effettivi e teorici a confronto

Il rapporto effettivo Cu/Si è molto simile a quello teorico e la lieve differenza potrebbe essere attribuita alla tecnica stessa, la cui precisione diminuisce al diminuire delle quantità da detectare, mentre il rapporto Ca/Si effettivo è identico a quello teorico atteso.

In seguito, il campione è stato sottoposto a un'analisi di adsorbimento e desorbimento dalla quale si sono ottenuti i grafici riportati in figura 25 e 26.

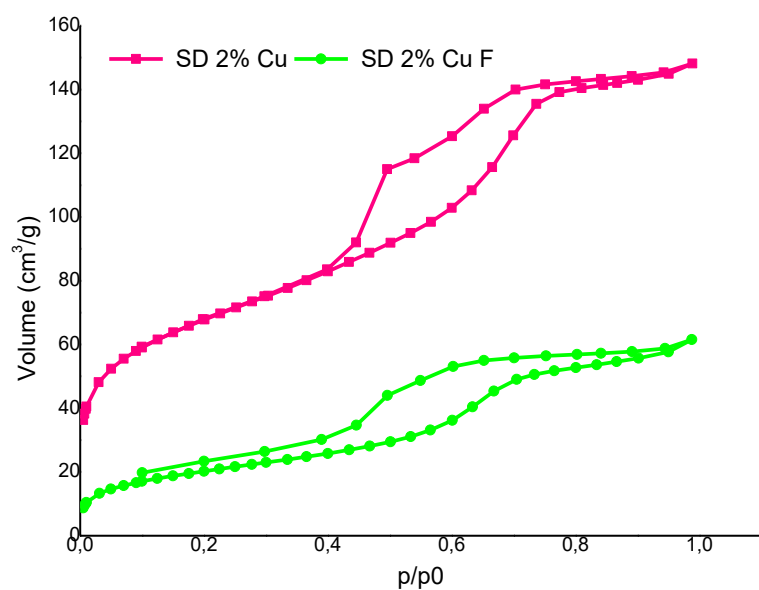


Figura 25: Isotherma di adsorbimento e desorbimento di azoto dei campioni a confronto SD 2% Cu e SD 2% Cu F

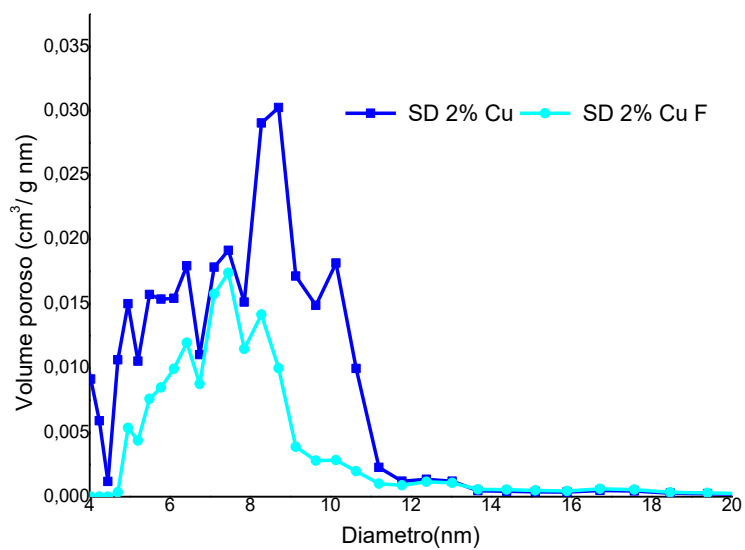


Figura 26: Distribuzione dimensionale dei pori dei campioni a confronto SD 2% Cu e SD 2% Cu F, ottenuta applicando l'algoritmo DFT

Applicando gli algoritmi BET e DFT sono stati ricavati i valori riportati in tabella 20:

	$SSA_{BET} (m^2/g)$	Volume pori ($cm^3 g^{-1}$)	Dimensioni pori (nm)
SD 2% Cu	234.22	0.21	6-10 nm
SD 2% Cu F	72.61	0.09	7-9 nm

Tabella 20: Mostra la superficie specifica e il volume dei pori del campione SD 2% Cu F

Le isoterme N_2 di adsorbimento-desorbimento in figura 25 sono di tipo IV e mostrano un ciclo di isteresi pronunciato, in particolare nel campione funzionalizzato (SD 2% Cu F) è visibile una modifica dell'isoterma con un'importante diminuzione dell'area superficiale, variando da un valore pari a $234.22 m^2/g$ a $72.61 m^2/g$. In figura 26, invece si può osservare una diminuzione del diametro e del volume dei pori del campione funzionalizzato rispetto al suo tal quale, come riportati in Tabella 20. La riduzione della dimensione dei pori è data dalla presenza dei gruppi organosilani presenti all'imboccatura degli stessi, che porta ad una riduzione dell'area superficiale. Infatti, se gli organosilani reagiscono agli ingressi dei pori durante le fasi iniziali di reazione, la diffusione dei precursori all'interno dei mesopori può essere compromessa, causando una distribuzione irregolare e, in alcuni casi, alla quasi chiusura dei pori.

Successivamente, il campione è stato sottoposto ad analisi FTIR, per poter confermare l'avvenuta funzionalizzazione, rilevabile dalla presenza dei gruppi caratteristici.

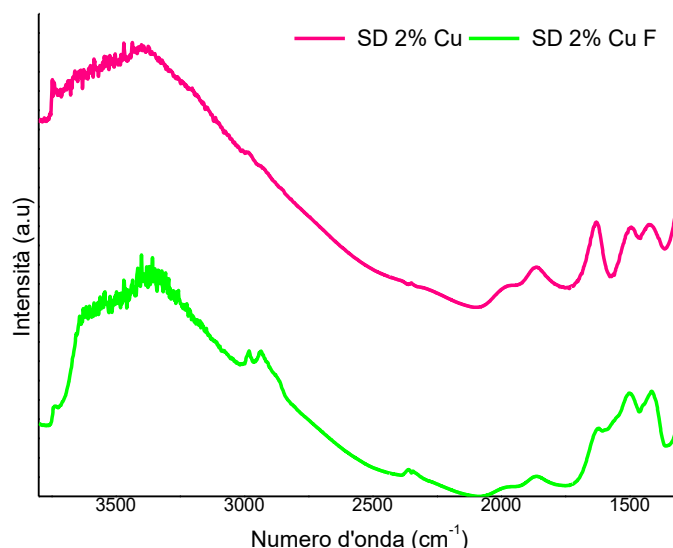


Figura 27: Analisi FTIR dei campioni a confronto SD 2% Cu e SD 2% Cu F

La figura 27 mostra gli spettri FT-IR dei campioni non funzionalizzati che zwitterionici. Entrambi gli spettri presentano nel range tra $3750-3000 cm^{-1}$ le tipiche bande di assorbimento, corrispondenti alle frequenze vibrazionali di stretching degli idrossili. Osservando la figura sono evidenti le

differenze tra i due spettri, in particolare nello spettro funzionalizzato sono presenti le bande: a 1407 cm^{-1} , attribuite rispettivamente alla vibrazione asimmetrica (mas) e simmetrica (ms) di stretching del gruppo carbossilato COO^- , a $1650\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ corrispondenti al bending del gruppo di ammine protonate NH_3^+ e a $1930\text{-}1870\text{ cm}^{-1}$ corrispondenti allo stretching di CH. Al contrario, la banda di assorbimento C=O del gruppo COOH a 1706 cm^{-1} e la banda a 1595 cm^{-1} , attribuibile al bending dell'ammina NH_2 non appaiono nello spettro FTIR dei campioni zwitterionici. Queste osservazioni rivelano che gli MBG Cu2% SD_F presentano una superficie carica mista, a causa della co-presenza dei gruppi NH_3^+ e COO^- , rispettivamente. Infine, si può concludere affermando che la funzionalizzazione è avvenuta e che i campioni sono effettivamente carichi.

Per stimare i componenti organici ancorati sulla superficie, in base alla perdita di peso è stata condotta un'analisi termogravimetrica.

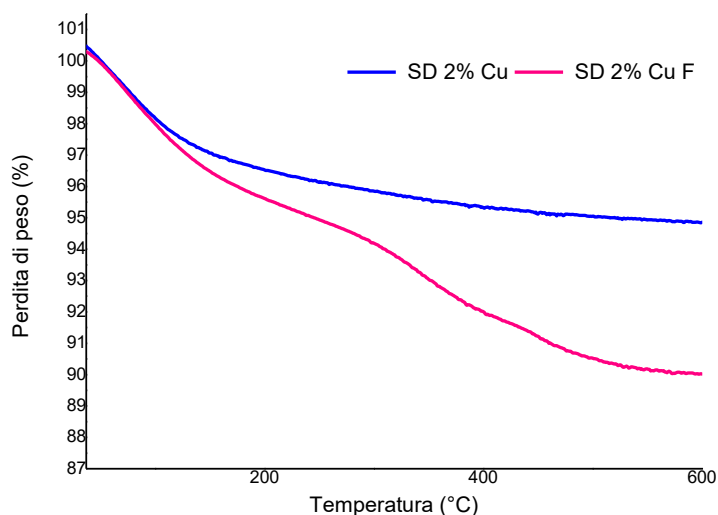


Figura 28: Analisi TGA dei campioni a confronto SD 2% Cu e SD 2% Cu F

Dal grafico si può osservare una perdita in peso del campione tal quale (SD 2% Cu) intorno ai 100°C dovuta all'eliminazione dell'acqua adsorbita mentre il campione funzionalizzato (SD 2% Cu F) ha una netta perdita in peso tra i $300\text{-}600^\circ\text{C}$ dovuta alla decomposizione dei composti organici.

3.5 Confronto tra i campioni sol-gel in ambiente basico e sol-gel accoppiata all'utilizzo della tecnica spray-drying

Nella tabella sottoesposta vengono riassunte le caratteristiche principali dei campioni ottenuti tramite procedura sol-gel e spray-drying.

CARATTERISTICHE	SG		SD	
	SG 2% Cu	SG 2% Cu F	SD 2% Cu	SD 2% Cu F
Dimensione delle particelle	100-200 nm	100-200 nm	0.2-5 μm	0.2-5 μm
Area specifica superficiale	599.65 (m^2/g)	333.76 (m^2/g)	234.22 (m^2/g)	72.6 (m^2/g)
Volume dei pori	0.54	0.29	0.21	0.09
Dimensione media dei pori	4-6 nm	4-6 nm	6-10 nm	7-9 nm

Tabella 21: Tabella riassuntiva del confronto tra le particelle ottenute tramite tecnica sol-gel e tecnica spray-drying

Dall'analisi della tabella 21, si può osservare che le particelle spray-dried, presentano dimensioni di un ordine di grandezza maggiore rispetto a quelle ottenute con la tecnica sol-gel.

Nei campioni SG, l'area specifica e il volume dei pori, presentano valori maggiori attribuibili al tipo di sintesi utilizzata, che viene condotta in ambiente basico e in presenza del CTAB, la quale consente di ottenere una struttura altamente organizzata.

Nelle particelle SD la presenza dello ione rame sembra avere un maggiore impatto sulla disorganizzazione del reticolo, portando a strutture con aree specifiche minori. Infine, è possibile osservare che le particelle SD possiedono dei mesopori di dimensione media variabile fra i 6 e i 10 nm, circa doppia rispetto a quella dei campioni derivanti da sintesi sol-gel, dovuto alle maggiori dimensioni del tensioattivo utilizzato (Pluronic P123).

A seguito della funzionalizzazione, in entrambe i campioni, si rileva che la morfologia e la dimensione delle particelle non si sono modificate rispetto al loro tal quale. Al contrario, il volume e la dimensione dei pori, subiscono una diminuzione rispetto ai campioni tal quali, dovuta ai gruppi organosilani presenti alla loro imboccatura, causando una diminuzione dell'area specifica superficiale.

3.6 Caratterizzazione delle matrici sol-gel in ambiente basico e spray-drying funzionalizzate e caricate con rifampicina

L'analisi condotta per studiare la morfologia del campione è il FESEM.

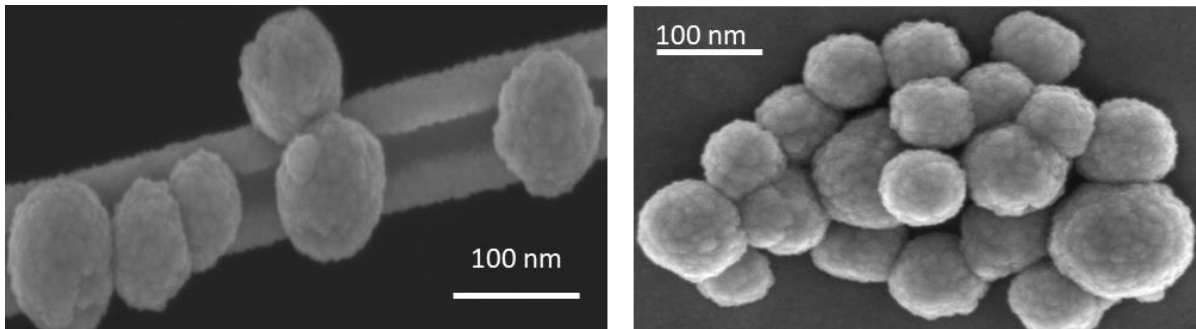


Figura 29: Immagini FESEM dei campioni SG 2% Cu (dx) e SG 2% Cu F (sx) entrambe con rifampicina

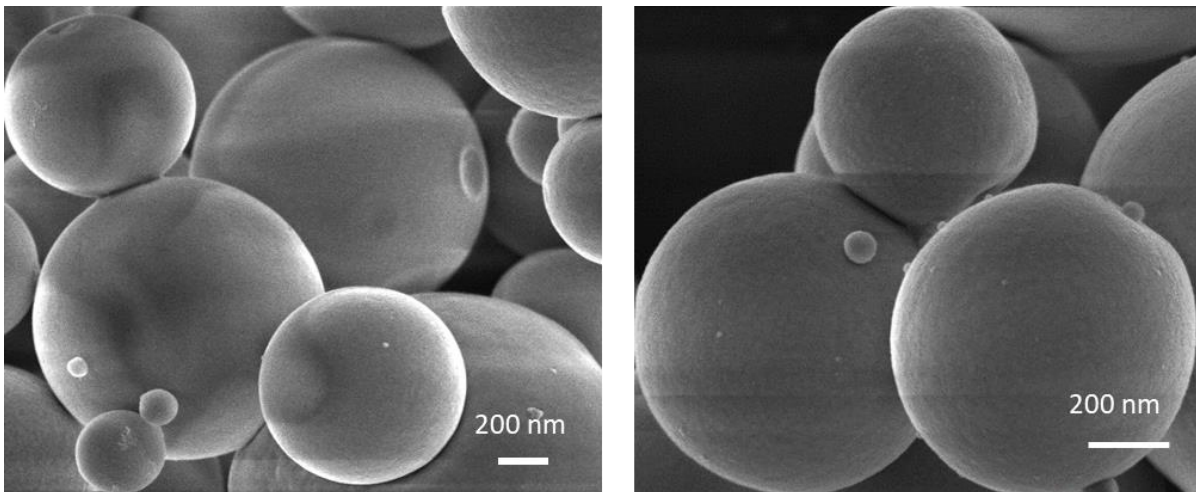


Figura 30: Immagini FESEM dei campioni SG 2% Cu (dx) e SG 2% Cu F (sx) entrambe con rifampicina

L'incapsulamento del farmaco non influenza la morfologia sferica e la dimensione delle particelle, che nel caso sol-gel in ambiente basico è nel range 100-200 nm, mentre nel caso spray-drying è nel range 0.2-5 μm .

La quantità di farmaco incorporata nelle matrici mesoporose può essere determinata attraverso l'analisi termogravimetrica.

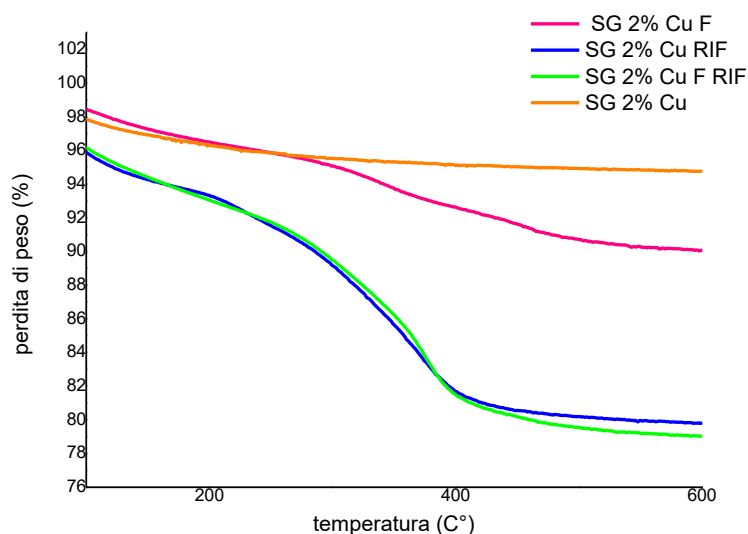


Figura 31: Analisi termogravimetrica del campione sol-gel in ambiente basico

Confrontando la curva del campione SG 2% Cu F con quello SG 2% Cu F RIF, in quest'ultima si ha una netta perdita in peso, dovuta all'effettivo incapsulamento della rifampicina. Per calcolare la reale quantità di farmaco incapsulato nelle matrici, sono state condotte delle analisi elementari, in quanto, non è stato possibile attraverso l'analisi termogravimetrica, a causa della presenza di altre molecole organiche (APST e CES) dovute alla funzionalizzazione.

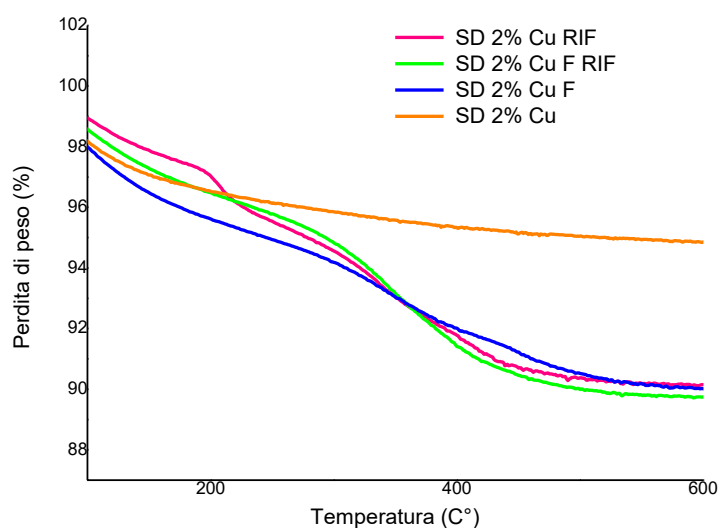


Figura 32: Analisi termogravimetrica del campione spray-drying

Confrontando la curva del campione SD 2% Cu F con quello SD 2% Cu F RIF, si ha in quest'ultima una perdita in peso minore, rispetto al caso sol-gel, causata da una minore quantità di rifampicina incapsulata. Per calcolare la reale quantità di farmaco incapsulato nelle matrici, sono state condotte

delle analisi elementari, in quanto, non è stato possibile attraverso l'analisi termogravimetrica, a causa della presenza di altre molecole organiche (APST e CES) dovute alla funzionalizzazione.

3.7 Test di rilascio di rifampicina

Concentrazione [$\mu\text{g/mL}$]	A
0.2	0.001
0.5	0.012
1	0.035
2.5	0.022
10	0.155
25	0.438
35	0.623
50	0.862
100	1.734

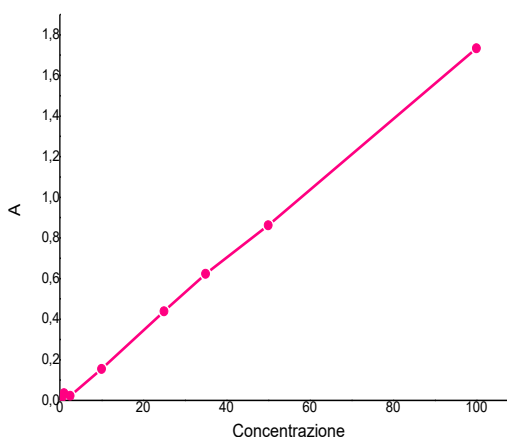


Figura 33: Curva di liberazione della rifampicina con: $y=0.0174x-0.00017$ partendo da concentrazioni note e calcolo dell'assorbanza tramite spettroscopia UV-visibile

La rifampicina possiede un picco di assorbimento caratteristico a 474 nm quindi misurando l'assorbanza di soluzioni di tale farmaco a concentrazioni note (figura 33) è stato possibile costruire la retta di taratura (anche detta curva di calibrazione).

Questo perché la legge di Lambert-Beer rappresenta una retta passante per l'origine degli assi in cui $\epsilon \cdot d$ è il coefficiente angolare.

Effettuato il test del rilascio della rifampicina, il surnatante prelevato ad ogni time-point viene posto in cuvette per misurarne l'assorbanza attraverso la spettroscopia UV-visibile. Dall'equazione della retta di taratura ricavata (figura 33) e dall'assorbanza del campione rilevata con lo strumento è possibile calcolare la concentrazione del campione ad ogni time point applicando la seguente equazione:

$$\text{Concentrazione } [\mu\text{g/mL}] = \frac{A + 0.0017}{0.0174}$$

Equazione 1: Formula per calcolare la concentrazione ad ogni time-point

Una volta calcolate le concentrazioni incognite di rifampicina in soluzione, nei diversi tempi di prelievo (definiti nella descrizione dei test di rilascio), è stato quindi possibile tracciare il profilo di rilascio.

	1h	3h	6h	24h	48h	3G	7G
SG RIF [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	4.92	7.97	9.21	9.38	9.67	10.05	10.75
SG RIF funz [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	0.9	1.48	2.06	2.64	2.82	3.17	3.49
SD RIF [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	0.24	0.91	1.66	2.33	2.62	3.06	3.99
SD RIF funz [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	0.29	0.64	0.93	1.4	1.52	1.84	2.36

Tabella 22: Concentrazione cumulativa ad ogni time-point (Q_t)

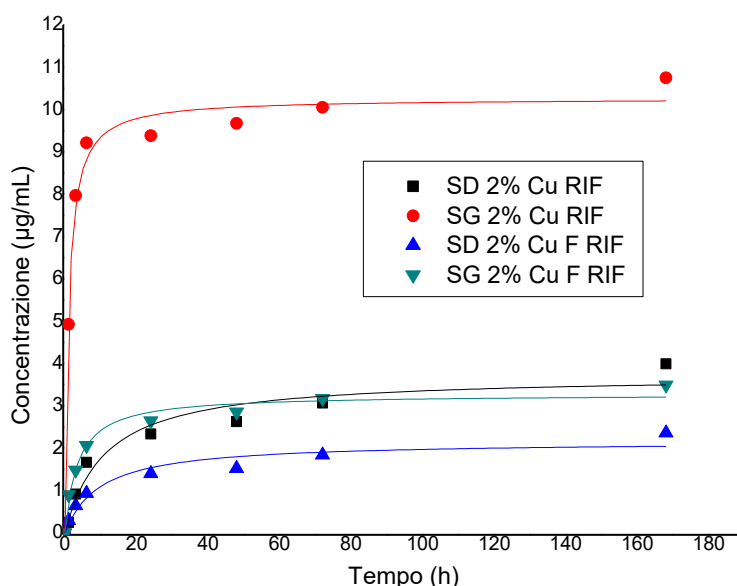


Figura 34: Concentrazione di rifampicina liberata in ogni campione ad ogni time-point in funzione del tempo

Il grafico, in figura 34, mostra un rilascio di farmaco over-time nelle prime 24 ore, seguito da un plateau con un continuo possibile rilascio, che è visibile da un andamento a salita. Le matrici sintetizzate con la tecnica sol-gel, hanno un rilascio maggiore di farmaco e questo è spiegabile grazie ad un'area superficiale maggiore, che permette di incapsulare più farmaco (5.3 % m/m). Al contrario, le matrici spray drying rilasciano meno farmaco, in quanto la quantità incapsulata è decisamente inferiore (1.5% m/m). La funzionalizzazione non va ad influire sul rilascio.

Attraverso le analisi elementari condotte, che mostrano le percentuali di azoto, ossigeno e idrogeno presenti nei campioni, precedentemente sintetizzati tramite tecniche sol-gel e spray-drying, in seguito funzionalizzati zwitterionicamente e infine caricati con rifampicina, è stato possibile risalire alla percentuale della stessa realmente incapsulata. Per calcolarla è stata utilizzata la percentuale di azoto, in quanto è l'elemento tra quelli presenti ad avere il peso atomico maggiore e quindi ad avere un errore minore. Infine, è stata calcolata la quantità massima di farmaco rilasciabile dal test (Q_{max}).

	% Rif (m/m)	Qmax [$\mu\text{g/mL}$]
SG RIF 2% Cu	5.3	13.25
SG RIF F 2% Cu	1.77	4.425
SD RIF 2% Cu	1.5	3.75
SD RIF F 2% Cu	0.5	1.25

Tabella 23: Quantità di rifampicina presente nei campioni, Q_{max} concentrazione di rifampicina nel campione rapportata a 1mg su 4 mL

Per calcolare la cinetica di rilascio del farmaco, è stata divisa la concentrazione cumulativa di ogni time-point Q_t per la concentrazione totale di rilascio del farmaco Q_{max} (tabella 24) in percentuale.

	1h	3h	6h	24h	48h	3G	7G
SG RIF	0.37	0.60	0.70	0.71	0.73	0.76	0.81
SG RIF F	0.20	0.33	0.47	0.60	0.64	0.72	0.79
SD RIF	0.06	0.24	0.44	0.62	0.70	0.82	1.06
SD RIF F	0.23	0.51	0.74	1.12	1.22	1.47	1.89

Tabella 24: I seguenti valori sono stati ottenuti dividendo Q_t/Q_{max} , dove Q_t è la concentrazione cumulativa ad ogni time-point mentre Q_{max} è la concentrazione rilasciabile totale di rifampicina dal campione rapportata a 1mg su 4 mL

La cinetica di rilascio del farmaco è stata ottenuta mettendo sull'asse delle ordinate il rapporto Q_t/Q_{max} in percentuale, dove Q_t rappresenta la concentrazione cumulativa ad ogni time-point, mentre Q_{max} è la concentrazione rilasciabile massima di rifampicina dal campione rapportata a 1 mg su 4 mL, in funzione del tempo. I tempi considerati sono i vari time-point in cui è stato fatto il test.

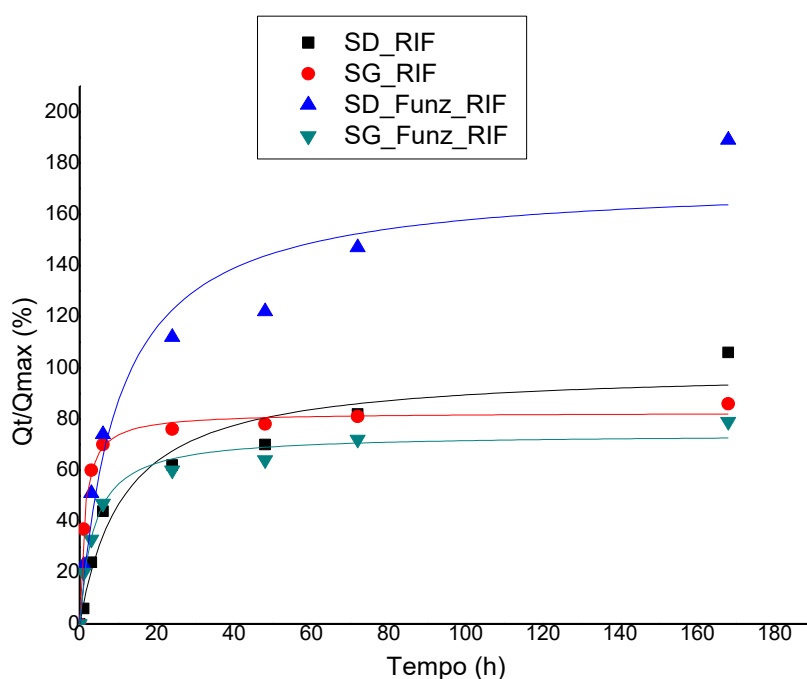


Figura 35: Cinetica di rilascio della rifampicina

Si può concludere osservando il grafico 35, che si ha un buon profilo di rilascio in quanto viene rilasciato quasi l'80% di farmaco incapsulato nelle prime 20h e inseguito si ha un continuo rilascio nel tempo.

3.8 Saggio antibatterico in modelli planctonici

I batteri sono microrganismi piccolissimi con dimensioni dell'ordine di millesimo di millimetro e possiedono forme diverse in base al tipo di batterio considerato. Per identificare un batterio si può utilizzare la colorazione Gram che permette di distinguere, sulla base della parete batterica, i Gram positivi dai Gram negativi.

La colorazione di Gram è un metodo di colorazione differenziale che permette al microscopio ottico di poter osservare i Gram positivi attraverso un colore blu/viola mentre i Gram negativi di colore rosa.

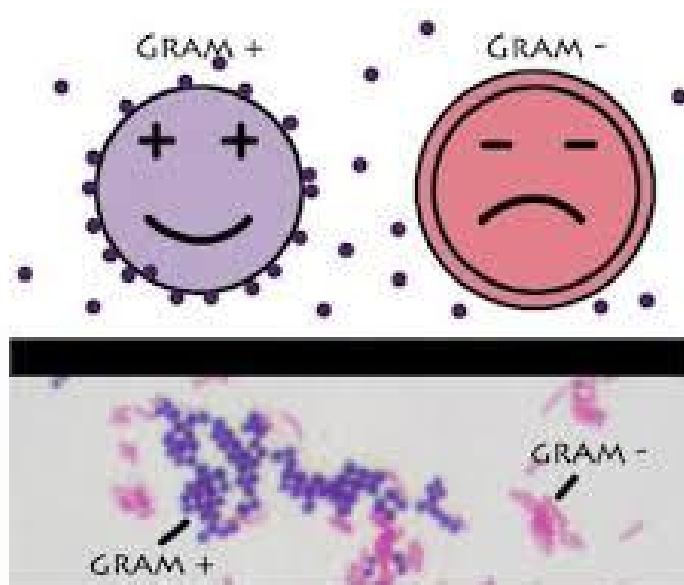


Figura 36: Mostra la differente colorazione per la classificazione dei Gram

Un batterio di particolare interesse è il batterio *Escherichia Coli*.

Questo batterio appartiene al ceppo dei Gram-negativi e risiede nell'intestino delle persone sane. Le infezioni da parte di questo batterio si possono contrarre mangiando cibo contaminato, toccando animali infetti e inghiottendo acqua contaminata.

Per combattere le infezioni causate da questi batteri è stato effettuato un test antibatterico in modello planctonico, per vedere come i batteri reagiscono a contatto con le polveri, sintetizzate tramite le due tecniche (sol-gel e spray-drying), funzionalizzate zwitterionicamente e poi caricate con farmaco.

Il test effettuato è stato eseguito seguendo la metodologia descritta dal gruppo di lavoro della Prof.ssa Vallet- Regi[58] e può essere riassunto nei seguenti passaggi:

- Utilizzare multiwell da 24 pozzetti: aggiungere in ogni pozzetto 0,5 mL di sospensione batterica (2×10^6 batteri/mL) e 0,5 mL di sospensione contenente il campione. Per il controllo di solo batteri mettere nel pozzetto 0,5 mL di sospensione batterica e 0,5 mL di PBS;
- Porre le multiwell in un forno a 37°C con agitazione orbitale a 200 rpm per 16 ore.

Gli MBGs preparati inizialmente, vengono sospesi in PBS, poi sonicati e vortexati alla seguenti concentrazioni: 160, 80, 40, 20, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$.

Le concentrazioni finali ottenute per effettuare il test antibatterico in planctonico sono: 80, 40, 20, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$.

Trascorse 16 ore di incubazione, togliere le multiwell dalla stufa e preparare 2 diluizioni di ogni pozzetto.

- La prima diluizione (D1), è una diluizione di 1:100 rispetto alla concentrata, viene preparata aggiungendo 990 μL di PBS sterile e 10 μL prelevati dal pozzetto della mutiwell (soluzione concentrata).
- La seconda diluizione (D2) è una diluizione 1:1000 rispetto alla concentrata, ed è preparata aggiungendo 900 μL di PBS sterile e 100 μL di diluizione D1, precedentemente vortexata.

Per ogni campione, viene utilizzata una piastra di agar divisa in 3 settori, identificati come diluizione 1 (D1), diluizione 2 (D2) e soluzione concentrata, all'interno di ognuno vengono gocciolate 5 gocce di 10 μL , rispettivamente delle due diluizioni e della soluzione concentrata.



Figura 37: Piastra di Agar contenente i tre settori (soluzione concentrata, diluizione 1, diluizione 2)

Le piastre di agar vengono poi poste nella stufa over night.

Il giorno dopo si prelevano dalla stufa le piastre e si procede con il contare le CFU (colony forming units).

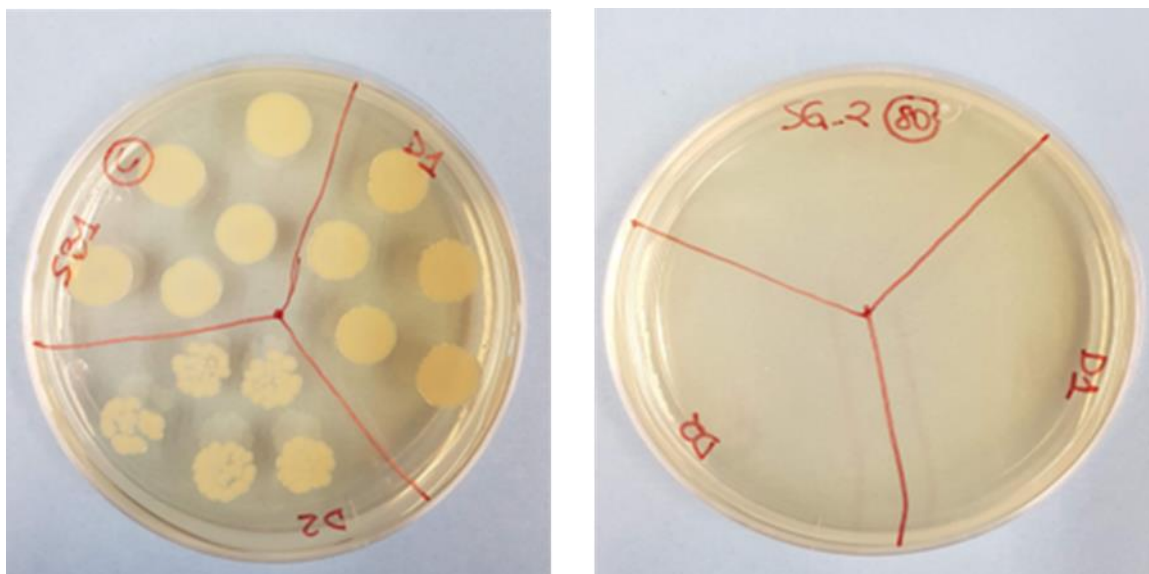


Figura 38: La prima piastra di Agar (sx), è un controllo contenente solo batteri mentre la seconda piastra (dx) è un campione sol-gel a concentrazione 80 µg/mL.

La figura 38 mostra a sinistra una piastra di Agar seminata con soli batteri *E.coli*, che come da aspettative, in assenza dei vetri mesoporosi bioattivi che creano l'effetto antibatterico, vi è la crescita dei batteri stessi. Al contrario l'immagine di destra mostra come il campione MBG ottenuto con tecnica di sintesi sol-gel in ambiente basico, alla concentrazione 80 µg/mL avente un'azione anti batterica, abbia inibito la crescita. I batteri analizzati in questo lavoro di tesi sono l' *Escherichia.Coli* e gli *Stafilococco.Aureus*.

Le tabelle sotto riportate mostrano i risultati del test antibatterico in modelli planctonici utilizzando i batteri *E.Coli*.

	Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect		Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect
SG [5 µg/mL]	50 CFU/mL	99.99%	SD [5 µg/mL]	2,81*10 ⁶ CFU/mL	9.06%
SG [10 µg/mL]	350 CFU/mL	99.99%	SD [10 µg/mL]	2,15*10 ⁶ CFU/mL	30.42%
SG [20 µg/mL]	650 CFU/mL	99.98%	SD [20 µg/mL]	680*10 ³ CFU/mL	77.99%
SG [40 µg/mL]	0	100%	SD [40 µg/mL]	600 CFU/mL	99.98%
SG [80 µg/mL]	0	100%	SD [80 µg/mL]	70 CFU/mL	99.99%

	Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect		Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect
SG_F [5 µg/mL]	100*10 ³ CFU/mL	4.76%	SD_F [5 µg/mL]	170 CFU/mL	99.70%
SG_F [10 µg/mL]	0,2*10 ³ CFU/mL	99.80%	SD_F [10 µg/mL]	80 CFU/mL	99.86%
SG_F [20 µg/mL]	203*10 ³ CFU/mL	100%	SD_F [20 µg/mL]	0 CFU/mL	100%
SG_F [40 µg/mL]	10 CFU/mL	100%	SD_F [40 µg/mL]	0 CFU/mL	100%
SG_F [80 µg/mL]	0 CFU/mL	100%	SD_F [80 µg/mL]	0 CFU/mL	100%

Tabella 25: Batteri *Escherichia.Coli* con concentrazione 2x10⁶ batteri/mL

Osservando queste tabelle, si può dedurre che il campione sol-gel, mostra un effetto antibatterico per tutte le concentrazioni testate; al contrario il campione spray-drying ha un effetto antibatterico più rallentato, in quanto tale effetto è presente solo per alte concentrazioni.

I test di rilascio del rame, non sono stati effettuati, nonostante ciò, dai dati presenti in queste tabelle, si può affermare, che per il campione sol-gel il rilascio del rame è immediato già a basse concentrazioni, mentre per il campione spray-drying, il rilascio è più lento. Da questo emerge, la necessità di avere una maggiore quantità di rame presente nelle polveri, per poter ottenere un effetto antibatterico migliore.

Per quanto riguarda i campioni funzionalizzati, per entrambi si ha un ottimo effetto antibatterico già a basse concentrazioni, da questo si può affermare che la funzionalizzazione non inibisce l'effetto antibatterico desiderato.

Le tabelle sotto riportate mostrano i risultati del test antibatterico in modelli planctonici, utilizzando il batterio *S.Aureus*.

	Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect		Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect
SG [5 µg/mL]	1.82*10 ³ CFU/mL	46.78%	SD [5 µg/mL]	2.82*10 ³ CFU/mL	9.06%
SG [10 µg/mL]	1.62*10 ³ CFU/mL	52.26%	SD [10 µg/mL]	1.36*10 ³ CFU/mL	53%
SG [20 µg/mL]	3.2*10 ³ CFU/mL	64.82%	SD [20 µg/mL]	880 CFU/mL	70%
SG [40 µg/mL]	0	100%	SD [40 µg/mL]	900 CFU/mL	70%
SG [80 µg/mL]	0	100%	SD [80 µg/mL]	1730 CFU/mL	41% *

	Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect		Media bacteria/mL	Anti-bacterial effect
SG F [5 µg/mL]	1080	6.8%	SD F [5 µg/mL]	1200 CFU/mL	11.4%
SG F [10 µg/mL]	820	26.9%	SD F [10 µg/mL]	1170 CFU/mL	12.1%
SG F [20 µg/mL]	20	97.9%	SD F [20 µg/mL]	20 CFU/mL	98.9%
SG F [40 µg/mL]	0	100%	SD F [40 µg/mL]	0	100%
SG F [80 µg/mL]	0	100%	SD F [80 µg/mL]	0	100%

Tabella 26: Batteri *Stafilococco.Aureus* con concentrazione 2x10⁶ batteri/mL

Osservando queste tabelle, si può dedurre che il campione sol-gel, mostra un effetto antibatterico solo ad alte concentrazioni; mentre il campione spray-drying manifesta un effetto antibatterico più rallentato. L'ultimo dato non è significativo in quanto potrebbe essere il risultato di un errore sperimentale, a tal proposito verranno effettuate ulteriori investigazioni.

I test di rilascio del rame, non sono stati effettuati, nonostante ciò, dai dati presenti in queste tabelle, si può affermare, che per il campione sol-gel il rilascio del rame avviene già a basse concentrazioni, mentre per il campione spray-drying, il rilascio è più lento. Da questo emerge, la necessità di avere una maggiore quantità di rame presente nelle polveri, per poter ottenere un effetto antibatterico migliore.

Per quanto riguarda i campioni funzionalizzati, per entrambi si ha un effetto antibatterico presente ad alte concentrazioni, da questo si può affermare che la funzionalizzazione non inibisce l'effetto antibatterico desiderato.

Mettendo a confronto il comportamento del batterio *E.Coli* rispetto a quello dello *S.Aureus*, si può affermare che quest'ultimo sviluppa maggiore resistenza nei confronti del materiale, diminuendone così l'effetto antibatterico. Al contrario il batterio *E.Coli* non manifesta resistenza, in quanto il materiale manifesta un effetto antibatterico già a basse concentrazioni. Concludendo si può affermare, che il materiale reagisce in maniera diversa a seconda della sintesi condotta. In linea generale, i campioni sol-gel tendono a presentare un comportamento antibatterico più spiccato grazie al rilascio immediato del rame.

Capitolo 4 – Conclusioni

Il lavoro di tesi svolto e descritto nei capitoli precedenti può essere riassunto in quattro fasi:

1. Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle bioattive mesoporose, realizzate mediante tecnica sol-gel in ambiente basico, con composizione binaria $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ e modificate con ioni rame alla percentuale molare del 2%;
2. Sintesi e caratterizzazione di particelle micrometriche mesoporose, ottenute tramite procedura sol-gel assistita dall'utilizzo di uno spray-dryer, con la medesima percentuale di ioni rame delle matrici prodotte nel punto 1;
3. Funzionalizzazione delle matrici nanometriche e micrometriche ottenute dalle sintesi precedenti;
4. Incorporazione della rifampicina all'interno di matrici mesoporose bioattive (sia sol-gel che spray-dryer) con composizione binaria $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ mediante procedura di impregnation method.

Nei paragrafi successivi, verranno esposti i risultati ottenuti dalla caratterizzazione delle matrici prodotte, e le relative conclusioni alle quali si è potuto giungere, inoltre saranno presentati gli sviluppi futuri di questo lavoro di tesi.

4.1 Conclusioni caratterizzazione nano-micro matrici

I campioni sintetizzati, con le tecniche sol-gel e spray-drying, contenenti il 2% di rame sono stati caratterizzati dal punto di vista morfologico attraverso il FESEM e il TEM, composizionale attraverso EDS e infine strutturale attraverso misure di adsorbimento e desorbimento di azoto.

Analizzando i risultati ottenuti dalle nanomatrici prodotte attraverso tecnica sol-gel è possibile dedurre:

- Le nanoparticelle presentano morfologia sferica e dimensione nell'intorno di 100-200 nm;
- La sintesi sol-gel basica consente di ottenere strutture altamente organizzate, caratterizzate da valori di area specifica superficiale e volume dei pori rispettivamente pari a $600 \text{ m}^2/\text{g}$ e $0,6 \text{ cm}^3/\text{g}$;
- L'aggiunta dello ione rame (2% mol), non ha influenzato le caratteristiche strutturali in termini di area superficiale e volume dei pori;
- Il rame viene incorporato efficacemente all'interno della matrice sintetizzata, entrando effettivamente all'interno del reticolo vetroso senza dare origine a formazioni cristalline indesiderate.

Dagli esiti delle analisi effettuate, dei campioni sintetizzati tramite tecnica spray-dryer, è stato possibile trarre le seguenti conclusioni:

- Le particelle presentano morfologia perfettamente sferica e dimensione dell'ordine 200 nm-5 μm (un ordine di grandezza superiore rispetto alla tecnica sol-gel);
- La sintesi spray-drying basica consente di ottenere strutture altamente organizzate caratterizzate da valori di area specifica superficiale e volume dei pori rispettivamente pari a $200 \text{ m}^2/\text{g}$ e $0,2 \text{ cm}^3/\text{g}$, questi dati sono minori rispetto alla tecnica sol-gel ma maggiori rispetto ai vetri bioattivi;

- Le particelle spray-dryer mostrano un reticolo poco connesso, dovuto alla rapida evaporazione del solvente e alle interazioni deboli fra tensioattivo e specie silicee. Perciò la presenza dello ione rame sembra avere un effetto disorganizzante sul reticolo portando a strutture con aree specifiche minori;
- Il rame viene incorporato efficacemente all'interno delle matrici sintetizzate senza generare fasi ossidiche indipendenti.

I campioni sintetizzati, attraverso le tecniche sol-gel e spray-drying contenenti il 2% di rame sono stati funzionalizzati zwitterionicamente e caratterizzati dal punto di vista morfologico attraverso il FESEM e il TEM, composizionale attraverso EDS e strutturale attraverso misure di adsorbimento e desorbimento di azoto. Infine, sono state effettuate le analisi FTIR e TGA per valutare l'effettiva funzionalizzazione.

Le seguenti conclusioni sono valide per entrambi i campioni sintetizzati:

- La dimensione e la morfologia rimangono invariate in seguito alla funzionalizzazione;
- La funzionalizzazione ha portato ad una modifica dell'isoterma di adsorbimento e desorbimento causando una diminuzione dell'area superficiale, del volume dei pori e della loro dimensione dovuta alla presenza dei gruppi organosilani presenti all'imboccatura dei pori;
- Le analisi FTIR e TGA hanno confermato l'effettiva riuscita della funzionalizzazione. In particolare, nell'analisi FTIR confrontando i risultati degli spettri tal quale e del suo funzionalizzato, si può osservare che, in quest'ultimo sono presenti le bande dello stretching del gruppo carbossilato COO^- e del bending delle ammine protonate NH_3^+ tipiche della funzionalizzazione zwitterionica. Invece dall'analisi TGA, confrontando lo spettro tal quale con il suo funzionalizzato, si può osservare una netta diminuzione di peso di quest'ultimo, causata dalla decomposizione dei composti organici.

A seguito della funzionalizzazione zwitterionica è stato effettuato il loading della rifampicina all'interno delle micro e nano matrici, aventi composizione $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, mediante la procedura dell'impregnation method. I campioni così ottenuti sono stati caratterizzati tramite analisi FESEM, per indagarne la morfologia e analisi TGA per quantificare la quantità di rifampicina incorporata.

Dalle analisi FESEM, di entrambi i campioni (sol-gel e spray-drying), si può affermare che il loading della rifampicina non ha influenzato la forma e la dimensione delle particelle, che rimangono per le sol-gel in ambiente basico di 100-200 nm e per la spray-drying 0.2-5 μm .

Analizzando i grafici dell'analisi TGA condotta, si può osservare una differenza tra gli spettri del campione sol-gel e di quello spray-dryer:

- Nel campione sol-gel, confrontando la curva del campione SG 2% Cu F (funzionalizzato) con quello SG 2% Cu F RIF (funzionalizzato con rifampicina), si ha in quest'ultima una netta perdita in peso, dovuta all'effettivo incapsulamento della rifampicina. Per calcolare la reale quantità di farmaco incapsulato nelle matrici, sono state condotte delle analisi elementari, in quanto, non è stato possibile attraverso l'analisi termogravimetrica, a causa della presenza di altre molecole organiche (APST e CES) dovute alla funzionalizzazione.

- Nel campione spray-drying invece, confrontando la curva del campione SD 2% Cu F (funzionalizzato) con quello SD 2% Cu F RIF (funzionalizzato con rifampicina), si ha in quest'ultima una perdita in peso minore, rispetto al caso sol-gel, causata da una minore quantità di rifampicina incapsulata. Per calcolare la reale quantità di farmaco incapsulato nelle matrici, sono state condotte delle analisi elementari, in quanto, non è stato possibile attraverso l'analisi termogravimetrica, a causa della presenza di altre molecole organiche (APST e CES) dovute alla funzionalizzazione.

Successivamente sono stati effettuati dei test di rilascio, al fine di valutare la capacità di tali matrici di rilasciare il farmaco, una volta poste a contatto con un fluido acquoso. Per questo processo è stato utilizzato come mezzo di rilascio il PBS. Per quanto riguarda la rifampicina, è possibile osservare un buon profilo di rilascio, in quanto nelle prime 20 h viene rilasciato quasi l'80% del farmaco incapsulato e continuando il rilascio nel tempo.

Per valutare l'antibattericità dei materiali, conferita dallo ione rame, sono stati condotti dei test antibatterici in modelli planctonici usando i batteri *Escherichia.coli* e *Stafilococco.aureus*.

Dall'analisi dei test effettuati, è possibile trarre le seguenti conclusioni:

Per i batteri *E. Coli* si può osservare che:

- Il campione sol-gel mostra un effetto antibatterico per tutte le concentrazioni testate, in particolare il rilascio di rame dalle matrici è immediato già a basse concentrazioni.
- Il campione spray-drying, al contrario ha un effetto antibatterico più rallentato, essendo presente solo per alte concentrazioni e il rilascio di rame dalle matrici è molto lento. Da questo emerge, la necessità di avere una maggiore quantità di rame presente nelle polveri, per poter ottenere un effetto antibatterico migliore.
- In entrambi i campioni funzionalizzati, si ha un ottimo effetto antibatterico già a basse concentrazioni, da questo si può affermare che la funzionalizzazione non inibisce l'effetto antibatterico desiderato.

Per i batteri *S.Aureus* si può osservare che:

- Il campione sol-gel mostra un effetto antibatterico solo per le alte concentrazioni mentre il rilascio del rame dalle matrici avviene già a basse concentrazioni.
- Il campione spray-drying, al contrario ha un effetto antibatterico più rallentato, infatti è presente solo per alte concentrazioni e il rilascio di rame dalle matrici è molto lento. Da questo emerge, la necessità di avere una maggiore quantità di rame presente nelle polveri, per poter ottenere un effetto antibatterico migliore.
- In entrambi i campioni funzionalizzati, si ha un effetto antibatterico già a basse concentrazioni, da questo si può affermare che la funzionalizzazione non inibisce l'effetto antibatterico desiderato.

4.2 Sviluppi futuri

Dai promettenti risultati ottenuti dalla caratterizzazione delle nanomatrici (sol-gel e spray-dried) contenenti ioni rame, emerge la necessità di effettuare ulteriori studi. Nello specifico:

- ✓ Stimare con maggiore precisione, la quantità di ioni effettivamente incorporata mediante ICP (Spettroscopia ad emissione atomica al plasma accoppiato induttivamente), sulle matrici disciolte mediante attacco acido;
- ✓ Effettuare dei test antibatterici in modelli planctonici e biofilm, sulle matrici cariche di rifampicina al fine di investigare nel dettaglio potenziali alternative per poter ridurre l'infezione batterica con lo scopo di favorire la rigenerazione ossea;
- ✓ Possibilità di incorporare le matrici sol-gel e spray-dried contenenti il 2% mol di rame, funzionalizzate e caricate con rifampicina all'interno di un hydrogel termosensibile al fine di valutare le cinetiche di rilascio e l'aspetto antibatterico fornito dal farmaco e dallo ione, per poterle confrontare con quelle ottenute in assenza di hydrogel.

Bibliografia

- [1] T. Winkler, F. A. Sass, G. N. Duda, and K. Schmidt-Bleek, "A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge," *Bone Jt. Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 232–243, 2018.
- [2] S. Kargozar, M. Montazerian, S. Hamzehlou, H. W. Kim, and F. Baino, "Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies," *Acta Biomater.*, vol. 81, pp. 1–19, 2018.
- [3] J. D. Caplin and A. J. García, "Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models," *Acta Biomater.*, vol. 93, pp. 2–11, 2019.
- [4] F. Biggi, G. Caterino, and C. Salvi, "Le complicanze infettive dell'osteosintesi-Infective complications of osteosynthesis," *LO SCALPELLO-OTODI Educ.*, vol. 23, no. 3, pp. 166–171, 2009.
- [5] Martinko Ben Madigan, *Brock. Biologia dei microrganismi. Microbiologia generale, ambientale e industriale. Ediz. mylab.* 2016.
- [6] K. Bazaka, M. V. Jacob, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, "Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 95, no. 2, pp. 299–311, 2012.
- [7] M. Crouzet *et al.*, "Exploring early steps in biofilm formation: Set-up of an experimental system for molecular studies," *BMC Microbiol.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–12, 2014.
- [8] "<https://www.studentidibiologia.it/microbiologia/meccanismi-e-fasi-della-formazione-del-biofilm/>." .
- [9] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 603–661, 2015.
- [10] "<https://www.msmanuals.com/it/casa/infezioni/infezioni-batteriche-batteri-gram-negativi/infezioni-da-escherichia-coli.>"
- [11] I. Izquierdo-Barba and M. Vallet-Regí, "Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses," *Biomed. Glas.*, vol. 1, no. 1, pp. 140–150, 2015.
- [12] Palmieri.M.C"., "Tesi di laurea magistrale, ' Sintesi e caratterizzazione di matrici bioattive ad effetto terapeutico,'" *Politec. di torino*, pp. 5–11, 2012.
- [13] C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, and H. Fan, "ChemInform Abstract: Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy," *ChemInform*, vol. 30, no. 28, p. no-no, 2010.
- [14] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, and M. Fröba, "Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 20, pp. 3216–3251, 2006.
- [15] W. Zhao D., Wan Y., Zhou, ""Ordered Mesoporous Materials,"" in 2012, .
- [16] M. Vallet-Regí, F. Balas, and D. Arcos, "Mesoporous materials for drug delivery," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 40, pp. 7548–7558, 2007.
- [17] S. Giret, M. Wong Chi Man, and C. Carcel, "Mesoporous-Silica-Functionalized Nanoparticles

for Drug Delivery,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 21, no. 40, pp. 13850–13865, 2015.

- [18] M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, M. T. Portolés, and M. Vallet-Regí, “Biocompatibility and levofloxacin delivery of mesoporous materials,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 84, no. 1, pp. 115–124, 2013.
- [19] L. L. Hench, “The story of Bioglass®,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, 2006.
- [20] S. Hu, J. Chang, M. Liu, and C. Ning, “Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 281–286, 2009.
- [21] J. R. Jones and L. L. Hench, “Biomedical materials for new millennium: Perspective on the future,” *Mater. Sci. Technol.*, vol. 17, no. 8, pp. 891–900, 2001.
- [22] “Vernè. E.” Slide Biomateriali politecnico di Torino, “I vetri ottici,” pp. 2–5.
- [23] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, and D. Zhao, “Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone-Forming Bioactivities,” *Angew. Chemie*, vol. 116, no. 44, pp. 6106–6110, 2004.
- [24] M. Vallet-Regí, A. J. Salinas, and D. Arcos, “From the bioactive glasses to the star gels,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 1011–1017, 2006.
- [25] “<http://www.copperalliance.it/istruzione-e-carriera/programmi-per-le-scuole/biologia>.”
- [26] C. Wu *et al.*, “Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 2, pp. 422–433, 2013.
- [27] A. Bari *et al.*, “Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 55, pp. 493–504, 2017.
- [28] “Chiara Vitale Bovarone”, ““Frontiers in Bioengineering enabling nanotechnologies.””
- [29] Myers; Peter, “The Sol–Gel Handbook: Synthesis, Characterization and Applications. 3-Volume Set,” *Chromatographia*, vol. 79, no. 11–12, pp. 787–788, 2016.
- [30] M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, and M. Vallet-Regí, “The Role of Zwitterionic Materials in the Fight against Proteins and Bacteria,” *Medicines*, vol. 5, no. 4, p. 125, 2018.
- [31] C. Pontremoli, I. Izquierdo-Barba, G. Montalbano, M. Vallet-Regí, C. Vitale-Brovarone, and S. Fiorilli, “Strontium-releasing mesoporous bioactive glasses with anti-adhesive zwitterionic surface as advanced biomaterials for bone tissue regeneration,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 563, pp. 92–103, 2020.
- [32] S. Kaya, M. Cresswell, and A. R. Boccaccini, “Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 83, no. November 2017, pp. 99–107, 2018.
- [33] R. García-Alvarez, I. Izquierdo-Barba, and M. Vallet-Regí, “3D scaffold with effective multidrug sequential release against bacteria biofilm,” *Acta Biomater.*, vol. 49, pp. 113–126, 2017.
- [34] C. Wu, J. Chang, and W. Fan, “Bioactive mesoporous calcium-silicate nanoparticles with excellent mineralization ability, osteostimulation, drug-delivery and antibacterial properties for filling apex roots of teeth,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 33, pp. 16801–16809, 2012.
- [35] D. Arcos and M. Vallet-regí, “Sol – gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 8, pp. 2874–2888, 2010.

- [36] Dispense, "Spray-drying," [Http://www.aptisol.it/competenze/spray-drying](http://www.aptisol.it/competenze/spray-drying).
- [37] L. Pontiroli, M. Dadkhah, G. Novajra, I. Tcacencu, S. Fiorilli, and C. Vitale-Brovarone, "An aerosol-spray-assisted approach to produce mesoporous bioactive glass microspheres under mild acidic aqueous conditions," *Mater. Lett.*, vol. 190, pp. 111–114, 2017.
- [38] I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, and M. Vallet-Regí, "Zwitterionic ceramics for biomedical applications," *Acta Biomater.*, vol. 40, pp. 201–211, 2016.
- [39] L. Ferigo, "Tesi magistrale," Studio delle caratteristiche e delle prestazioni delle membrane di diffusione di campionatori diffusivi per il monitoraggio di agenti inquinanti", *Univ. degli Stud. di Padova*.
- [40] A. Licciulli, "Densità,porosità, superficie specifica," *corso di Sci. e Tecnol. dei Mater. Ceram.*
- [41] P. di T. G.Ciofani, "Fabbricazione_Micro_Nano_Strutture."
- [42] R. U. Nijmegen, "Information on the FESEM."
- [43] "https://it.wikipedia.org/wiki/Spettroscopia_EDX."
- [44] "<http://microscopiaelettronica.dabanco.it/analisi-edx-nel-microscopio-sem>."
- [45] "https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/eds.html."
- [46] Dispense, "Microscopia elettrica a trasmissione."
- [47] "<http://www.inftub.com/biologia/MICROSCOPIO-ELETTRONICO-A-TRAS41192.php>."
- [48] "<https://www.sapio.it/settori-industriali/laboratori-di-analisi/laboratori/plasma-accoppiato-induttivamente-icp-e-spettrometria-di-massa-a-plasma-accoppiato-induttivamente-icp-ms>."
- [49] "<https://www.scienzenews.it/2009/04/23/spettrometro-di-emissione-al-plasma/>."
- [50] "<http://ctntes.arpa.piemonte.it/Raccolta%20Metodi%202003/html/frame/descrizionetecnicheemetodi.htm#6>."
- [51] Dispense, "Spettroscopia IR a trasformata di Fourier."
- [52] "Spettrofotometria infrarossa L' energia in gioco."
- [53] T. Spettroscopiche, "Spettrofotometria uv/vis."
- [54] Dispense, "Analisi termogravimetrica," 1392.
- [55] "<http://www.federica.unina.it/smf/termini/processi-termoconversione-solidi/analisi-termogravimetrica/>."
- [56] "https://it.wikipedia.org/wiki/Analisi_elementare."
- [57] "<https://www.plastanalisi.it/strumentazione/analizzatore-elementare-chns-o>."
- [58] N. Encinas, M. Angulo, C. Astorga, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, and M. Vallet-Regí, "Mixed-charge pseudo-zwitterionic mesoporous silica nanoparticles with low-fouling and reduced cell uptake properties," *Acta Biomater.*, vol. 84, pp. 317–327, 2019.