POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale



Sintesi e biodegradazione di silici mesoporose

Relatore

Prof.ssa Barbara Onida

Correlatori

Prof.ssa Silvia Maria Ronchetti

Dott.ssa Marta Gallo

Candidato

Elena Maretto

Dicembre 2020

Indice

Ac	ronimi		V
Soı	nmario)	1
Ca	pitolo	1: La silice mesoporosa	3
1.	Intro	duzione	3
2.	Drug	Delivery Systems	4
	2.1	Area superficiale	4
	2.2	Porosità	5
	2.3	Funzionalizzazione	5
	2.4	Bioattività	6
	2.5	Biocompatibilità	6
	2.6	Rilascio di farmaco	6
	2.7	Biodegradabilità	7
3.	Silice	e a mesoporosità ordinata	7
	3.1	Sintesi della silice mesostrutturata	8
	3.1.1	Sintesi delle particelle	11
	3.2	Rimozione dell'agente di template	12
Ca	pitolo	2: Degradazione della silice	15
1.	Intro	duzione	16
	1.1	Test di dissoluzione	17
	1.2	Valutazione della degradazione	18
	1.3	Dissoluzione di un solido	20
2.	Disso	oluzione della silice mesoporosa	21
3.	Fatto	ri che influenzano la degradazione	24

	3.2	Ambiente circostante	24
	3.2.1	Mezzo di dissoluzione	24
	3.2.2	Concentrazione	26
	3.2.3	Altri effetti dovuti all'ambiente	27
	3.3	Metodo di sintesi	30
	3.3.1	Parametri di sintesi	31
	3.3.2	Precursore	32
	3.3.3	Agente "templante"	33
	3.3.4	Condensazione della silice	34
	3.4	Caratteristiche delle particelle	37
	3.4.1	Aggregazione	37
	3.4.2	Porosità	39
	3.4.3	Dimensione	40
	3.4.4	Morfologia	42
4.	Prodot	tto di degradazione	44
	4.1	Benefici dell'acido silicico	45
Ca	pitolo 3	: Confronto tra silice MCM – 41 e SBA – 15	46
1.	Introd	uzione	46
2.	Sintes	i del materiale	48
	2.1 M	CM – 41	48
	2.2 SE	3A – 15	49
3.	Caratte	erizzazione	52
	Struttu	ıra mesoporosa	52
	Micro	porosità	53
	Bioatt	ività	54
4	Dissol	uzione	55

C	apitol	o 4: Influenza dell'incorporazione di specie inorganiche ed organiche	60
1	. Intr	oduzione	60
2	. Inco	orporazione di specie inorganiche	62
	2.1	Inclusione di metalli	62
	2.1.1	Calcio	62
	2.1.2	Manganese	63
	2.1.3	Zirconio	66
	2.2	Inclusione di specie per degradazione <i>pH – responsive</i>	67
	2.2.1	Idrossiapatite	67
	2.2.2	Calcio – Fosfato	69
3	. Fun	nzionalizzazione con specie organiche	71
	3.1	Meccanismi di funzionalizzazione	72
	3.1.1	Co – condensazione (o sintesi <i>one</i> – <i>pot</i>)	72
	3.1.2	Post – grafting (o sintesi stepwise)	73
	3.2	Funzionalizzazione con organosilani	75
	3.2.1	Silice SBA – 15 funzionalizzata con gruppi metile e tiolo	76
	3.2.2	Silice MCM – 41 funzionalizzata con gruppo fenile e cloro	78
	3.2.3	Funzionalizzazione con gruppi amminici	80
	3.3	Funzionalizzazione con PEG	86
	3.4	Funzionalizzazione con PEI	90
	3.4.1	Utilizzo del PEI per ritardare la degradazione	91
	3.4.2	Utilizzo del PEI per promuovere la degradazione	93
4	. Intr	oduzione di legami scindibili	95
	4.1	Ponte disolfuro	96
	4.2	Legame carbammato	98
	4 3	Molecola fotolabile	100

Ca	pito	lo 5: Influenza dell'incorporazione di farmaci	103
1.	Int	roduzione	103
2.	Fai	rmaco introdotto nei pori della OMS	105
3.	Fai	rmaco incorporato nella matrice di silice delle particelle	107
3	.1	Autodistruzione del carrier e simultaneo rilascio di farmaco	108
3	.2	Integrazione di due farmaci nella matrice	109
4.	Fai	rmaco utilizzato come agente di template	110
4	.1	Drug – Templating: Film	112
4	.2	Drug – Templating: Nanoparticelle	113
Co	nclu	sioni	115
Bib	oliog	rafia	117

Acronimi

ALF, fluido lisosomiale (Artificial Lysosomal Fluid)

APTES, Amminopropiltrietossisilano (Aminopropyltriethoxysilane)

AR, Aspect Ratio

BLM, bleomicina

BTDS, bistrietossisililpropildisolfuro

Cl – PTES, cloropropiltrimetossisilano (*Chloropropyltrimethoxysilane*)

CMS, silice mesoporosa colloidale (Colloidal Mesoporous Silica)

CTAB, bromuro di cetil-trimetilammonio (Cetyltrimethylammonium Bromide)

CTAC, cloruro di cetil-trimetilammonio (Cetyltrimethylammonium Chloride)

DDS, sistema di trasporto di farmaco (Drug Delivery System)

DMEM, soluzione di Dulbecco modificata (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DOX, doxorubicina

EDX, Energy Dispersive X-ray

FDA, Food and Drug Administration

GR, Glucosyl-Resveratrol

GRAS, Generally recognized as safe

GSH, glutatione

HMSN, nanoparticella cava di silice mesoporosa (Hollow Mesoporous Silica Nanoparticle)

ICP – AES, spettroscopia di emissione al plasma atomica (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*)

ICP – OES, spettroscopia di emissione al plasma ottica (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

ICPTES, 3-isocianatopropiltrietossisilano (Isocyanatopropyltriethoxysilane)

IEP, punto isoelettrico

MB, blu di metilene

MI – D, metal-ion doping

MPTS, mercaptopropiltrietossisilano (Mercaptopropyltriethoxysilane)

MSN – CDDS, sistemi di somministrazione controllata di farmaci (MSN – CDDSs, *Controlled Drug Delivery System*)

MSN – SDDS, sistemi di somministrazione sostenuta di farmaci (Sustained Drug Delivery System)

MSN, nanoparticella di silice mesoporosa (Mesoporous Silica Nanoparticle)

MTES o MTEOS, metiltrietossisilano (Methyltriethoxysilane)

OCT, octenidina dicloridrato

OMS, silice a mesoporosità ordinata (Ordered Mesoporous Silica)

OTMS, octiltrimetossisilano (Octyltrimethoxysilane)

PBS, tampone fosfato salino (Phosphate Buffer Solution)

PEG, polietilenglicole

PEI, polietileammina

PTES, feniltrietossisilano (Phenyltriethoxysilane)

RES, sistema reticoloendoteliale

SAXS, diffrazione a raggi X a basso angolo (Small Angle X-ray Scattering)

SBF, fluido biologico simulato (Simulated Body Fluid)

SC, Stearoyl Choline

SDA, agente direzionante (Structure Directing Agent)

SEM, microscopia elettronica a scansione (Scanning Electron Microscope)

SGF, fluido gastrico simulato (Simulated Gastric Fluid)

SIF, fluido intestinale simulato (Simulated Intestinal Fluid)

SL, Sophorolipid

SLF, fluido polmonare simulato (Simulated Lung Fluid)

SN, nanoparticella di silice (Silica Nanoparticle)

TBOS, tetrabutossisiliano (Tetrabutoxysilane)

TDD, somministrazione topica di farmaci (Topical Drug Delivery)

TEA, trietanolammina

TEM, microscopia elettronica a trasmissione (Transmission Electron Microscope)

TEOS, tetraetilortosilicato (*Tetraethoxysilane*)

TEP, fosfato di trietile

TGA, analisi termogravimetrica (Thermal Gravimetric Analysis)

TiPB, 1,3,5-triisopropilbenzene

TMB, 1,2,3-trimetilbenzene

TMOS, tetrametilortosilicato (Tetramethoxysilane)

TPOS, tetrapropilortosilicato (Tetrapropoxysilane)

VOC, composti volatili organici

XPS, spettroscopia fotoelettronica a raggi X (*X-ray photoelectron spectroscopy*)

XRD, spettro di diffrazione a raggi X (X-ray diffraction)

Sommario

I materiali nella forma di particelle sub-micrometriche e nanometriche vengono applicati come vettori per la somministrazione di farmaci e allo scopo di *imaging* diagnostico [1]. L'obiettivo principale è quello di migliorare la biodisponibilità del farmaco e limitarne gli effetti collaterali, consentendo una terapia più tollerata dai pazienti, riducendo la frequenza di dosaggio e la concentrazione del farmaco [2]. In particolare, le particelle inorganiche sono state ampiamente studiate grazie alle loro proprietà fisico – chimiche versatili, l'ampia disponibilità, le diverse funzionalità e la buona biocompatibilità [1]. Tra queste emergono le particelle di silice a mesoporosità ordinata (OMS, Ordered Mesoporous Silica). Le molecole dei farmaci o degli agenti terapeutici hanno dimensioni nella scala dei nanometri, di conseguenza possono essere facilmente introdotti all'interno dei pori di un materiale mesoporoso (pori di diametro tra 2 e 50 nm) [3]. Inoltre, quasi il 70% dei nuovi farmaci ha una bassa solubilità in acqua, e conseguentemente uno scarso assorbimento; confinare il farmaco all'interno dei mesopori assicura il mantenimento della forma amorfa, più solubile rispetto a quella cristallina [4]. Le proprietà più interessanti della OMS, che la rendono valida candidata allo scopo di drug delivery, sono: la disposizione ordinata dei pori, che permette di controllare in maniera appropriata il caricamento e la cinetica di rilascio del farmaco, e l'estesa area superficiale, in grado di ospitare una grande quantità di farmaco [5]. In aggiunta, la presenza di silanoli superficiali rende il materiale ulteriormente funzionalizzabile, in questo modo è possibile progettare un sistema multifunzionale [1].

La prima considerazione che dovrebbe essere fatta quando un materiale viene proposto per l'ambito biomedico è come interagisce con l'ambiente fisiologico [3]. Infatti, le interazioni tra le nanoparticelle e le cellule e i tessuti del corpo umano determinano la loro applicabilità medica. Rispetto alle molecole o ai farmaci solubili, l'uso di *carrier* di farmaci aggiunge un ulteriore livello di complessità poiché le particelle possono dissolversi, aggregarsi e interagire con biomolecole, cellule e tessuti in base alla loro composizione chimica, alla dimensione, alla forma e alle proprietà fisiche. La velocità e il meccanismo di degradazione sono parametri importanti per determinare il tempo di circolazione nel corpo e la modalità di eliminazione dei *carrier*; inoltre, è necessario studiarne i prodotti di degradazione che potrebbero essere dannosi, per esempio, a causa della loro morfologia irregolare se si tratta di detriti, o della loro tossicità

se sono specie solubili. Il *carrier* deve rimanere intatto finché non raggiunge il target e poi degradare al momento giusto e nel posto giusto [2].

Lo scopo di questo lavoro di tesi è di fornire un'analisi dello stato dell'arte riguardante la degradazione della silice mesoporosa in ambiente fisiologico.

Il primo capitolo è un riepilogo di che cosa si intende per *Drug Delivery System* e del perché la silice mesoporosa può essere ritenuta un valido candidato per questo scopo, con particolare enfasi sui processi di sintesi delle particelle di silice mesoporosa. Il secondo capitolo, invece, verte sulla dissoluzione della silice, come viene misurata e quali sono i fattori che ne influenzano la degradazione in ambiente fisiologico.

Nel terzo capitolo sono trattati nel dettaglio i due tipi di silice mesoporosa più studiati in ambito biomedico, e in particolare per il trasporto di farmaci: l'MCM – 41 e l'SBA – 15.

Infine, il quarto e il quinto capitolo indagano l'influenza sulla degradazione dell'incorporazione di specie organiche, inorganiche e di farmaco nella silice mesoporosa. Si vedrà come sia possibile controllare le degradabilità della OMS, rendendola più o meno stabile rispetto alla silice pura, in modo da adattare il materiale alle funzioni che deve svolgere.

Capitolo 1: La silice mesoporosa

1. Introduzione

I materiali porosi hanno attirato l'interesse in ambito scientifico grazie alla capacità di interagire con atomi, ioni e molecole non solo sulla superficie esterna ma anche sulla superficie interna del materiale. La distribuzione di dimensioni, forme e volumi degli spazi vuoti nei materiali porosi è direttamente correlata alla loro capacità di svolgere la funzione desiderata [6]. I pori sono classificati in base alla dimensione, secondo la classificazione IUPAC [7] si distinguono i micropori, di dimensione inferiore a 2 nm, i macropori, maggiori di 50 nm, e i mesopori, di dimensioni intermedie (2 – 50 nm). I materiali mesoporosi, realizzati mediante autoassemblaggi di tensioattivi che modellano il componente inorganico [8], sono stati sintetizzati per la prima volta negli anni '90, partendo proprio dalla silice, e hanno ricevuto attenzione crescente grazie alla struttura altamente ordinata e all'area superficiale elevata; inoltre, la struttura mesoporosa stabile e le proprietà superficiali ben definite rendono i materiali mesoporosi ideali per l'incapsulamento di farmaci, proteine e altre molecole biogeniche [9].

I materiali a base di silice mesoporosa ordinata (OMS, *Ordered Mesoporous Silica*) sono stati ampiamente studiati negli ultimi anni in virtù delle proprietà vantaggiose che li rendono adatti a diversi scopi in ambito biomedicale: ad esempio, biovetri mesoporosi sono particolarmente interessanti per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto osseo, grazie alla bioattività della loro superficie e alla possibilità di incorporare agenti che promuovono l'osteogenesi [5],[6],[12]. Le silici mesoporose possono incorporare anche fluorofori, coloranti e agenti di contrasto per effettuare *imaging* diagnostico, ma il campo di studio più approfondito riguardo alle applicazioni di questo tipo di silici è il loro utilizzo come sistemi per il rilascio di farmaci (*Drug Delivery System*, DDS), proposto per la prima volta nel 2001 per il rilascio di ibuprofene [13]. I *carrier*¹ (supporti) per il trasporto di farmaco realizzati in silice mesoporosa possono essere usati per terapie antitumorali, per finalità antinfiammatorie, per regolare il rilascio del

¹ Il *carrier* è un supporto su cui vengono incapsulati i farmaci grazie al quale si può migliorare la biodisponibilità, fornendo protezione alle molecole; inoltre, si può adattare il profilo di rilascio del farmaco in base alle esigenze mediche scegliendo il materiale appropriato. Il *drug delivery* basato sull'utilizzo di *carrier* è suddiviso in quattro passaggi: caricamento del farmaco sul supporto, trasporto del costrutto fino al sito di interesse, assorbimento cellulare e rilascio del farmaco [160]. Il processo di caricamento del farmaco o dell'agente terapeutico è definito anche con il termine *loading* e nel testo vengono usati come sinonimi.

farmaco in base alle condizioni circostanti e per aumentare la solubilità di farmaci scarsamente solubili così da migliorarne l'efficacia [14].

2. Drug Delivery Systems

I sistemi per rilascio di farmaci o DDS sono sistemi in grado di rilasciare un agente terapeutico, trasportato in una zona specifica e con una velocità definita; lo scopo è di facilitare il dosaggio e aumentare la durata dell'effetto terapeutico, causando il minimo danno al paziente e riducendo la frequenza della somministrazione [9]. I carrier devono soddisfare alcuni requisisti per essere considerati validi sistemi di drug delivery, per esempio devono essere in grado di incapsulare la massima quantità di agente terapeutico, raggiungere il sito di interesse e rilasciare il contenuto solo dove necessario, senza perdere il carico prematuramente; inoltre, devono proteggere le molecole trasportate dall'ambiente circostante, perché potrebbero essere degradate da enzimi o condizioni non favorevoli, soprattutto se delicate come proteine o RNA [15].

Ciò che rende la silice mesoporosa così promettente sono le proprietà che possiede:

- Ampia area superficiale
- Volume poroso esteso
- Struttura porosa regolabile, con diametro e morfologia dei pori variabile
- Facilità di funzionalizzazione superficiale
- Bioattività della superficie
- Biocompatibilità
- Capacità di incorporare agenti terapeutici in grandi quantità

2.1 Area superficiale

L'area superficiale della silice mesoporosa è formata dalla somma di superficie esterna e della superficie porosa, ed è proprio quest'ultima che contribuisce maggiormente agli alti valori che si rilevano dalle misurazioni; l'area superficiale, insieme al volume poroso, determina la quantità di farmaco che può essere incorporata nel *carrier*. Il vantaggio di poter inserire grandi quantità di molecole all'interno del materiale permette, per esempio, di trasportare farmaci diversi nella stessa zona allo stesso tempo per una terapia combinata, oppure di integrare un

agente di contrasto ed effettuare azioni di teranostica (terapia e diagnostica contemporaneamente) [16].

2.2 Porosità

Le caratteristiche strutturali come il diametro dei pori e la morfologia determinano le molecole che possono entrare e ne governano il rilascio, controllando i processi di diffusione verso l'ambiente fisiologico. I pori nella dimensione della mesoscala sono adeguati per la maggior parte delle biomolecole [17], ma i pori più piccoli servono per trasportare molecole più piccole o per rallentarne il rilascio, mentre pori più grandi sono necessari per molecole di dimensioni maggiori², per aumentare l'efficacia di caricamento o per velocizzare il rilascio [18].

2.3 Funzionalizzazione

La funzionalizzazione superficiale esterna dei *carrier* che devono essere introdotti all'interno del corpo è interessante per diverse ragioni. Per prima cosa perché vanno "nascosti" dal sistema immunitario che altrimenti li intercetta per espellerli (*carrier* inorganici si accumulerebbero nel sistema reticoloendoteliale (RES) portando tossicità a lungo termine [19]). Il secondo motivo è la possibilità di realizzare targeting attivo; infatti, è possibile munire il *carrier* di ligandi, anticorpi o sequenze peptidiche che lo guidino verso l'obiettivo. La terza ragione è strettamente correlata alla seconda, e cioè che va impedito l'adsorbimento di proteine non specifiche; dopo somministrazione intravenosa, infatti, il *carrier* verrebbe ricoperto velocemente da una corona di proteine che ne modificherebbero dimensione, forma, carica superficiale e interazione con l'ambiente fisiologico, influenzandone il comportamento [20].

La funzionalizzazione superficiale interna, invece, è utile per migliorare le interazioni con le molecole da trasportare e stabilizzare l'internalizzazione; in questo modo, per esempio, possono essere inseriti sia farmaci idrofilici sia farmaci idrofobici [21].

_

² Per un caricamento efficiente del farmaco, il rapporto tra il diametro dei pori e la dimensione molecolare del farmaco deve essere maggiore di 1 [93]

2.4 Bioattività

La silice esposta ai fluidi biologici simulati, in particolare è stato dimostrato nel *Simulated Body Fluid* (SBF), forma uno strato simile all'apatite e per questo si può affermare che abbia un comportamento bioattivo, grazie alla composizione chimica simile a quella dei vetri bioattivi [15]. La bioattività esibita dalla superficie del materiale fa sì che possa essere utilizzato come *scaffold* per la rigenerazione di tessuti duri, cioè ossa e denti, stimolando osteogenesi, angiogenesi e proprietà antibatteriche, soprattutto quando nella matrice inorganica di silice sono incorporati altri ioni, come per esempio lo zinco, il magnesio e l'argento [22].

2.5 Biocompatibilità

Ovviamente la biocompatibilità è un requisito fondamentale per qualsiasi dispositivo che va inserito all'interno del corpo. La silice è stata catalogata come GRAS, cioè "Generally Recognized As Safe", dall'ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione di prodotti alimentari e farmaceutici, Food and Drug Administration (FDA), e quasi tutti gli studi e le ricerche condotti nell'ambito sono concordi sulla biocompatibilità della silice mesoporosa [11], [13–17]. Tuttavia, bisogna considerare il fatto che quando un materiale è realizzato in dimensioni nanometriche alcune proprietà potrebbero cambiare e la biocompatibilità della silice mesoporosa alla nanoscala deve essere ancora valutata [25]. I problemi di biocompatibilità da analizzare sono per lo più dovuti a come i materiali alla nanoscala interagiscono con i processi biologici; per quanto riguarda la silice mesoporosa può dipendere dalla forma e dalla dimensione delle nanoparticelle, dalla dose e dal tipo di cellule [23].

2.6 Rilascio di farmaco

Il profilo di rilascio del farmaco dipende dalla diffusione delle molecole dai pori verso l'ambiente esterno e, per quanto riguarda il materiale, il fattore che principalmente la modula è l'interazione con la matrice di silice [14]. Un vantaggio dell'utilizzo di *carrier* in silice mesoporosa è la possibilità di controllare il rilascio tramite degli stimoli, interni (pH, temperatura, ambienti riducenti) o esterni (ultrasuoni, campi magnetici, luce) [16][28], che causano la frantumazione del materiale o l'apertura dei pori. Il rilascio controllato migliora l'efficacia del farmaco e riduce gli effetti collaterali negli altri tessuti.

2.7 Biodegradabilità

Un aspetto molto importante di un DDS è la biodegradabilità, parametro chiave affinché sia approvato dal FDA [29]; il *carrier* deve essere robusto abbastanza per proteggere le molecole ospiti durante il trasporto fino all'obiettivo, ma dopo aver completato il rilascio deve degradare in prodotti innocui ed eliminabili che non provochino accumuli e tossicità [30]. Controllare la cinetica di degradazione è utile perché, per esempio, una degradazione lenta aiuta un rilascio graduale, mentre una degradazione veloce è preferita nel caso di farmaci con emivita breve [31].

Ci sono pareri contrastanti sulla degradabilità della silice. La natura inerte del framework puramente inorganico rende la struttura stabile e i legami silossano (Si – O) della matrice hanno un'energia di legame alta [16], di conseguenza il materiale è meno soggetto alla degradazione e meno sensibile a stress meccanici rispetto ad altri DDS organici [32]; è stato dimostrato che in aria resiste a temperature maggiori di 800°C [33]. La situazione cambia quando la silice viene esposta ad ambienti acquosi, e soprattutto nei mezzi biologici, perché il legame silossano viene scisso dall'idrolisi [34].

Il processo di degradazione alla mesoscala consiste nel riarrangiamento strutturale dei mesopori, mentre in scala atomica nella lisciviazione³ dell'acido ortosilicico (H₄SiO₄) dalla matrice all'ambiente [16]. La reazione di idrolisi in ambiente acquoso può avvenire in maniera casuale, provocando una degradazione incontrollata, indesiderata nelle applicazioni *in vivo* perché c'è il rischio che il *drug delivery* non sia portato a termine o che si creino accumuli [35].

3. Silice a mesoporosità ordinata

La silice a mesoporosità ordinata (OMS, *Ordered Mesoporous Silica*) può essere utilizzata per svolgere diverse funzioni, in ambito biomedico ma non solo, per esempio sono state proposte applicazioni come setacci molecolari, catalizzatori, supporti per altri tipi di nanoparticelle [36][37].

La forma della silice mesoporosa forse più studiata per DDS è quella delle nanoparticelle, Mesoporous Silica Nanoparticles (MSN), Si tratta di particelle dalla dimensione nanometrica,

³ Con il termine lisciviazione si intende la separazione di uno o più componenti da una massa solida mediante un solvente; come solvente si possono impiegare acqua, liquidi organici, soluzioni alcaline, acide, saline o altro.

da pochi nanometri a qualche centinaio, principalmente sferiche, ma che possono esistere anche in forma ellittica o di bastoncino [14][38][39][40]. Dimensione e morfologia ne determinano la biodistribuzione all'interno del corpo a seguito della somministrazione, così come la tossicità e la degradazione.

Le MSN utilizzate come DDS possono essere classificate in due gruppi:

- i) Sistemi di somministrazione sostenuta di farmaci (MSN SDDSs, Sustained Drug Delivery Systems);
- ii) Sistemi di somministrazione controllata di farmaci in risposta a stimoli (MSN CDDSs, *stimuli responsive Controlled Drug Delivery Systems*).

Le prime consistono nel processo di diffusione del farmaco incorporato dai canali mesoporosi verso il mezzo, diffusione guidata dal gradiente di concentrazione e rilascio immediato a seguito del contatto con il mezzo, senza controllo spazio-temporale; le seconde comprendono l'uso di stimoli, interni o esterni, che inducano una risposta fisica o chimica e il conseguente rilascio. Queste ultime sono progettate tramite l'utilizzo di funzionalizzazioni superficiali o l'incorporazione di altri tipi di molecole [1].

Considerando i diversi possibili ambiti applicativi, risulta evidente che la silice a mesoporosità controllata nella forma di particelle micrometriche e sub-micrometriche presenta molti vantaggi rispetto alla comune silice amorfa già utilizzata come eccipiente farmaceutico in molte formulazioni e permette di superare i rischi legati alla produzione e utilizzo di nanoparticelle [41][42][43].

3.1 Sintesi della silice mesostrutturata

Si possono realizzare materiali di dimensioni, morfologie e mesostrutture diverse cambiando i parametri e le condizioni di sintesi (temperatura, concentrazione dei reagenti, pH, tempi) [38].

La procedura più comune è un processo bottom-up, basato sulla chimica sol – gel, che implica l'idrolisi e la condensazione di organosilani in condizioni acquose; in Figura 1 sono rappresentate le reazioni che conducono alla sintesi della silice.

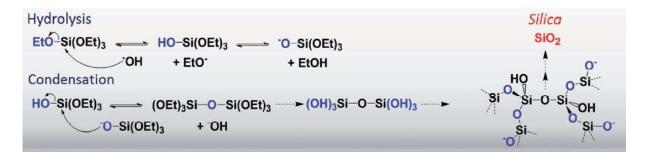


Figura 1: processo di idrolisi e condensazione dell'alcossisilano per la sintesi della silice [44]

La struttura mesoporosa è ottenuta mediante utilizzo di un "agente direzionante" (SDA, structure directing agent), o "template" cioè un tensioattivo4 o un copolimero a blocchi anfifilico, che dissolto in soluzione acquosa comincia ad auto-assemblarsi; esistono due meccanismi: Liquid-Crystal Templating e Cooperative Self-Assembly, nel primo caso il tensioattivo è presente a concentrazioni maggiori di quella per la formazione di micelle, nel secondo si utilizzano concentrazioni di tensioattivo basse e il precursore di silice promuove l'autoassemblaggio e la formazione delle micelle [1]. Le micelle direzionano la crescita della mesostruttura, perché la condensazione della silice avviene sulla loro superficie; determinano la dimensione dei pori, in virtù della lunghezza delle code idrofobiche del tensioattivo e, in base all'impacchettamento che creano tra loro, l'ordine della mesostruttura. A temperature maggiori le micelle sono più grandi e si dispongono più ordinatamente [45], ma anche la concentrazione ha influenza sull'ordine che si crea; si possono utilizzare agenti che espandono le micelle entrando nel core idrofobico, come il 1,2,3-trimetilbenzene (TMB) o il 1,3,5triisopropilbenzene (TiPB) [46]. A seconda del tensioattivo utilizzato e delle condizioni di sintesi, quindi, si possono creare mesostrutture più o meno ordinate, con disposizione radiale o parallela dei canali, con simmetrie, con pori separati o con interconnessioni.

Il processo di assemblaggio tra silice e micelle segue due vie diverse in base alla carica, se l'SDA è ionico (positivo S^+ o negativo S^-) avviene per interazioni elettrostatiche con la specie di silice dissolta (I^+ o I^-), o mediante un controione X, mentre se l'SDA è neutro l'interazione avviene tramite legami ad idrogeno; nel primo caso sono necessarie condizioni di pH estreme

molecole si dispongono rispetto alla superficie del liquido con la testa idrofilica verso l'acqua e la coda idrofobica verso la superficie esterna; quando quest'ultima è completamente occupata, le molecole di tensioattivo si associano fra di loro formando aggregati di dimensioni colloidali dette micelle.

⁴ Le molecole dei tensioattivi sono composte da una testa idrofilica e una coda idrofobica. Sciolte in acqua le molecole si dispongono rispetto alla superficie del liquido con la testa idrofilica verso l'acqua e la coda idrofobica.

(pH < 1 o pH > 9) [47]. In Figura 2 sono schematizzate le diverse interazioni che possono esserci tra SDA e silice.

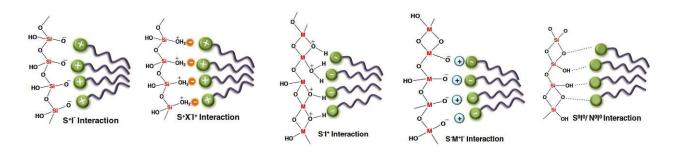


Figura 2: interazioni possibili tra silice e template [48]

Infatti, la silice ha punto isoelettrico (IEP) di circa 2, al di sotto del quale la carica è positiva (SiOH₂⁺), al di sopra negativa (SiO˙); per pH < 2 la velocità di condensazione della silice aumenta con il diminuire del pH, mentre per pH superiori raggiunge un picco intorno a pH = 8 e poi decresce, perché le specie di silice cominciano ad essere instabili e dissolversi. Le reazioni di sintesi con SDA cationico si eseguono a pH > 10 perché le interazioni stabilizzano il complesso micelle – silice e inibiscono la dissoluzione della silice [38]. In Figura 3 è rappresentata la velocità di condensazione della silice in funzione del pH.

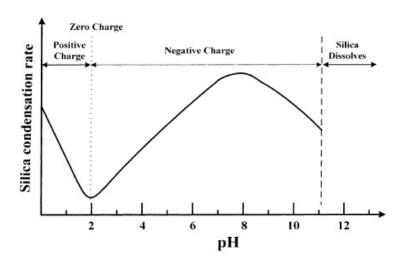


Figura 3: velocità di condensazione della silice in funzione del pH [49]

3.1.1 Sintesi delle particelle

Per la sintesi delle MSN, il metodo più utilizzato è quello di Stöber modificato [14]. Il metodo di Stöber è stato uno dei primi ad essere utilizzato per sintetizzare particelle sub-micrometriche sferiche di silice amorfa monodisperse e con distribuzione dimensionale uniforme, ma prive di porosità. Questo metodo consiste in una reazione sol – gel realizzata in condizioni basiche che utilizza l'ammoniaca come catalizzatore; il precursore di silice viene prima idrolizzato in una soluzione di acqua e alcol, poi condensa formando particelle sferiche. La modifica del metodo permette di ottenere particelle porose: si aggiunge un tensioattivo cationico, generalmente bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB), poiché si lavora in condizioni basiche in cui la silice dissolta ha carica negativa, che forma micelle sulla cui superficie condensa la silice; usando sistemi diversi di template si producono MSN di diversa mesostruttura e dimensione dei pori [38]. In Figura 4 è mostrato il meccanismo di crescita delle particelle.

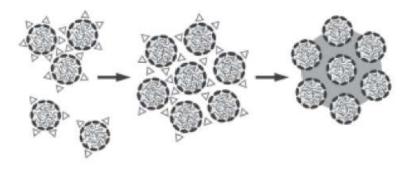


Figura 4: meccanismo di crescita di una particella [50]

Tra le diverse strutture che si possono ottenere, oltre alle MSN tradizionali sferiche, sono da citare le particelle cave, denominate *Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles* (HMSN), e quelle *Core – Shell*.

Le HMSN sono costituite da un guscio di silice mesoporosa, l'interno cavo può contenere il farmaco, in quantità maggiori rispetto alle MSN tradizionali [38], un agente di contrasto come una particella magnetica [51], oppure può trasportare due farmaci contemporaneamente (*codelivery*) [52]. Nei metodi di fabbricazione convenzionali si utilizza un metodo "a due template" in cui si utilizza un *soft template* per realizzare la mesoporosità del guscio e un *hard template*

per ottenere la cavità interna; in alternativa, si può applicare una strategia di *etching* selettivo [25]. Un esempio di sintesi è illustrato in Figura 5.

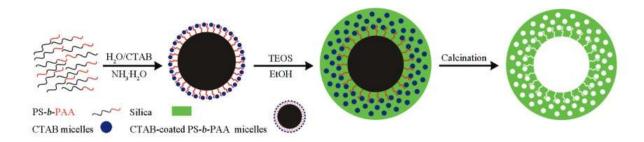


Figura 5: esempio di formazione di HMSN. Il copolimero è utilizzato come hard template per formare la cavità, mentre il tensioattivo CTAB realizza la mesostruttura del guscio [53]

Un esempio di preparazione di particelle *Core – Shell* consiste in una reazione di stratificazione bifase (precursore di silice in solvente organico idrofobico e soluzione acquosa di tensioattivo), in cui la reazione di condensazione avviene all'interfaccia e porta alla creazione di strutture gerarchiche caratterizzate da mesoporosità differenti [54]. Uno schema è proposto in Figura 6.

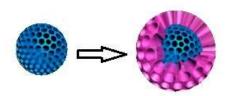


Figura 6: struttura mesoporosa Core - Shell, realizzata per stratificazione, in cui il core e la shell sono caratterizzati da mesoporosità differenti [54]

3.2 Rimozione dell'agente di template

La sintesi così condotta produce materiali in silice mesostrutturata, ma per renderla mesoporosa è necessario eliminare il tensioattivo liberando i pori. I metodi tradizionali sono la calcinazione e l'estrazione tramite solvente [55]. Nel primo caso il materiale viene scaldato a temperature molto alte, tipicamente 450 – 550°C, in modo che solo la componente organica (il tensioattivo) venga allontanata; il secondo metodo prevede l'immersione e il reflusso del materiale nel

solvente, causando il trasferimento del tensioattivo dai mesopori al solvente (solitamente viene usata una soluzione di acido cloridrico ed etanolo). Altri due metodi meno tradizionali sono la dialisi, eseguita con una soluzione acquosa di acido acetico ed etanolo, e la calcinazione a fase liquida, che utilizza solventi ad alto punto di ebollizione per l'estrazione [50].

Per quanto riguarda la silice mesoporosa sottoforma di particelle, la rimozione è un passaggio cruciale: quando le particelle sono formate e disperse nella soluzione acquosa basica, la carica della silice è negativa (pH > IEP) e i numerosi gruppi silanoli SiOH in superficie le mantengono separate, ma c'è il rischio che durante i processi di calcinazione o estrazione i silanoli condensino tra particelle vicine e che queste quindi si aggreghino in maniera a volte irreversibile (può capitare che cercando di separare aggregati di particelle queste si rompano) [50].

In Figura 7 è mostrato un esempio di formazione di nanoparticella mesoporosa: partendo dall'assemblaggio delle micelle fino alla rimozione del tensioattivo.

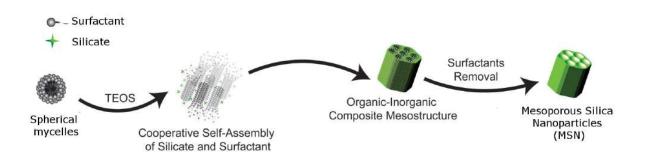


Figura 7: processo di formazione delle nanoparticelle di silice mesoporosa [56]

Variando le condizioni di sintesi e il tipo di tensioattivo (e in base a come si assemblano le micelle) si possono ottenere materiali con diverse strutture mesoporose, che differiscono tra loro per caratteristiche strutturali [14]. In Tabella 1 è riportato un elenco dei tipi di materiali di silice e la loro struttura. Il nome deriva dai gruppi di ricerca che hanno condotto la prima sintesi.

Tabella 1: tipi di silice mesoporosa e struttura [14][9]

Denominazione	Struttura		
	MCM – 41	Esagonale 2D	P6mm
Mobile Crystalline Materials	MCM – 48	Cubica 3D	Ia3d
	MCM – 50	Lamellare	p2
	SBA - 1	Cubica 3D	Pm3n
	SBA – 3	Esagonale 2D	P6mm
Canta Danhaya Amounhous	SBA – 11	Cubica 3D	Pm3m
Santa Barbara Amorphous	SBA – 12	Esagonale 3D	P6 ₃ /mmc
	SBA – 15	Esagonale 2D	P6mm
	SBA – 16	Cubica	Im3m
Korea Advanced Institute of Science and Technology	KIT – 5	Cubica	Fm3m
Centre for Research Chemistry and Catalysis	COK – 12	Esagonale	P6m
Michigan State University	MSU	Esagonale 2D	P6mm
Hexagonal Mesoporous Silica	HMS	Esagonale	P6mm

In questo lavoro di tesi ci si soffermerà in particolare su MCM – 41 e SBA – 15, che verranno analizzate più nel dettaglio nel Capitolo 3, perché sono quelle più studiate per il trasporto di farmaci.

Capitolo 2: Degradazione della silice

Un aspetto da non tralasciare è quale sia il destino della silice dopo che ha svolto il proprio ruolo all'interno del corpo; le vie di somministrazioni possibili sono diverse, ma le più comuni per le particelle di OMS sono: intravenosa, intramuscolare, intratumorale, sub-cutanea, topica e orale [57], anche se per queste ultime due non è necessario che il materiale si trovi in forma di particelle nanometriche o sub-micrometriche.

Come precedentemente affermato, il materiale utilizzato come supporto deve essere stabile per proteggere l'agente terapeutico fino al raggiungimento del target, ma poi deve essere degradato efficacemente per evitare tossicità e accumuli, in modo che non sia necessario rimuovere chirurgicamente ciò che non riesce ad essere eliminato, per esempio a seguito di somministrazione intravenosa, intramuscolare e sub-cutanea. Ma non in tutti i casi è necessario che il *carrier* degradi, per esempio, nel caso di applicazione topica la silice non entra nell'organismo ma agisce da "riserva di superficie", in questo caso si parla di *Topical Drug Delivery* (TDD) [58].

La degradabilità dei diversi dispositivi progettati per la somministrazione di farmaci (*drug delivery*) è un parametro fondamentale per la loro corretta traslazione verso lo scenario clinico [40] (ed è un parametro chiave per l'accettazione da parte delle autorità di regolamentazione [29]), perché è correlata con la tossicità che il materiale può provocare. Da un punto di vista tossicologico, è stato proposto che se le particelle rilasciano ioni velocemente, l'effetto tossico a breve termine è dovuto agli ioni rilasciati, mentre se la dissoluzione è lenta, gli effetti avversi sono causati dalle particelle stesse [59].

La degradabilità dei *carrier* in silice mesoporosa conferisce una compatibilità biologica migliore rispetto ad altri tipi di *carrier* inorganici [54]. È quindi necessario comprendere i meccanismi con cui materiali di silice mesoporosa degradano all'interno del corpo e valutare se i prodotti di degradazione siano nocivi o possano essere sfruttati a loro volta. In questo capitolo verranno trattati i fattori principali che influenzano il comportamento alla degradazione della silice, mentre nei capitoli successivi verranno proposte strategie per controllarla.

1. Introduzione

La silice mesoporosa è considerata biodegradabile, anche se nella terminologia IUPAC la degradazione idrolitica, cioè quella dove la scissione dei legami è causata dall'acqua, non rientra nella definizione di "biodegradazione" secondo cui la degradazione è causata da un processo enzimatico risultante dall'azione di cellule [60], e per questo motivo si dovrebbe parlare di "degradazione bio-correlata" [26].

La biodegradazione del materiale oppure la capacità di resistere ad essa, definita anche biodurabilità [61], viene studiata attraverso la dissoluzione in condizioni che simulino l'ambiente fisiologico; la determinazione del tasso di dissoluzione serve per valutare come il materiale interagisce con l'ambiente circostante.

La comprensione dei meccanismi di degradazione della silice mesoporosa è necessaria sia per la valutazione del rischio associato ad accumuli sia per il controllo delle proprietà di rilascio del farmaco. I risultati che sono disponibili in letteratura, ottenuti principalmente da studi condotti *in vitro*, sono conflittuali e spesso difficili da comparare. Differenti metodi di sintesi producono strutture diverse, che influiscono sulla velocità di dissoluzione e sul meccanismo di degradazione. Inoltre, spesso cambiano le modalità con cui i test vengono effettuati, sia per quanto riguarda il mezzo in cui la stabilità del materiale viene analizzata sia per le condizioni dello stesso (temperatura, pH, flusso continuo o statico, agitazione, concentrazione, presenza di ioni in soluzione).

È necessario evidenziare il fatto che il processo di degradazione della silice mesoporosa, e in particolare della OMS, può avvenire in due modi [62]:

- Dissoluzione progressiva della matrice di silice amorfa,
- Frammentazione in detriti di dimensioni ridotte ma incontrollate, grazie alla presenza di legami scindibili.

Nel caso di particelle esclusivamente in silice la degradazione si svolge per dissoluzione della matrice, ma il problema della degradazione del *carrier* è stato affrontato in maniera così ampia che sono stati proposti diversi approcci per cercare di controllarla. Per esempio, sono state suggerite composizioni che coinvolgono la presenza di specie organiche e inorganiche: strategie di *metal-ion doping* (MI-D) prevedono l'integrazione di ioni metallici, formulazioni di materiali ibridi che contengono specie organiche, oppure aggiunta di legami scindibili che rispondono a determinati stimoli [16].

1.1 Test di dissoluzione

La dissoluzione di un materiale dipende da proprietà intrinseche, come dimensione, composizione, forma e modifiche superficiali, e da proprietà estrinseche del solvente: pH, forza ionica, temperatura e concentrazione [63]. Il materiale può trovarsi sotto forma di polvere, particelle, film o fibre; nella maggior parte delle sperimentazioni si tratta di particelle, ma a volte è preferibile avere un'interfaccia di esposizione piana in cui l'evoluzione strutturale sia più evidente, di conseguenza si utilizzano film [56].

Le condizioni in cui vengono effettuati i test sono determinanti. In sistemi statici il materiale viene immerso direttamente nel mezzo di dissoluzione oppure isolato tramite un filtro o una membrana da dialisi; il volume limitato del mezzo può causare il raggiungimento del limite di saturazione e inibire il processo, portando a conclusioni non esatte [61]. Nei sistemi dinamici è presente una camera che contiene il materiale, separato da un filtro, e attraverso di essa passa il flusso del mezzo; non ci sono rischi di saturazione, ma è necessaria una quantità di fluido maggiore [61]. Un limite nell'utilizzo del filtro, in entrambi i sistemi, è la dimensione dei pori, che potrebbero essere troppo grandi e lasciar passare il materiale, se per esempio sottoforma di nanoparticelle, oltre alle specie dissolte. Altri fattori da tenere in considerazione nei sistemi statici sono l'agitazione o meno della sospensione, perché c'è il rischio che l'agitazione porti alla sovrastima della degradabilità [64], e il ricambio del mezzo con mezzo fresco, che impedisce la saturazione della soluzione.

Mezzo di dissoluzione

Il solvente influisce in modo considerevole sul risultato della dissoluzione: i mezzi differiscono tra loro per la composizione, il pH e la forza ionica. Generalmente si effettuano test *in vitro* in condizioni acellulari in mezzi che mimano i fluidi biologici e l'ambiente fisiologico. I più utilizzati, in aggiunta ovviamente all'acqua e all'acqua deionizzata (DI), sono il tampone fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffer Solution*) e il fluido biologico simulato (SBF, *Simulated Body Fluid*), ma vengono impiegati anche altri fluidi simulati: fluido gastrico (SGF, *Simulated Gastric Fluid*), fluido intestinale (SIF, *Simulated Intestinal Fluid*), fluido polmonare (SLF, *Simulated Lung Fluid*) e fluido lisosomiale (ALF, *Artificial Lysosomal Fluid*). Inoltre, a volte è utile testare il materiale in mezzi di coltura e in presenza di cellule, in questo caso si usano la soluzione di Dulbecco o la soluzione modificata (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) [65].

Temperatura

Le temperature utilizzate nei test *in vitro* sono principalmente tre: 25°C per valutare la stabilità a temperatura ambiente [66], 32°C per simulare l'applicazione topica e la temperatura fisiologica di 37°C, quella a cui il materiale andrebbe incontro all'interno del corpo [67].

Concentrazione

La concentrazione, intesa come grammi di materiale in un dato volume di soluzione, è un parametro importante perché determina il raggiungimento o meno del limite di solubilità, per questo motivo solitamente è bassa, ma talvolta sono testati valori superiori di concentrazione per valutarne l'influenza sulla degradazione oppure, per esempio, per simulare un deposito locale di materiale [17]. Concentrazioni molto inferiori alla solubilità sono definite "sink condition" (C < 0,20 Cs) e permettono di elaborare osservazioni sull'evoluzione del materiale senza condizionamenti [68].

La scelta del mezzo e delle condizioni per le prove di degradazione è dettata dall'applicazione futura del materiale: se il *carrier* è destinato alla somministrazione intravenosa bisognerà testare come risponde in un ambiente a bassa concentrazione e pH neutro; se è progettato per applicazioni locali, per intramuscolari o topiche, la concentrazione sarà maggiore; se il *carrier* è assunto oralmente dovrà essere valutata la risposta a pH tipici del tratto gastrointestinale [69].

1.2 Valutazione della degradazione

La degradazione viene stimata attraverso l'analisi della dissoluzione. Per prima cosa è necessario separare la componente dissolta del materiale e trovare un metodo per misurarla quantitativamente. La separazione è un passaggio fondamentale, perché si rischia di sovrastimare o sottostimare la dissoluzione; può avvenire per centrifugazione, che permette di analizzare singolarmente surnatante, in cui si troveranno i prodotti della degradazione, e precipitato, dove rimane il materiale non completamente degradato, oppure tramite membrana di dialisi, che funziona tramite gradiente di concentrazione [63]. Il secondo metodo è vantaggioso in particolare per le sospensioni colloidali di particelle, in quanto permette di separare immediatamente le specie dissolte e non è necessaria l'agitazione della soluzione [70].

Componente dissolta

Uno dei metodi più utilizzati per la misura della componente dissolta è la spettroscopia di emissione al plasma atomica o ottica (ICP – AES, *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy* o ICP – OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), in grado di determinare la composizione elementare qualitativa e quantitativa, anche per diversi elementi presenti a basse concentrazioni, di campioni allo stato liquido. In particolare, la dissoluzione della silice viene valutata sulla base della quantità di silicio misurata nella soluzione [19], [26].

Una seconda strategia consiste nella rilevazione dell'acido silicico rilasciato durante la dissoluzione del materiale tramite analisi colorimetrica: quando viene aggiunto molibdeno (mediante introduzione di molibdato di ammonio idrato o molibdato di sodio idrato) si forma acido silico-molibdico che vira il colore della soluzione verso il giallo. Per migliorare la rilevazione, la soluzione viene ridotta con acido ascorbico per formare il complesso blu di molibdeno: in questo modo il limite di rilevazione diminuisce da 10^{-4} a $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l [71]. Inizialmente solo l'acido mono-silicico già in soluzione può reagire con il molibdeno, ma piccoli oligomeri possono depolimerizzarsi e formare complessi in ritardo rispetto all'inizio della misurazione, in questo modo si può avere un'indicazione della presenza di oligomeri in base al ritardo nella reazione [71]. Tuttavia, il pH della reazione è basso (si aggiunge acido cloridrico prima del molibdato) perché l'acido silico-molibdico si forma a pH < 4,5 [72] e in queste condizioni i processi di condensazione e idrolisi avvengono lentamente.

Componente solida

Per quanto riguarda la degradazione della parte solida ancora presente, questa viene analizzata tramite microscopia elettronica, TEM (*Transmission Electron Microscope*) o SEM (*Scanning Electron Microscope*), che permette di constatare l'effettiva degradazione tramite variazioni morfologiche. Spesso si valutano anche i cambiamenti subiti dalla struttura mesoporosa durante l'immersione nei fluidi, ripetendo le caratterizzazioni effettuate sul materiale integro appena sintetizzato [61], [63]. Ad esempio, lo spettro di diffrazione a raggi X (XRD, *X-ray diffraction*) fornisce indicazioni sulla trasformazione del reticolo mesoporoso che durante la degradazione, nella maggior parte dei casi, collassa perdendo il tipico picco dei materiali mesoporosi [40]. Inoltre, le curve di assorbimento di azoto sono utili per osservare come cambia l'area superficiale, il diametro dei pori e il volume poroso a seguito delle prove di degradazione [73].

La percentuale di silice degradata potrebbe anche essere valutata pesando il materiale prima e dopo l'immersione nel mezzo di dissoluzione [74].

1.3 Dissoluzione di un solido

La dissoluzione di un solido in un liquido è guidata dal gradiente di concentrazione tra la superficie del solido e la soluzione; il processo può essere descritto matematicamente dall'equazione di Noyes-Whitney [56], secondo cui la concentrazione C delle specie dissolte segue una cinetica del primo ordine:

$$\frac{\mathrm{dC}}{\mathrm{dt}} = \mathrm{kS}(\mathrm{C_s} - \mathrm{C}) \tag{1}$$

dove, k è la costante cinetica di dissoluzione, S è l'area superficiale e Cs è la solubilità all'equilibrio.

All'interfaccia tra solido e soluzione la saturazione viene raggiunta rapidamente, per cui si forma uno strato stagnante di liquido in cui la concentrazione di specie dissolte è uguale a Cs, a mano a mano che ci si allontana la concentrazione diminuisce e si procede attraverso uno strato di diffusione fino al raggiungimento della concentrazione nell'interno della soluzione [56]. Il procedimento è illustrato in Figura 8.

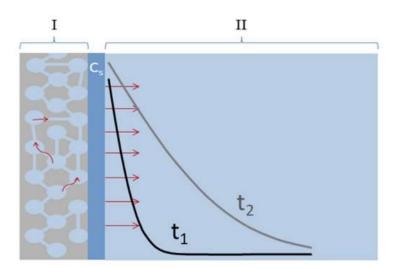


Figura 8: schema del processo di dissoluzione; nella fase I le specie dissolte (frecce rosse) diffondono nel reticolo poroso, attraversano lo strato stagnante a concentrazione Cs e diffondono guidati dal gradiente di concentrazione nella fase II. Le due curve in nero e grigio rappresentano i profili di concentrazione dello strato di diffusione a due diversi tempi di dissoluzione (t1 e t2), dove si vede la tendenza verso la concentrazione della soluzione.

Quando il solido è poroso, la dissoluzione si divide in due fasi (Figura 8) [68]:

- *Prima fase (I)*: dissoluzione e diffusione delle specie dissolte da dentro i pori fino all'interfaccia del solido con la soluzione, la diffusione è limitata dal volume accessibile e dalla tortuosità del network poroso;
- Seconda fase (II): diffusione dall'interfaccia alla soluzione guidata dal gradiente di concentrazione e dal limite di saturazione.

Tuttavia, durante il processo di dissoluzione il materiale subisce un'evoluzione della morfologia a causa della degradazione, per esempio cambiano il volume poroso e la tortuosità, che comporta inevitabilmente la deviazione rispetto all'equazione di Noyes-Whitney. Infatti, la costante di dissoluzione k, che dipende dal coefficiente di diffusione delle specie dissolte, nel caso di solidi porosi in cui il network poroso sta evolvendo per la degradazione, non può essere considerato costante [56].

2. Dissoluzione della silice mesoporosa

I materiali di silice mesoporosa hanno una struttura unica: ordinata in scala mesoscopica e disordinata in scala atomica. La disposizione dei pori, cioè, segue un reticolo ordinato, mentre le pareti che dividono i pori sono composte da silice amorfa [75]. La struttura delle pareti in silice amorfa è costituita da tetraedri SiO₄ che formano una struttura disordinata di ponti silossano e gruppi silanolo liberi in grado di reagire con altre molecole [13]. La silice amorfa è più solubile rispetto a quella cristallina, ma diverse forme di silice amorfa, come la polvere, il gel e le particelle colloidali, sono solubili allo stesso modo, perché la loro struttura fondamentale è uguale [34]; la solubilità in acqua a temperatura ambiente e pH neutro è di 120 ppm [76].

Il processo di dissoluzione della silice amorfa in acqua comprende tre fasi [77], illustrate nelle Figure 9-10-11:

- *Idratazione*: le molecole di acqua vengono adsorbite nel reticolo di silossani,

Figura 9: idratazione

- *Idrolisi*: i silossani sono idrolizzati in silanoli,

Figura 10: idrolisi

 Scambio ionico: attacco nucleofilo degli ioni OH- verso gli atomi di silicio elettropositivi dei silanoli, quando un altro gruppo ossidrile attacca questo complesso intermedio instabile, viene rilasciato acido silicico.

Figura 11: scambio ionico

Il tasso di dissoluzione (R_{diss}) della silice dipende dalla concentrazione di tre gruppi superficiali [78]:

- Silanoli protonati SiOH²⁺
- Silanoli neutri SiOH
- Silanoli deprotonati SiO

Secondo l'equazione

$$R_{diss} = k(H^{+})[SiOH_{2}^{+}]^{m} + k(H_{2}O)[SiOH]^{m} + k(OH^{-})[SiO^{-}]^{p}$$
(2)

dove m e p sono gli ordini della reazione, mentre k(H⁺), k(H₂O) e k(OH⁻) sono costanti.

Come detto in precedenza, l'unità fondamentale è il tetraedro SiO₄, con l'atomo di silicio centrale e quattro atomi di ossigeno ai vertici del tetraedro; la superficie è composta principalmente da due terminazioni: legami silossano Si – O – Si e gruppi silanolo Si – OH. I silossani sono presenti anche all'interno della matrice perché sono i vertici in comune del tetraedro SiO₄, ma non sono accessibili; i silanoli sono generati dall'incompleta condensazione: i gruppi OH dell'acqua, normalmente presente nell'ambiente circostante, durante la sintesi ad esempio, completano la valenza dell'atomo di silicio. La superficie della silice pura è composta da regioni di legami silossano interrotte da siti che espongono silanoli, questi ultimi sono i responsabili delle proprietà idrofiliche della silice, perché interagiscono con gruppi o molecole polari attraverso legami a idrogeno [79].

Sulla superficie del materiale, quindi, si possono trovare gruppi meno condensati in cui uno o due legami con l'ossigeno sono sostituiti da ossidrili. Si distinguono i gruppi, osservabili anche nella Figura 12 [80]:

- Q₄ = SiO₄, tetraedro completamente condensato, in cui l'atomo di silicio è circondato da quattro atomi di ossigeno; gli atomi di silicio che appartengono ai tetraedri interni alla massa sono Q₄;
- Q₃ = SiO₃(OH), gruppo silanolo a singolo ossidrile, in cui il legame con la massa coinvolge tre ponti silossano, mentre la valenza è riempita da un ossidrile;
- $Q_2 = SiO_2(OH)_2$, gruppo silanolo a doppio ossidrile, i cui il silicio è legato a due ossidrili.

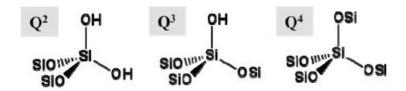


Figura 12: gradi di condensazione del tetraedro di silice [79]

La dissoluzione comincia rimuovendo i gruppi più reattivi del network di silice, cioè quelli meno coordinati alla struttura, i Q₂ e i Q₃. Quando uno di questi viene allontanato, il processo di dissoluzione procede in maniera costante, perché si formano altri gruppi reattivi [81].

Il processo è lento, ma la struttura mesoporosa offre ampie superfici e zone convesse, con raggi di curvatura stretti, che accelerano la dissoluzione [82]: la solubilità di una fase solida in un liquido è maggiore se la superficie è convessa, più è piccolo il valore assoluto del raggio di curvatura e più grande è l'effetto sulla solubilità [83].

3. Fattori che influenzano la degradazione

Sono vari i fattori che incidono sul tasso di dissoluzione della silice, ma per prima cosa bisogna distinguere tra quelli che dipendono dal materiale e quelli che invece sono determinati dall'ambiente.

3.2 Ambiente circostante

Il mezzo di dissoluzione, la temperatura, la concentrazione delle particelle nel mezzo e la presenza di agenti solubilizzanti e ioni in soluzione hanno un grande impatto, ma se si parla di silice mesoporosa pura il parametro decisivo è sicuramente il pH dell'ambiente.

3.2.1 Mezzo di dissoluzione

La stabilità della silice diminuisce notevolmente in condizioni alcaline, sopra il pH = 9 la solubilità della silice amorfa cresce in maniera esponenziale, come si può vedere dalla Figura 13.

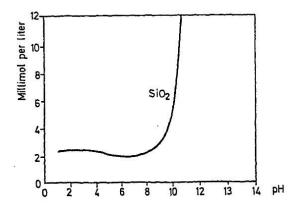


Figura 13: concentrazione di silice amorfa dissolta in acqua a T = 25°C in funzione del pH [34]

Il motivo, come precedentemente spiegato, è che in condizioni alcaline sono presenti numerosi gruppi OH⁻ che agiscono da nucleofili; il meccanismo di dissoluzione è riproposto in Figura 14.

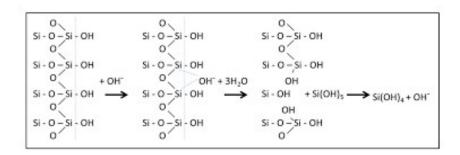


Figura 14: meccanismo proposto di dissoluzione della silice tramite attacco nucleofilo di gruppi OH- [84]

Nello stesso modo, la solubilità cambia se sono presenti agenti solubilizzanti in soluzione che si comportano da specie nucleofile, come le ammine, i fluoruri, i cloruri e ovviamente gli idrossili [62]. A tal proposito esistono degli additivi che si possono introdurre in soluzione per alzare la solubilità (si può passare, per esempio, da 120 ppm a 206 ppm [78]); questi additivi contengono gruppi chimici fortemente anionici che possono interagire con gli atomi di silicio in maniera simile ai gruppi ossidrili. Esempi di agenti solubilizzanti per incrementare la dissoluzione della silice sono: acido acetico (CH₃COOH), acido ossalico ((COOH)₂), l'acido citrico (C₆H₈O₇), l'istidina (C₆H₉N₃O₂) e la fenilalanina (C₉H₁₁NO₂); sono molecole che contengono il gruppo carbossilico COOH o il gruppo amminico in forma protonata NH₃ [78].

Ad eccezione del fluido gastrico simulato (SGF) che ha un pH fortemente acido, di poco superiore a 1, e del fluido intestinale simulato (SIF), debolmente acido, gli altri mezzi che vengono utilizzati per indagare la degradazione della OMS sono pressoché neutri [65]. Le differenze che si riscontrano nel comportamento di degradazione sono da attribuire alla presenza di ioni in soluzione [59], per esempio, la presenza di alcuni ioni in soluzione (in particolare Na, Cl, Ca, K, Mg) accelera la dissoluzione della silice [85]. Anche sali di acidi organici, di e tri-carbossilati, contribuiscono a promuovere la dissoluzione della silice, perché formano complessi con le specie di silice dissolte, impedendo il raggiungimento del limite di saturazione; questo spiega perché la dissoluzione in SLF, dove si trovano questi sali, sia più veloce di quella in SBF e PBS, nonostante il pH sia molto simile se non uguale (PBS e SLF pH = 7,4; SBF pH = 7,25) [59].

3.2.2 Concentrazione

La correlazione tra la concentrazione con cui le particelle vengono disperse nella soluzione e il tasso di dissoluzione è facilmente prevedibile, soprattutto se si tratta di sistemi chiusi in cui il mezzo non viene sostituito con mezzo fresco, perché la dissoluzione è regolata da limiti di solubilità; sostituire con mezzo fresco permette di raggiungere percentuali di degradazione più alte.

È stato dimostrato che MSN disperse in etanolo e conservate a concentrazioni maggiori di 10 mg/ml resistono alla degradazione per almeno tre anni: area superficiale e diametro dei pori non variano, così come la distribuzione dimensionale e la morfologia [46].

Le concentrazioni che si adottano in campo biomedico sono decisamente inferiori, e non c'è ragione di soffermarsi ad analizzare situazioni in cui la degradazione è inibita dal raggiungimento immediato del limite di saturazione, per questo motivo nelle sperimentazioni difficilmente si superano i 2 mg/ml.

Il criterio secondo il quale minore è la concentrazione e maggiore è la dissoluzione trova conferma in tutti gli studi in cui il fenomeno viene analizzato, come mostrato nella Figura 15. Le curve di dissoluzione sono diverse perché le particelle sono sintetizzate tramite procedure diverse e i test sono condotti seguendo protocolli differenti. Nella Figura 11a si tratta di particelle silice mesoporosa del tipo MCM – 41 incubate in SBF a 37°C in agitazione [86]; nella Figura 11b sono particelle poste sempre in una soluzione di SBF agitata a 37°C ma del

tipo SBA – 15 [17]; nella Figura 11c si utilizza una membrana da dialisi e il mezzo (PBS a 37°C) viene sostituito giornalmente per testare la degradazione di particelle MCM – 41 [87]; nella Figura 11d le particelle sono non porose e il sistema che si utilizza per testare la dissoluzione è un sistema aperto in cui le particelle si trovano in una camera chiusa attraversata dal mezzo (PBS a 37°C), sempre fresco [29]. In tutti i casi però la dissoluzione dipende dalla concentrazione.

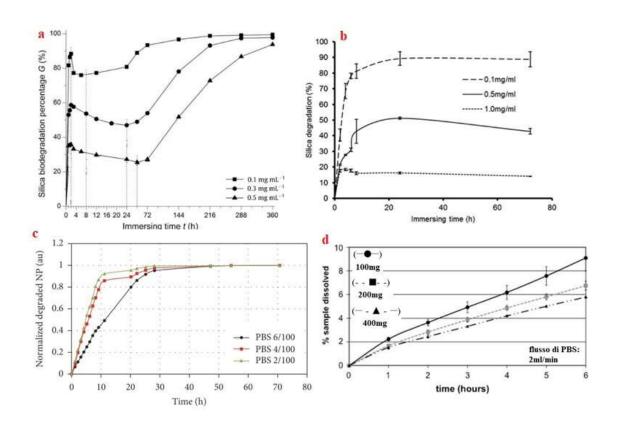


Figura 15: influenza della concentrazione sulle curve di dissoluzione. a) MCM – 41 in SBF con agitazione [86]; b) SBA – 15 in SBF con agitazione [17]; c) MCM – 41 in PBS e mezzo sostituito giornalmente [87]; d) silice non porosa in flusso di PBS [29].

3.2.3 Altri effetti dovuti all'ambiente

La forza motrice della dissoluzione è il fatto che nella soluzione le specie dissolte presenti nel mezzo si trovano in condizioni di sotto-saturazione; quando si raggiunge la saturazione le specie dissolte condensano e precipitano sottoforma di gel di silice [68]. Si realizza un equilibrio tra

dissoluzione e condensazione della silice, spesso osservabile nelle curve di degradazione, perché il tasso di degradazione raggiunge un plateau e poi si ferma.

Quando il mezzo di dissoluzione contiene ioni in grado di formare complessi con le specie di silicio, si depositano mono-strati di silicati sulla superficie del materiale. Succede per esempio in SBF, in cui la presenza di magnesio e calcio causa la precipitazione di silicati di magnesio e calcio che vengono adsorbiti sulle superfici creando degli strati protettivi che rallentano la dissoluzione della silice [86]; il meccanismo proposto è riportato in Figura 16.

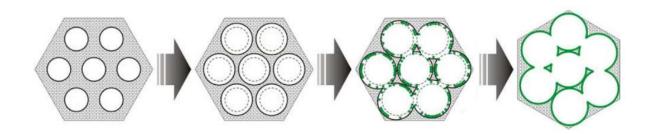


Figura 16: deposizione di uno strato protettivo di silicati (in verde) che inibiscono la dissoluzione della silice [86]

La presenza di ioni che formano complessi con il silicio dissolti non sono sempre controproducenti, legando con le specie dissolte di silicio ne diminuiscono la concentrazione in soluzione e promuovono l'ulteriore dissoluzione della silice, l'importante è che non siano limitati i processi di diffusione: i silicati devono allontanarsi dalla superficie senza precipitare. Un procedimento attuabile potrebbe essere per esempio quello di sostituire il mezzo con mezzo fresco, in questo modo i silicati non avrebbero modo di precipitare e ricondensare.

Un fenomeno correlato che può verificarsi è l'occlusione dei pori, perché la concentrazione delle specie dissolte all'interno di spazi piccoli e confinati come i pori, dove anche la mobilità delle molecole di acqua è limitata, può raggiungere il limite di saturazione. L'occlusione può essere rilevata misurando la variazione del diametro dei pori e del volume poroso tramite le curve di assorbimento di azoto, come mostrato in Figura 17; nello studio condotto da Mortera et al. [88] su particelle di silice MCM – 41 l'immersione in SBF (agitazione, 37°C) porta alla riduzione del diametro dei pori e soprattutto del volume poroso a causa dell'occlusione.

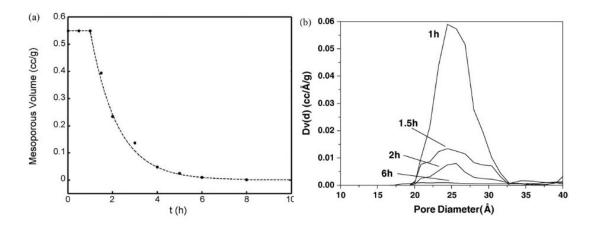


Figura 17: diminuzione del volume poroso e del diametro dei pori causato dal fenomeno di occlusione [88]

L'evoluzione della parete porosa di un materiale SBA – 15 è stata modellizzata da Rébiscoul et al. [89]. A seguito dell'interazione con soluzioni acquose si forma uno strato alterato (gel di silice) in prossimità della superficie del poro, dopodiché il processo si suddivide in due fasi: nella prima il raggio del poro cresce ma lo strato alterato mantiene uno spessore costante, nella seconda il raggio ferma la crescita e lo strato alterato aumenta; in Figura 18 è schematizzata l'evoluzione dei pori così come è stata proposta. Questo accade perché inizialmente il tasso di dissoluzione è uguale al tasso di diffusione dell'acqua attraverso le pareti, quando si raggiunge la saturazione di silice dissolta, la dissoluzione diminuisce e l'idratazione dello strato alterato diventa il processo predominante. Il diametro dei pori dei materiali SBA – 15 è maggiore di quelli del MCM – 41, di conseguenza la diffusione delle specie è favorita ed è meno probabile che si arrivi all'occlusione. Questo spiega perché in alcuni casi il diametro dei pori cresce insieme al tasso di degradazione, mentre in altri casi il diametro diminuisce.

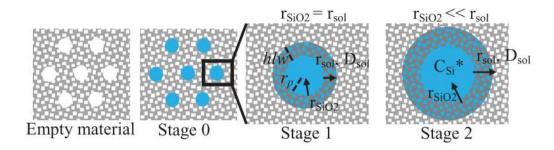


Figura 18: evoluzione della parete dei pori a seguito dell'interazione con soluzioni acquose [89]

Il fenomeno di occlusione (*Pore – Blocking*) è un problema che può verificarsi anche per contaminazione prima delle analisi di dissoluzione, perché nei mesopori potrebbero entrare anche composti volatili organici (VOC) presenti nell'aria e non solo in soluzione. La contaminazione causa una diminuzione del volume poroso e altera il processo di dissoluzione successivo, come dimostra Bindini [68] confrontando due film mesoporosi immersi in PBS, uno dei quali contenente specie assorbite all'interno dei pori (Figura 19).

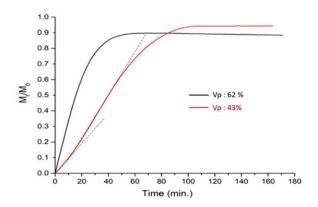


Figura 19: alterazione della curva di dissoluzione nel materiale contaminato (curva rossa) [68]

Cambia il tasso di dissoluzione ma anche la forma della curva: si ottiene una curva sigmoidale perché all'inizio il materiale contaminato ha un volume poroso disponibile alle reazioni con le molecole minore rispetto all'altro, poi i VOC escono dai pori liberando ulteriori superfici di silice. Pertanto, è necessario prestare attenzione alla conservazione dei materiali prima dell'utilizzo.

3.3 Metodo di sintesi

I protocolli di sintesi sono così numerosi e a volte diversi tra loro che confrontare la dissoluzione dei vari materiali è complicato e non è neanche del tutto corretto. Tuttavia, ci si può concentrare sui parametri comuni che sono più facili da individuare e da variare per valutarne l'effetto sulla dissoluzione. Tra questi verranno presi in considerazione: temperatura di sintesi, quantità dei reagenti nella soluzione, scelta del precursore e grado di condensazione della silice.

3.3.1 Parametri di sintesi

Cambiare i reagenti (precursore di silice e surfattante) o le condizioni di sintesi (pH, temperatura, contenuto di acqua...) ha un grande impatto sulle caratteristiche strutturali del materiale che si ottiene [55].

Temperature di sintesi inferiori conducono alla formazione di mesostrutture meno ordinate [90], perché aumenta la velocità di formazione delle particelle e con essa la probabilità che si producano dei difetti nella struttura, che renderebbero la particella più incline alla degradazione [87]. Per esempio, confrontando MSN sintetizzate a 65°C con altre sintetizzate a 80°C, seguendo la stessa procedura, la curva della degradazione relativa (rapporto tra materiale degradato ad un determinato *time point* e materiale degradato totale), rappresentata in Figura 20, mostra come le particelle sintetizzate alla temperatura inferiore subiscano una degradazione più veloce (test di degradazione effettuato in PBS).

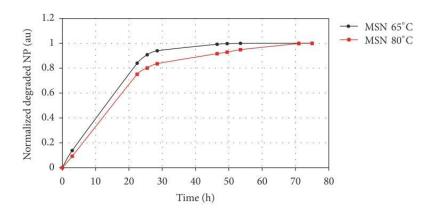


Figura 20: confronto tra la degradazione relative di particelle sintetizzate a 65°C e a 80°C [87]

Anche l'utilizzo di un catalizzatore basico come la trietanolammina (TEA) influenza il comportamento di degradazione delle particelle [87]; quantità maggiori in soluzione fanno sì che la molecola di TEA cominci a comportarsi da agente chelante, legandosi con le molecole del precursore di silice ne riduce la disponibilità in soluzione, le particelle si formano lentamente e con un grado di ordine mesoporoso più alto; la conseguenza è che le particelle formate velocemente hanno una concentrazione di difetti maggiore che le rende più degradabili. La degradazione relativa è riportata in Figura 21.

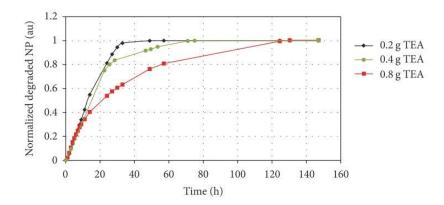


Figura 21: confronto tra le degradazioni relative di particelle fabbricate variando la quantità di TEA in soluzione [87]

3.3.2 Precursore

Il precursore di silice maggiormente impiegato per la sintesi di particelle e film mesoporosi è l'ortosilicato tetraetile (TEOS), costituito da quattro gruppi etilici legati allo ione SiO₄⁴⁻, ma sono disponibili numerosi ortosilicati, con formula generale Si(OR)₄ dove R rappresenta un gruppo organico (alchile, etile, metile, propile...). In alternativa, possono essere utilizzate altre fonti di silice, come la silice pirogenica [91] e il sodio silicato (Na₂SiO₃) [92]. Le strutture di TEOS e sodio silicato sono rappresentate in Figura 22.

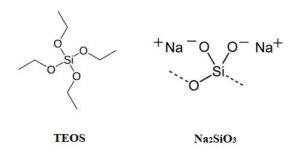


Figura 22: esempi di precursori di silice

Cambiare la fonte di silice può portare a differenze nei parametri fisico-chimici come composizione, dimensione, forma, porosità, per esempio, utilizzando il TEOS si ottengono pori più piccoli rispetto a quelli che si trovano nei materiali preparati con sodio silicato [93]. Oltre alla dimensione maggiore dei pori, il sodio silicato lascia una piccola quantità di sodio nel framework di silice, che contribuisce ad aumentare la reattività della silice amorfa nel processo di dissoluzione [85].

3.3.3 Agente "templante"

Il metodo di rimozione dell'agente "templante" influisce sulla degradazione per diversi aspetti: se effettuato tramite calcinazione provoca un aumento del grado di condensazione della silice, se realizzato per estrazione bisogna fare attenzione che non rimangano residui [17].

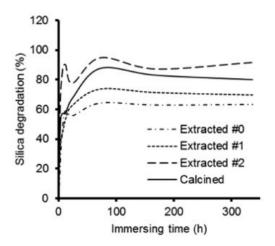


Figura 23: percentuali di degradazione di particelle in base alla rimozione del tensioattivo. Residui di tensioattivo a seguito della rimozione: Extracted#0 = 30%wt, Extracted#1 = 15%wt, Extracted#2 = 10%wt. [17]

La Figura 23, presa da uno studio condotto da Choi et al. [17] nel quale è stata studiata la degradazione di particelle di silice mesoporosa del tipo SBA – 15 poste in agitazione in SBF a 37°C, mostra come la presenza di residui di tensioattivo, in questo caso è utilizzato il polimero triblocco P123, rallenti il processo di dissoluzione (all'estrazione #0 rimane il 30% wt. di tensioattivo, mentre all'estrazione #2 scende al 10% wt.; estrazioni effettuate in acido cloridrico ed etanolo a 70°C). Dallo stesso studio si nota anche la minore degradazione del campione calcinato (550°C per 5h), a causa della condensazione maggiore della silice a seguito del trattamento termico.

Il fatto che la calcinazione delle particelle riduca la degradazione era già stato verificato in uno studio precedente da He et al. [86], confrontando MSN in cui il tensioattivo, in questo caso CTAB, è stato rimosso tramite estrazione in etanolo e acido cloridrico ad 80°C oppure tramite calcinazione a 550°C per 6h. Le particelle sono state lasciate in immersione e agitate in SBF a 37°C; le percentuali di degradazione sono riportate in Figura 24.

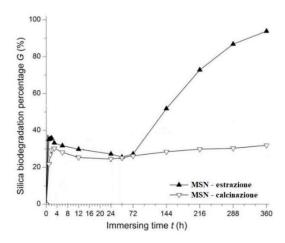


Figura 24: confronto tra particelle in cui il tensioattivo è rimosso per calcinazione e per estrazione [86]

Nonostante i processi di estrazione e calcinazione siano effettuati in maniera molto simile tra i due studi, che il mezzo di dissoluzione sia lo stesso, così come il metodo di rilevamento (ICP – AES), i risultati delle curve di degradazione ottenute nei due studi di Choi et al. [17] e He et al. [86] variano molto tra loro. Il motivo è la diversa sintesi delle particelle: nel primo caso si tratta di silice SBA – 15, preparate in condizioni acide (P123 dissolto in acqua e acido cloridrico mantenuto in agitazione 20 h a 40°C); mentre nel secondo caso non è specificato, ma dal metodo di sintesi (CTAB in soluzione acquosa di glicerolo e idrossido di sodio ad 80°C per 8h) e dallo spettro XRD (picchi 100, 110 e 200) si può supporre che si tratti di MCM – 41, quindi con diametro dei pori minore. In Tabella 2 sono riportate le caratteristiche strutturali delle particelle preparate nei due studi.

Tabella 2: confronto tra le caratteristiche strutturali delle particelle prodotte da Choi [17] e da He [86] seguendo procedure di sintesi diverse

	Diametro pori	Area superficiale	Volume poroso
	(nm)	(m^2/g)	(cm ³ /g)
SBA – 15	~ 8	777,4	1,11
MCM – 41	n.a.	958,3	0,95

3.3.4 Condensazione della silice

Il grado di condensazione è un parametro fondamentale nell'analisi della degradazione, perché governa la reattività del network di silice nel processo di idrolisi. Sulla superficie del materiale

a seguito della sintesi solitamente sono presenti ancora gruppi silanoli Si – OH. Durante la calcinazione questi gruppi condensano fra loro, formando legami silossano Si – O – Si e rilasciano una molecola di acqua; si può verificare quest'evento calcolando il rapporto Q₃/Q₄ che a seguito dell'avvenuta condensazione diminuisce [94]. Aumentando il grado di condensazione della silice, il tasso di dissoluzione decresce perché i silossani rendono la superficie più idrofobica, al contrario dei silanoli che migliorano l'idrofilicità, e perché il network di legami diventa più fitto. Le particelle non porose generalmente sono più condensate, grazie alla vicinanza dei silanoli durante la sintesi, e per questo degradano più lentamente [86].

Campioni di silice mesoporosa preparati con la stessa procedura ma calcinati a temperature diverse hanno comportamenti di degradazione diversi, come emerge dall'analisi di Bass et al. [95]. In questo lavoro, una silice, avente una struttura mesoporosa del tipo SBA − 15, viene preparata sottoforma di film (rapporti molari → 1TEOS:35EtOH:5H₂O:0,08HCl:0,004F127) depositando la soluzione su di un substrato di silicio, lasciandola prima tre giorni a temperatura ambiente e poi un altro giorno a 130°C e infine calcinandola per 5h a 450°C o 550°C. Il tasso di dissoluzione misurato durante l'immersione in PBS a 37°C risulta essere inferiore del 40% nel caso di calcinazione a 550°C rispetto a quello misurato a 450°C a causa del maggior grado di condensazione ottenuto. Il diverso grado di condensazione è visibile anche dalla densificazione del materiale, che si contrae del 50% e del 55% rispettivamente a seguito della calcinazione a 450°C e 550°C.

La calcinazione non è l'unico metodo per intensificare la condensazione della silice: anche trattamenti termici a temperature più basse hanno lo stesso effetto. Per esempio, due film di silice mesoporosa (in questo caso preparati in condizioni acide: rapporti molari → 1TEOS:40EtOH:0,09HCl:5H₂O:0,14CTAB), uno stabilizzato a 130°C per 16h prima della rimozione del tensioattivo tramite estrazione e l'altro calcinato a 450°C, se immersi in PBS a 37°C presentano curve molto simili, come si può vedere dal test effettuato nella ricerca di Bindini [68] e riportato in Figura 25.

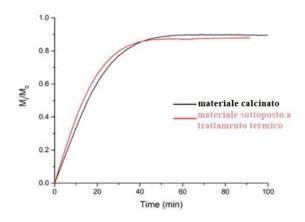


Figura 25: silice dissolta normalizzata alla massa di silice iniziale in funzione del tempo di immersione [68]

I due film hanno anche caratteristiche simili: stesso ordine mesostrutturale e area superficiale, mentre volume poroso, dimensione dei pori e spessore delle pareti hanno valori molto vicini; le differenze potrebbero essere attribuibili ad un grado di condensazione di poco maggiore nel caso della silice calcinata, infatti anche il network sembra più contratto. In Tabella 3 sono riassunte le caratteristiche strutturali dei film a seguito di calcinazione e trattamento termico a temperatura minore; come si può notare le differenze sono molto piccole.

Tabella 3: caratteristiche strutturali dei film a seguito di calcinazione e trattamento termico a temperatura minore [68]

	Area superficiale (m²/g)	Volume poroso (%)	Diametro pori (nm)	Spessore pareti (nm)
Trattamento a 130°C	850	60,1	1,6x1,5	1,2
Calcinazione a 450°C	850	62	1,6x1,4	1,1

Uno degli effetti del trattamento termico è proprio l'espansione dei pori, perché le pareti in silice condensandosi si assottigliano. Il trattamento può essere effettuato in acqua, soluzione salina o nel liquido madre, cioè la soluzione di sintesi, e il risultato è diverso a seconda di cosa si utilizza. Per esempio, il liquido madre tipicamente ha pH alti, la silice idrolizza velocemente e subisce un'ampia ristrutturazione, in acqua invece l'espansione dei pori è ridotta, ma la condensazione dei silossani è più completa, conferendo una stabilità migliore; per quanto

riguarda le soluzioni saline l'esito del trattamento dipende dal tipo di ioni che si aggiungono [49].

3.4 Caratteristiche delle particelle

Infine, ma non ultime per importanza, anche le caratteristiche delle particelle (o del film) influiscono sulla dissoluzione: porosità, mesostruttura, morfologia, stato di aggregazione delle particelle e soprattutto area superficiale.

L'area superficiale è il fattore principale che governa la dissoluzione delle particelle: maggiore è la superficie esposta al fluido biologico e maggiore sarà la degradazione [40]. Le particelle mesoporose hanno aree superficiali molto ampie, dovute principalmente alla mesostruttura; la degradazione comincia dove le interazioni con il mezzo di dissoluzione sono abbondanti, cioè la particella comincia a degradare dall'interno, portando al collasso della struttura [40][96][97]. In Figura 26 è schematizzato il processo di dissoluzione che porta al collasso.

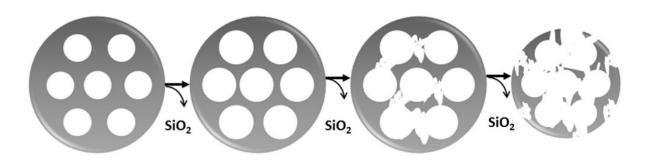


Figura 26: schema del processo di degradazione della OMS [40]

Se la superficie interna della particella non è raggiungibile, per esempio perché sono presenti dei rivestimenti o delle funzionalizzazioni superficiali, che impediscono l'entrata nei canali porosi, il collasso non avviene, o avviene più lentamente [98].

3.4.1 Aggregazione

Un aspetto spesso trascurato nella trattazione della degradazione è lo stato di dispersione delle particelle nella soluzione. In particolare, bisognerebbe distinguere tra l'aggregazione e l'agglomerazione, ma accade anche in letteratura che i due termini vengano interscambiati. Nel

primo caso le particelle primarie si fondono o sono molto legate tra loro (per esempio tramite legami covalenti) formando particelle secondarie; per agglomerato, invece, si intende un insieme di particelle tenute insieme da legami deboli, come le forze di Van der Waals, che possono essere facilmente spezzati.

La differenza a cui prestare attenzione è che nell'agglomerato l'area superficiale totale è uguale alla somma delle aree superficiali dei singoli componenti, nell'aggregato, invece, l'area superficiale è sensibilmente inferiore. Per questo motivo l'aggregazione delle particelle influenza la dissoluzione, rallentandola [70].

Lo stato di aggregazione non sempre viene menzionato nei vari studi che affrontano il problema della degradazione, a volte però vengono misurati potenziale Zeta e diametro idrodinamico, che aiutano a fornire indicazioni sulla dispersione [87], insieme alla distribuzione dimensionale del diametro, che dovrebbe presentare un unico picco stretto nel caso in cui non siano presenti aggregati.

Yamada et al. [70] confrontarono il comportamento di aggregati di particelle e particelle disperse durante l'immersione in PBS a 37°C. Il risultato dello studio è mostrato in Figura 27 e si nota subito come le particelle aggregate subiscano una degradazione nettamente più lenta rispetto alle corrispettive non aggregate

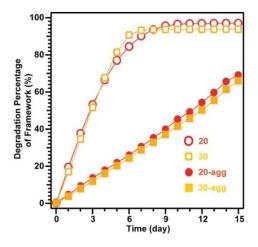


Figura 27: confronto tra particelle disperse e particelle aggregate [70]

Tuttavia, nel lavoro viene riportato che la preparazione degli aggregati avviene asciugando le particelle a 120°C per un giorno, ma non viene fornita alcuna informazione sulla caratterizzazione di questi aggregati. Gli autori presumono che l'area superficiale sia diminuita e che questa sia la causa della riduzione di degradazione, insieme ai moti browniani delle particelle, assenti per gli aggregati, che nel caso di soluzioni colloidali provocano collisioni più frequenti con le molecole di acqua.

3.4.2 Porosità

Particelle di silice amorfa non porose (SN, *Silica Nanoparticles*) hanno un tasso di degradazione iniziale minore rispetto a quelle mesoporose. Confrontando i profili di degradazione di SN e MSN, si nota che in qualunque mezzo testato, qualunque sia il procedimento di preparazione e le condizioni con cui viene effettuato il test, le SN hanno una cinetica di degradazione più lenta rispetto alle MSN [59], [64], [70], [86], [99]. Inoltre, la dissoluzione procede dalla superficie esterna della particella, motivo per cui la dimensione si riduce a mano a mano che procede [59]. Rispetto alle MSN, le SN hanno aree superficiali molto inferiori (decine di m²/g contro a centinaia se non di più di m²/g), che però crescono quando la superficie si riduce di dimensione; le percentuali di degradazione alla fine dei test a volte sono maggiori di quelle delle MSN [59] [64]. Nell'esempio proposto in Figura 28, si può vedere come le SN abbiano una cinetica di degradazione più lenta.

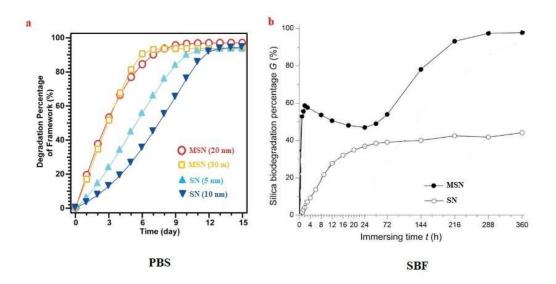


Figura 28: confronto tra degradazione di particelle mesoporose e non porose. a) degradazione in PBS a 37°C, membrana di dialisi (no agitazione). [70] b) degradazione in SBF a 37°C, in agitazione [86]

Nella Figura 28a la percentuale di degradazione delle SN è minore del 10%, contro il 15% giornaliero delle MSN [70]; inoltre, si nota una dipendenza dalla dimensione delle particelle, perché in questo caso minore è il diametro e maggiore è l'area superficiale. Nella Figura 28b, le SN oltre a raggiungere percentuali di degradazione minore, mostrano anche un comportamento diverso: nel caso di MSN si può distinguere un comportamento a tre fasi, in cui la dissoluzione iniziale è molto veloce, poi rallenta e la concentrazione di silicati diminuisce e infine ricomincia a crescere [86]. La seconda fase è dovuta alla formazione dei complessi silicati, per esempio con calcio e magnesio presenti in SBF, che diminuiscono la concentrazione di silicio presente in soluzione. Le SN non manifestano questo effetto. La degradazione in tre fasi che viene attribuita alle particelle mesoporose non è sempre osservabile, dipende dal mezzo, dalle condizioni delle prove e dalla modalità con cui la degradazione viene valutata.

La densità invece sembra non incidere sulla degradazione, confrontando MSN con HMSN non si trovano differenze significative [99].

3.4.3 Dimensione

La dimensione non è un aspetto da considerare nella degradazione, a meno che non si tratti di particelle di silice amorfa non porose, in quel caso più le particelle sono piccole e più è veloce la dissoluzione perché aumentando l'energia libera superficiale aumenta la solubilità [100] e con il diminuire del diametro delle particelle aumenta l'area superficiale per unità di massa.

Nello stesso lavoro citato precedentemente Yamada et al. [70] dimostrano quest'asserzione preparando quattro campioni di particelle di dimensioni diverse e valutandone la degradazione in PBS a 37°C. Per ottenere diametri differenti vengono utilizzati quattro precursori di silice diversi (TMOS, *tetramethoxysilane*; TEOS, *tetraethoxysilane*; TPOS, *tetrapropoxysilane*; TBOS, *tetrabutoxysilane*), lo stesso tensioattivo (C₁6TMABr, *Hexadecyltrimethylammonium bromide*) e la stessa procedura di sintesi, compresi i rapporti molari (rapporto molare → 1tetraalcossisilano:0.50C₁6TMABr:0.25TEA:1200H₂O). Il tensioattivo viene dissolto in acqua con trietanolammina (TEA) a 80°C in agitazione per mezz'ora, poi viene aggiunto il precursore di silice e l'agitazione viene mantenuta per altre sei ore; infine, il tensioattivo viene estratto tramite dialisi con acido acetico ed etanolo.

Dalla caratterizzazione delle particelle risulta che solo la dimensione è diversa, mentre area superficiale, volume poroso e dimensione dei pori sono praticamente gli stessi; anche lo spettro XRD conferma che le mesostruttura non varia in maniera considerevole tra le particelle.

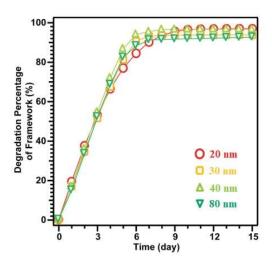


Figura 29: confronto tra percentuali di degradazione di particelle di diversa dimensione [70]

Dal grafico riguardante il test di immersione in PBS (Figura 29) si può notare come il tasso di degradazione sia indipendente dalla dimensione delle particelle; tuttavia, non si può trascurare il fatto che vengano utilizzati precursori diversi. Generalmente per controllare la dimensione delle particelle sono utilizzati metodi diversi, per esempio la variazione del rapporto tra TEOS e TEA, l'aggiunta di catalizzatori basici o meccanismi di spegnimento⁵ della crescita delle particelle [14]; in questo caso, invece, si impiegano precursori che differiscono tra loro per la velocità di idrolisi: maggiore è la velocità di idrolisi e minore è la dimensione della particella.

In Tabella 4 sono riportate le caratteristiche strutturali delle particelle, in modo da evidenziare che l'unica variazione si trova nella dimensione, per dimostrare che si sta valutando esclusivamente l'influenza della dimensione.

più piccole ma con una struttura meno ordinata [161].

_

⁵ Per ottenere particelle di dimensioni minori una strategia è quella di "spegnere" la reazione di condensazione aggiungendo dopo 40s acqua alla soluzione per diluirla e dopo 60-220s acido cloridrico per neutralizzarla; la diluizione riduce la coalescenza e la neutralizzazione riduce la velocità di condensazione. Si ottengono particelle

Tabella 4: caratteristiche strutturali delle particelle, le uniche differenze significative si ritrovano nella dimensione [70]

	Dimensione	Volume poroso Area superficiale		Diametro pori	
	(nm)	(cm ³ /g)	(m ² /g)	(nm)	
TMOS	20	1,1	960	4,3	
TEOS	30	1,3	960	4,3	
TPOS	40	1,3	980	4,3	
TBOS	80	1,1	980	4,3	

3.4.4 Morfologia

La forma più comune per le particelle di silice mesoporosa studiate per DDS è quella sferica, ma esistono anche particelle in forma ellissoidale, cubica, discoidale, di bastoncini (lunghi o corti), a foglietto o film. Più è irregolare la forma e più è alta l'area superficiale, cioè la sfera è la forma con area superficiale minore. Nonostante ciò, le particelle mesoporose sferiche dissolvono più velocemente di quelle a bastoncino in ambiente fisiologico, come dimostrano Li et al. in uno studio del 2015 [74].

Lo studio prevedeva la fabbricazione di particelle mesoporose con tre diversi *aspect ratio* (AR) semplicemente variando le proporzioni dei reagenti. Precursore di silice, tensioattivo e base rimangono gli stessi, così come le condizioni di sintesi: CTAB dissolto in acqua e ammoniaca, tenuto in agitazione per un'ora prima di aggiungere TEOS e mantenere l'agitazione ancora quattro ore a temperatura ambiente. Le particelle sono poi raccolte tramite centrifugazione e ridisperse in acqua deionizzata o etanolo alternativamente; la rimozione del tensioattivo avviene per estrazione in acido cloridrico ed etanolo per 24 h. In Tabella 5 sono riassunte le caratteristiche strutturali (dimensioni e diametro pori) e i rapporti molari utilizzati per la sintesi delle particelle.

Tabella 5: rapporti molari utilizzati per la fabbricazione di particelle con AR diversi; dimensione e diametro dei pori delle particelle ottenute [74]

AR	Rapporti molari CTAB:H2O:NH3:TEOS	Dimensioni (nm)	Diametro pori (nm)
1	0,1:1000:10:0,7	83	2,8
1,75	0,18:1000:20:1,4	83x146	2,8
5	0,5:1000:20:2,8	96x483	2,8

La degradazione è testata in tre mezzi diversi, SGF (pH = 1,2), SIF (pH = 6,8) e SBF (pH = 7) alla temperatura di 37°C in agitazione costante e concentrazione di particelle in soluzione di 2 mg/ml; ed è valutata tramite variazioni morfologiche e di peso del campione. I risultati della degradazione dopo 7 g rappresentati nella Figura 30 mostrano come, in tutti i mezzi testati, la forma di bastoncino lungo (AR = 5) sia la più lenta a degradare.

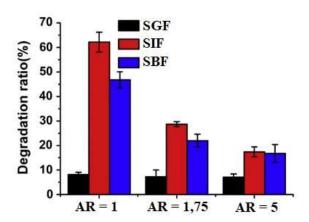


Figura 30: percentuali di degradazione delle particelle [74]

Le differenze tra i tassi di degradazione sono da attribuire teoricamente solo alla morfologia, mentre quelle tra i mezzi derivano dai diversi pH (a conferma del fatto che le condizioni alcaline promuovano la dissoluzione della silice). Bisogna però considerare il fatto che le particelle non sono state caratterizzate in maniera approfondita: il diametro dei pori è uguale, ma non è stata misurata l'area superficiale delle diverse forme e non è specificato nulla sulla morfologia della mesostruttura interna, che come già è noto, sono due aspetti fondamentali nell'avanzamento della dissoluzione.

4. Prodotto di degradazione

Dal processo di dissoluzione della silice in ambiente acquoso si ottiene acido ortosilicico:

$$SiO_2 + 2 H_2O \rightarrow H_4Si O_4 \tag{3}$$

L'acido ortosilicico è una molecola piccola (<5,5 nm) costituita da un atomo di silicio legato a quattro gruppi ossidrili formando un tetraedro; grazie alle dimensioni ridotte è in grado di diffondere facilmente attraverso i tessuti e circolare nel flusso sanguigno, fino ad essere escreta dalle urine [58].

A basse concentrazioni di silice le prime forme che lisciviano sono quelle monomeriche, mentre a concentrazioni più alte si possono formare anche forme polinucleate [85]. Infatti, l'acido silicico può esistere sia come acido mono-silicico, sia come acido poli-silicico. La forma monomerica è stabile in soluzioni acquose molto diluite (<1,9 mM), ma quando la concentrazione aumenta comincia a condensare: si formano prima acidi oligo-silicici e poi catene di acido poli-silicico a composizione variabile $SiO_x(OH)_{4-2x}$, il processo avviene spontaneamente se si supera il limite di saturazione nella soluzione acquosa [101]. In Tabella 6 sono state riassunte le forme che può assumere l'acido silicico.

Tabella 6: Forme diverse dall'acido ortosilicico

Acido metasilicico	H ₂ SiO ₃
Acido di-silicico	$H_2Si_2O_5$
Forma idrata (Acido piro-silicico)	$H_2Si_2O_5 + 2H_2O \rightarrow H_6Si_2O_7$
Acido tri-silicico	$H_2Si_3O_7$
Forma idrata	$H_2Si_3O_7 + H_2O \rightarrow H_4Si_3O_8$

L'acido ortosilicico è un acido debole (pKa = 9,8 a T = 25°C), in forma monomerica non è tossico ed è stato dimostrato che, a differenza dell'acido polisilicico, non lega con enzimi o proteine, mentre delle forme dimeriche e trimeriche non si conosce il rischio [35].

4.1 Benefici dell'acido silicico

Il silicio è il terzo elemento traccia⁶ per abbondanza nel corpo umano: è presente nei capelli, nelle unghie, nell'epidermide, nelle ossa, nei vasi sanguigni e nel tessuto connettivo [102]. Secondo alcuni ricercatori, a differenza di altri elementi traccia che legano le proteine, il silicio esiste nel plasma principalmente come acido ortosilicico non dissociato [103] e la fonte principale di silicio nell'uomo deriva dall'assorbimento dell'acido ortosilicico (le forme polimeriche sono meno assimilabili [104]).

La silice, da cui deriva l'acido silicico, viene assunta attraverso la dieta (al giorno circa 20-50 mg) [105], si trova nei cereali integrali (avena, orzo, farina di frumento), nel riso bianco e nei pesci, ma anche nell'acqua minerale [106]; le specie di silice ingerite vengono idrolizzate per formare acido silicico, che viene assorbito nel tratto gastrointestinale per poi circolare nel plasma.

Il silicio è essenziale nei processi metabolici e ha effetti positivi sulla salute [107]: accelera il processo di mineralizzazione e calcificazione del tessuto osseo (nelle prime fasi di calcificazione della matrice ossea induce la precipitazione di idrossiapatite [22]) e stimola la formazione di collagene di tipo I. Trattamenti a base di silice sono stati studiati per migliorare la guarigione delle ferite e prevenire la formazione della ferita; la medicazione, oltre a fungere da barriera mantenendo idratata la ferita e proteggendola dalle infezioni, rilascia acido ortosilicico che regola l'espressione dei fibroblasti [102].

La carenza di silicio è collegata con problemi alla struttura delle ossa e alla produzione di collagene, per questo motivo la diminuzione di concentrazione rilevata nella popolazione più anziana può essere correlata ai disturbi degenerativi, come osteoporosi e aterosclerosi [101]. L'integrazione di silicio nella dieta potrebbe avere effetti positivi.

_

⁶ Il corpo umano è composto da elementi che possono essere divisi in quelli presenti "in abbondanza" e quelli presenti "in traccia" [162]; questi ultimi hanno concentrazioni inferiori a 1 μg/g ma sono considerati essenziali in quanto svolgono precise funzioni (stabilizzatrici, di struttura, ormonali, di cofattore enzimatico) ed è possibile prevenire o curare gli effetti indotti da carenza mediante somministrazione [163].

Capitolo 3: Confronto tra silice MCM – 41 e SBA – 15

Nel capitolo precedente è stato affrontato il comportamento della silice per quanto riguarda la degradazione ed è stato riportato come la degradazione sia influenzata da una serie di fattori tra cui quelli dovuti alle caratteristiche proprie del materiale. In questo capitolo verrà esaminato come queste caratteristiche variano da un tipo di silice all'altro concentrandosi in particolare sui due tipi di silice mesoporosa più studiati in ambito biomedico: l'SBA – 15 e la MCM – 41.

1. Introduzione

Nel 1992 il gruppo di ricerca della "Mobil Research and Development Corporation" sintetizzò il primo materiale solido mesoporoso partendo da gel di allumino-silicati usando un meccanismo di template a cristalli liquidi [108][109]; questo tipo di materiali prende il nome di M41S e sono tra i materiali mesoporosi più studiati, non solo in ambito biomedico. Appartiene a questa famiglia la struttura della silice mesoporosa MCM – 41, chiamata così proprio dal nome dei ricercatori, infatti MCM si riferisce a "Mobil Crystalline Materials" o "Mobil Composition of Matter". Oltre alla MCM – 41 rientrano tra i materiali M41S anche la MCM – 48 e la MCM – 50, che sono ottenute variando le condizioni di sintesi, cioè temperatura e rapporto molare tra tensioattivo e silicato, e differiscono tra loro per la disposizione strutturale dei pori. La MCM – 41 presenta simmetria esagonale 2D, la MCM – 48 simmetria cubica e la MCM – 50 simmetria lamellare, come riportato in Figura 31.

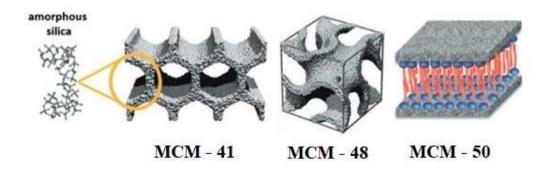


Figura 31: strutture mesoporose del materiale M41S [110]

In seguito, un gruppo di ricercatori dell'università di Santa Barbara elaborò un'altra famiglia di materiali in silice mesoporosa [111], che prende quindi il nome di SBA da "Santa Barbara Amorphous". Anche in questo gruppo sono presenti diverse strutture mesoporose, molto simili a quelle precedenti, ma con pori di dimensioni maggiori e pareti più spesse. Le più studiate sono l'SBA – 15, a simmetria esagonale 2D (molto simile all'MCM – 41), e l'SBA – 16 con una struttura a gabbia cubica (rappresentate nella Figura 32), ma esistono anche l'SBA – 11, a simmetria cubica, e l'SBA – 12, a simmetria esagonale 2D, sintetizzate utilizzando altri tensioattivi, come ad esempio l'ossido di etilene neutro.

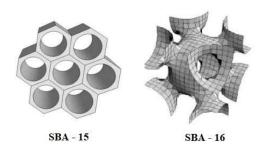


Figura 32: strutture mesoporose SBA-15 e SBA-16

Le due tipologie di strutture mesoporosa più adoperate e studiate in ambito biomedico, ma anche quelle più adatte al rilascio di farmaci, sono la MCM – 41 e la SBA – 15. Per questo motivo la presente tesi verterà su questi due tipi di silice. Ad una prima analisi queste due tipologie appaiono molto simili tra loro: il tensioattivo forma micelle dapprima sferiche che poi si trasformano in canali (Figura 33), l'impacchettamento e la condensazione della silice avviene seguendo una geometria esagonale 2D. Le principali differenze si riscontrano nei parametri di sintesi e nell'agente di template utilizzato e, di conseguenza, nelle interazioni che si creano con la matrice di silice. Si è deciso quindi di confrontare i due materiali sugli aspetti più rilevanti.

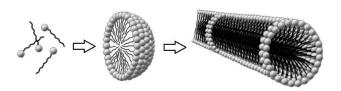


Figura 33: formazione delle micelle [112]

L'MCM – 41 grazie all'ampia superficie e la distribuzione dimensionale dei pori omogenea, viene utilizzata per il *drug delivery* e *gene delivery* (trasporto di farmaco e trasporto di materiale genetico), mentre l'SBA – 15, avendo pori più grandi, viene impiegata per il trasporto di proteine e di farmaci ad alto peso molecolare. Inoltre, le dimensioni maggiori delle particelle in SBA – 15 fanno sì che l'assorbimento cellulare sia ridotto.

Per quanto riguarda la sperimentazione, è preferibile utilizzare il primo tipo di silice per gli studi *in vivo*, per via della dimensione ridotta delle particelle che si possono ottenere e della degradazione più veloce, e il secondo tipo per gli studi *in vitro*, in virtù dei pori più grandi e della facilità di osservarne l'evoluzione [93].

2. Sintesi del materiale

Gli elementi comuni nelle procedure di sintesi di questi materiali sono: un precursore di silice, che può essere per esempio l'ortosilicato tetraetile TEOS (Si(OC₂H₅)₄) o il silicato di sodio (Na₂SiO₃), un agente di template e una soluzione acquosa [25]. Il procedimento di formazione del materiale è schematizzato in Figura 34.

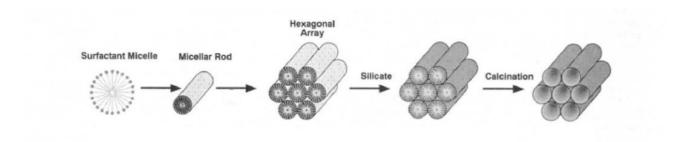


Figura 34: processo di formazione della struttura a simmetria esagonale [113]

Nella Tabella 7 è riportato un riassunto delle differenze nel processo di sintesi dei due materiali.

2.1 MCM - 41

Si prepara una soluzione di acqua e una base, che può essere l'ammoniaca o l'idrossido di sodio, in modo che il pH sia superiore a 10, e si tiene in agitazione per tutto il procedimento; viene aggiunto il tensioattivo cationico (CTAB e CTAC i più diffusi) e in seguito il precursore di silice, mantenendo sempre l'agitazione [38]. A volte nella soluzione acquosa è presente anche

l'etanolo ⁷. La soluzione viene lasciata in agitazione per qualche ora; la temperatura è variabile, si può procedere a temperatura ambiente oppure si possono usare temperature più alte. Può seguire poi un tempo di *aging* in stufa; aumentare il tempo di *aging* della silice permette, per esempio nel caso di particelle, di ottenere forme più regolari e distribuzione dimensionale più stretta [114], inoltre, anche la porosità diventa più omogenea, e crescono area superficiale e volume poroso [115]. La rimozione del tensioattivo avviene come spiegato precedentemente, per esempio tramite calcinazione. In è Figura 35 si può vedere come interagiscono tensioattivo e silice e la struttura del materiale ottenuto.

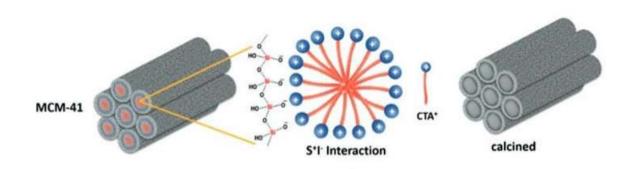


Figura 35: silice mesoporosa del tipo MCM – 41 [61]

2.2 SBA - 15

Un polimero triblocco (PEO – PPO – PEO) posto in soluzione acquosa tenuta in agitazione, a cui è stato aggiunto un acido (per esempio acido cloridrico o acido solforico) per abbassare il pH al di sotto dell'IEP della silice, forma micelle che si organizzano in canali cilindrici; si introduce il precursore di silice e si lascia ancora in agitazione per qualche ora [116]. La sintesi deve essere condotta ad una temperatura superiore ai 25°C in modo che il copolimero abbia proprietà anfifiliche e possa assemblarsi in micelle [117]; solitamente si usano temperature comprese tra 30 e 40°C. Inoltre, il materiale subisce un trattamento termico: viene lasciato a "invecchiare" per un giorno o più a temperature maggiori di quelle della sintesi (60 – 130°C),

_

⁷ A causa dell'immiscibilità di acqua e alcossidi di silicio si introduce un alcol che si comporta da agente omogeneizzante, ma non è necessario, perché con la reazione di idrolisi iniziale si ottiene una quantità di alcol sufficiente ad omogeneizzare le fasi inizialmente separate del sistema [164]. L'alcol non agisce solo da solvente, ma può partecipare alle reazioni di sintesi tramite alcolisi e condensazione alcolica [56].

le diverse temperature modificano le caratteristiche finali del materiale [118], come verrà spiegato in seguito. Anche in questo caso si conclude la procedura con la rimozione dell'agente direzionante. In Figura 36 sono rappresentate le interazioni tra copolimero e silice e il materiale finale.

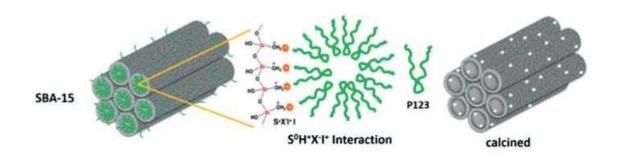


Figura 36: silice mesoporosa del tipo SBA – 15 [61]

Tabella 7: riassunto delle differenze del processo di sintesi dei due materiali

Agente di template

Tensioattivo cationici, i più comuni sono i sali di ammonio quaternari, in particolate CTAB (bromuro di cetiltrimetilammonio) e CTAC (cloruro di cetiltrimetilammonio).

MCM - 41

Polimeri a tre blocchi, in particolare quelli della classe dei polimeri biomedici conosciuti come Pluronic, come il P123 (EO₂₀PO₇₀EO₂₀).

SBA - 15

pH della soluzione

Condizioni basiche (pH > 10): alla soluzione di acqua e tensioattivo si aggiunge una base, come l'ammoniaca (NH₃) o l'idrossido di sodio (NaOH).

Condizioni acide (pH < 2): si aggiungono acidi al polimero in soluzione acquosa, come l'acido cloridrico (HCl).

Interazioni silice/tensioattivo

Il precursore inorganico si trova molto al di sopra del suo IEP, per cui presenta carica negativa (I⁻); il tensioattivo è cationico e offre una carica positiva (S⁺). Si crea un'interazione elettrostatica diretta tra le due cariche: S⁺ I⁻



Il precursore di silice si presenta in forma protonata (pH < IEP) con carica positiva (I^+), è necessaria la presenza di un contro-ione (per esempio il cloro Cl^-) per creare interazioni elettrostatiche dirette tra cariche: (S^0H^+)(X^-I^+)

3. Caratterizzazione

Struttura mesoporosa

In entrambi i casi si ottiene una mesostruttura ordinata a simmetria esagonale 2D, come è possibile apprezzare dallo spettro di diffrazione a raggi X, sono riportati esempi in Figura 37.

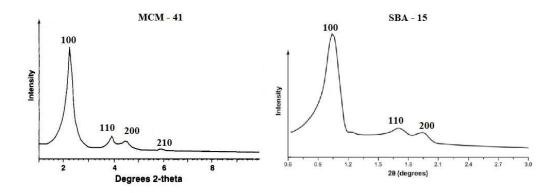


Figura 37: esempi di spettri XRD dei due materiali [109][111]

Si riconoscono facilmente i picchi (100), (110) e (200); il primo indica che il campione è mesoporoso, mentre la presenza di questi tre picchi insieme specifica una disposizione ben ordinata di pori a simmetria esagonale [91].

Le curve di assorbimento di azoto confermano per entrambi i materiali la presenza di mesoporosità: le curve sono isoterme del IV tipo, tipiche dei solidi mesoporosi, con ciclo di isteresi associato al fenomeno di condensazione capillare [119]. Dalle curve si possono calcolare l'area superficiale, il volume poroso e il diametro dei pori; valori di riferimento indicativi sono mostrati in Tabella 8.

Tabella 8: valori di riferimento per le due tipologie di materiale

	MCM – 41	SBA – 15
Area superficiale (m ² /g)	Può raggiungere valori > 1000	400 – 900
Volume poroso (cm ³ /g)	Può raggiungere valori > 1	Può raggiungere valori > 1
Diametro pori (nm)	2 – 10	5 – 30
Spessore pareti (nm)	0,8 – 1,3	3 – 7

Microporosità

Una differenza riscontrata tra le due tipologie di materiale è la presenza di microporosità nelle pareti amorfe del SBA – 15. Per microporosità, secondo la terminologia IUPAC, si intendono pori di dimensioni inferiore a 2 nm [120]. Si forma una corona microporosa sulla superficie interna dei pori a causa delle catene di PEO che rimangono imprigionate nella silice, come è illustrato in Figura 38; quando la calcinazione elimina la parte organica rimangono delle cavità negli spazi prima occupati dalle catene [117].

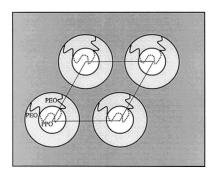


Figura 38: corona microporosa sulle superfici dei pori del SBA – 15 [117]

Il P123 è un polimero anfifilico che forma micelle in acqua, ma le catene di PEO protrudono verso l'esterno e penetrano nel framework di silice creando delle interconnessioni tra i mesopori. Nella Figura 39 è schematizzata una sezione del materiale in cui sono visibili i mesopori primari dovuti alle micelle cilindriche e i micropori generati dalle catene di PEO.

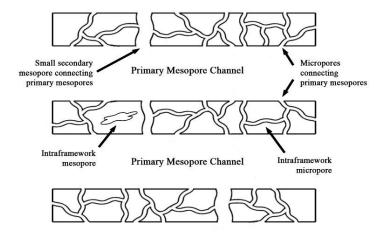


Figura 39: schema dei canali mesoporosi e microporosi presenti nel materiale SBA-15 [112]

Il volume poroso del materiale SBA – 15 si calcola come la somma dei due volumi mesoporoso e microporoso ($Vp = Vmes + V\mu$); il volume microporoso non è trascurabile perché in certi casi costituisce il 50% del volume poroso totale [121].

La microporosità è però controllabile: aumentando la temperatura il PEO diventa più idrofobico e le catene si ritirano all'interno del *core* idrofobico di PPO, generando micelle più grandi e di conseguenza pori di dimensioni maggiori, come si vede in Figura 40, in questo caso si avrà microporosità molto ridotta o addirittura assente.

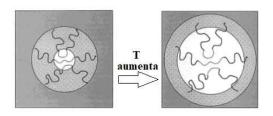


Figura 40: l'aumento di temperatura causa espansione delle micelle e riduzione della microporosità [117]

Confrontando per esempio tre materiali sintetizzati seguendo la stessa procedura ma variando la temperatura di *aging* (60°C/100°C/130°C) si ottengono valori diversi [121]. In particolare, aumentando la temperatura, il volume microporoso diminuisce fino a scomparire, mentre volume mesoporoso e volume poroso aumentano (Tabella 9).

Tabella 9: variazioni di volume microporoso dovute a diverse temperature di aging [121]

	Volume poroso	Volume mesoporoso	Volume microporoso
	(cm ³ /g)	(cm ³ /g)	(cm ³ /g)
SBA – 15 (60°C)	0,76	0,34	0,42
SBA – 15 (100°C)	1,19	0,79	0,40
SBA – 15 (130°C)	1,23	1,23	/

Bioattività

Un'altra proprietà che si differenzia tra i due materiali è la bioattività: infatti è più probabile, nonché più veloce, la precipitazione di apatite su SBA – 15 rispetto a MCM-41 in condizioni che simulano quelle fisiologiche [122].

Confrontando SBA – 15 e MCM – 41 a seguito di immersione in SBF a 37°C, dopo 30 giorni sulle pareti porose dell'SBA – 15 si osserva la formazione di uno strato di apatite costituito da particelle cristalline imbrigliate in una matrice amorfa. Tramite analisi EDS e immagini TEM è possibile osservare che nella parte amorfa si trovano gli atomi di silicio, mentre nella parte cristallina si trovano calcio e fosforo (formula dell'idrossiapatite: Ca₅(PO₄)₃(OH)). Sulle pareti dell'MCM – 41 questo strato non si forma, neanche dopo 60 giorni di immersione [122].

Il fattore cruciale per la formazione dell'apatite è la presenza dei silanoli sulla superficie delle pareti porose, che si comportano da centri di nucleazione: gli ioni Ca²⁺ e PO₄ ³⁻ migrano verso la superficie e formano uno strato amorfo ricco di CaO e P₂O₅, in cui poi si formano aggregati cristallini aghiformi di apatite [122].

La differenza di comportamento tra SBA – 15 e MCM – 41 è dovuta alle diverse concentrazioni di silanoli in superficie: 12,71·10⁻³mmol/m² della prima contro i 2,16·10⁻³mmol/m² della seconda [122]. Bisogna ricordare anche che i pori dell'SBA – 15 sono più grandi e più accessibili, perciò la diffusione degli ioni vi è facilitata.

Il fatto che non sia stata rilevata la formazione dello strato di apatite sull'MCM – 41 presa in esame nello studio di Vallet-Regí qui citato [122] non implica per forza che questo fenomeno sia impossibile. Nello studio non è specificata la procedura di sintesi, né se il materiale sia stato calcinato; si può ipotizzare che una silice con minor grado di condensazione, seppur in forma di MCM – 41, potrebbe essere bioattiva. Infine, è possibile funzionalizzare la silice per migliorarne la bioattività [122].

4. Dissoluzione

Nonostante le somiglianze dei due materiali, le differenze nello spessore delle pareti e nel diametro dei pori, due fattori cruciali nel processo di dissoluzione, fanno sì che il processo segua percorsi diversi. In aggiunta, bisogna considerare la presenza dei micropori nell'SBA – 15, che influenzano in maniera più o meno forte il processo.

La prima differenza può essere spiegata dallo spessore delle pareti dei canali mesoporosi. Infatti, la solubilità di un solido in acqua dipende in buona misura dal raggio di curvatura r: minore è il valore assoluto del raggio maggiore è l'effetto sulla solubilità [66].

Si considerino le seguenti relazioni:

- Superfici convesse $\rightarrow r > 0$
- Superfici concave $\rightarrow r < 0$
- Superfici piane $\rightarrow r = \infty$

La sezione dei canali mesoporosi dei due materiali trattati può essere schematizzata come in Figura 41, dove t è lo spessore delle pareti e r il raggio di curvatura del bordo:

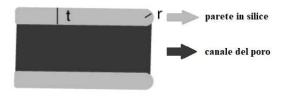


Figura 41: rappresentazione in sezione del bordo di un canale [66]

È facile intuire che se r può essere calcolato come t/2 e la misura dello spessore delle pareti t è più grande, la solubilità sarà più bassa. Poiché lo spessore delle pareti del SBA – 15 è superiore a quello del MCM – 41 si può concludere che il primo materiale sia più stabile [66].

Una strategia per migliorare la stabilità dell'MCM – 41 è infatti quella di renderne le pareti più spesse, per esempio allungando il tempo di riposo ad alte temperature. Nello studio di Mokaya [123] due campioni di silice MCM – 41 dopo la sintesi vengono lasciati in autoclave a 150°C per 48h e per 96h. Nel secondo caso si ottengono pori di dimensioni maggiori e pareti più spesse, perché più unità di silicato riescono a diffondere e aumentare lo spessore delle pareti, mentre le molecole di tensioattivo che si aggiungono fanno crescere le micelle. La stabilità valutata in acqua dell'MCM – 41 così ottenuta aumenta notevolmente. Indubbiamente contribuisce anche il fatto che le pareti più spesse e i pori più grandi implicano aree superficiali e volumi porosi minori, ma anche gradi di condensazione della silice più alti.

Un fenomeno che si verifica nell'MCM – 41 a seguito della dissoluzione è la rideposizione delle specie dissolte di silice, che porta alla deformazione del reticolo poroso (Figura 42). Le caratterizzazioni effettuate tramite SAXS (*Small-Angle X-ray Scattering*) mostrano una riduzione dei picchi, indicativa della perdita della simmetria esagonale, ma l'effetto è rilevabile anche dalla distribuzione dimensionale dei pori, la quale presenta un andamento bimodale con un picco per i pori che si sono ristretti e uno per quelli che si sono espansi [124].

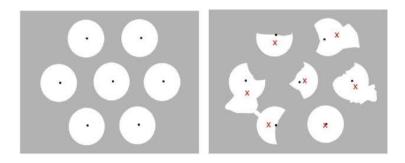


Figura 42: deformazione del reticolo esagonale della silice del tipo MCM – 41 in seguito a immersione in acqua a 60°C [124]

Lo stesso non accade per l'SBA – 15, in cui la microporosità permette alle molecole di acqua di penetrare nelle pareti e diffondere; inoltre, le pareti dei pori presentano una certa rugosità (il raggio di curvatura non è infinito) con gole e creste. La dissoluzione comincia da queste ultime, perché la solubilità è maggiore per le superfici convesse [83], e la silice dissolta si può ridepositare, se non adeguatamente allontanata, nelle gole; questo processo porta ad una levigatura della superficie, così come si può osservare meglio nella Figura 43 [66]. Congiuntamente a questo fenomeno si verifica una diminuzione dello spessore delle pareti e un allargamento del diametro dei pori.

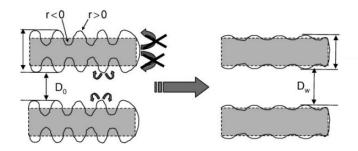


Figura 43: dissoluzione delle creste e deposizione nelle gole [66]

La stabilità dell'SBA – 15 può essere controllata non solo tramite il trattamento termico che il materiale subisce, ma anche grazie al controllo della microporosità. Come accennato, temperature diverse utilizzate nel processo di invecchiamento hanno influenza sulle caratteristiche finali del materiale, come dimostrato da Galarneau et al. [118] e come riportato nella Tabella 10 e nella Figura 44.

Tabella 10: caratteristiche dell'SBA - 15 trattata a temperature diverse [118]

	Diametro pori (nm)	Spessore pareti (nm)	Microporosità
SBA – 15 (60°C)	5	5	Corona microporosa senza connessioni tra canali
SBA – 15 (100°C)	7	4	Corona microporosa e connessioni tra canali mesoporosi di dimensione compresa tra 1,5 e 4 nm
SBA – 15 (130°C)	10	2	Assenza della corona microporosa; connessioni tra canali (1,5 – 5 nm)

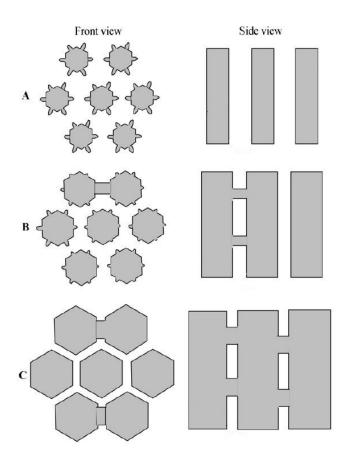


Figura 44: SBA-15 che ha subito trattamenti termici a temperature diverse (A = 60° C; B = 100° C; C = 130° C) [118]

Valutando la stabilità ponendo 1 g di polvere in 100 ml di acqua a 25°C e in agitazione magnetica per 4h si conclude che [66]:

- Nell'SBA 15 (60°C) si perde subito la microporosità, a seguito del meccanismo spiegato prima e osservabile nel disegno della figura 30. Il diametro dei pori cresce, lo spessore delle pareti diminuisce così come l'area superficiale.
- L'SBA 15 (130°C) è molto stabile, la dissoluzione avviene dalle connessioni tra i
 mesopori (dove si trovano raggi di curvatura positivi), si misurano variazioni
 trascurabili di diametro dei pori, di spessore delle pareti o di volume poroso e un lieve
 diminuzione (~8%) di area superficiale.
- L'SBA 15 (100°C) ha un comportamento intermedio: le pareti si levigano perdendo la microporosità, il diametro si allarga e lo spessore si riduce, ma le connessioni tra pareti non si modificano, probabilmente a causa dello spessore delle pareti maggiore.

Capitolo 4: Influenza dell'incorporazione di specie

inorganiche ed organiche

Nei capitoli precedenti si è visto come la degradazione della silice mesoporosa sia dipendente da vari fattori: le procedure di sintesi, le caratteristiche delle particelle e le condizioni ambientali, come vengono effettuate le prove ma anche come viene svolta la valutazione della degradazione.

I *carrier* inorganici affrontano sfide maggiori rispetto a quelli organici nel processo di traslazione clinica, anche a causa del problema di degradazione e *clearance* del materiale [30]. Il controllo della degradabilità della silice fornisce un valido aiuto per ampliarne il campo di applicazione.

1. Introduzione

La degradazione del *carrier* è essenziale affinché un sistema possa essere accettato come *Drug Delivery System*. Spesso il framework puramente inorganico, condensato e inerte della OMS è difficilmente degradato in ambiente fisiologico [25]. Di conseguenza sono state pensate delle strategie per migliorare questo aspetto.

La OMS è facile da funzionalizzare grazie alla presenza dei silanoli in superficie, alla stabilità chimica e meccanica e all'ampio rapporto superficie/volume [87].

Tra i vari approcci che sono stati suggeriti ci sono:

- L'incorporazione non covalente di metalli, come lo zirconio, il calcio e il manganese; è stata proposta anche l'incorporazione di ioni ferro (Fe³⁺) [125] nella struttura di silice, ma la degradazione del materiale avviene sopra gli 80°C, temperatura relativamente elevata che ne limita l'applicazione; si preferisce che il *carrier* degradi ad una temperatura più fisiologica.

- L'inclusione di componenti, come il calcio fosfato e l'idrossiapatite, che producono sistemi "pH – responsive", in grado di reagire alla variazione di pH per stimolare la degradazione.
- La formazione di **materiali ibridi organici/inorganici** per migliorare le proprietà del materiale, grazie all'aggiunta di organosilani che forniscono gruppi funzionali con cui può essere funzionalizzata la superficie, interna ed esterna, della OMS.
- Il **rivestimento con polimeri biocompatibili** che agisce da protezione per la particella, sia per quanto riguarda la degradazione sia per la cattura da parte di macrofagi, oppure per creare un rivestimento tampone che controlli il pH dell'ambiente circostante.
- L'introduzione di legami scindibili, come ponti disolfuro o molecole che rispondo a
 certi stimoli, che provocano la rottura della matrice in silice del *carrier*, promuovendo
 la degradazione e il rilascio dell'agente terapeutico.

La modifica della composizione chimica della OMS non ha esclusivamente lo scopo di promuovere la degradazione, talvolta è necessario l'opposto, cioè stabilizzare la silice. Infatti, se la saturazione di specie dissolte venisse raggiunta, la silice solubilizzata potrebbe ricondensare creando piccoli depositi e accumuli: oligomeri di silice prodotti dalla dissoluzione del *carrier* in un posto potrebbero ricondensare in un altro formando particelle di forma ignota e potenzialmente più tossiche [62].

Oltretutto, la silice degrada per idrolisi in ambiente alcalino [81], ma per alcune applicazioni occorre che il *carrier* degradi in ambiente acido, come per esempio all'interno della cellula o nello stomaco, dove i pH sono più bassi [126]. Anche il microambiente tumorale è diverso dall'ambiente fisiologico: è caratterizzato da pH acido e riducente, può essere mimato utilizzando il glutatione (GSH, *Glutathione*), un tripeptide costituito da cisteina, glicina e glutammato, con proprietà antiossidanti che permette di mantenere l'ambiente redox [46]. Il GSH è presente nel plasma a concentrazioni basse, circa $1-2~\mu\text{M}$, mentre nelle cellule tumorali arriva a 2-10~mM [127].

In conclusione, vista l'importanza della modalità e della cinetica di degradazione della OMS, il presente capitolo sarà dedicato ad analizzare nel dettaglio le strategie volte ad influenzare quest'aspetto.

2. Incorporazione di specie inorganiche

La presenza di elementi diversi dalla silice all'interno del network causa una minore condensazione del reticolo e di conseguenza una degradazione più veloce. Le inclusioni possono agire da "difetti", cioè siti preferenziali in cui la degradazione trova un punto di partenza, oppure da componente stabilizzante e rafforzare la stabilità della silice. La degradazione della OMS avviene sia per dissoluzione accelerata (o rallentata) dalle inclusioni, sia per frammentazione in piccoli detriti che vanno incontro a dissoluzione o vengono direttamente eliminati se di dimensione inferiore ai 5 nm [26].

2.1 Inclusione di metalli

Una delle strategie possibili è il dopaggio con ioni metallici (MI – D) che consiste nell'inserimento di ioni metallici all'interno della struttura in silice, cambiando la natura biologica del materiale, e in particolare il suo comportamento alla degradazione [128].

2.1.1 Calcio

Partendo dal presupposto che i vetri bioattivi in cui era stato aggiunto il calcio avevano mostrato degradazioni più rapide, il gruppo di ricerca di Li et al. [90] ha provato a modificare la composizione della silice mesoporosa aggiungendo dell'ossido di calcio per controllarne la degradabilità.

La sintesi delle particelle dopate, definite Ca – MSN, segue una procedura semplice: il CTAB viene dissolto in una soluzione di acqua e NaOH mantenuta in agitazione a 80°C, dopo si aggiunge il TEOS, il Ca(NO₃)₂ e il fosfato di trietile (TEP); l'agitazione continua per altre due ore. Il TEP aggiunto alla sintesi ha lo scopo di aumetare l'ordine mesostrutturale e il diametro dei pori, ma il fosfato non viene incorporato nella matrice di silice. La rimozione del tensioattivo avviene per calcinazione a 600°C per 6 h. Per confronto, si preparano anche MSN tradizionali allo stesso modo ma senza l'aggiunta di Ca(NO₃)₂ e TEP.

L'impacchettamento micellare cambia a causa della presenza del Ca(NO₃)₂, perciò la forma delle particelle passa da sferica (per le MSN di riferimento) ad ellissoidale, con i canali disposti lungo l'asse maggiore. La dimensione delle particelle, invece, non cambia (~ 100 nm) così come lo spettro XRD, che conferma la simmetria esagonale 2D per entrambi i materiali. L'area

superficiale e il volume poroso diminuiscono per le Ca – MSN (si passa da 978 a 482 m^2/g e da 0,80 a 0,70 cm^3/g), mentre il diametro dei pori cresce (da 2,47 a 2,62 nm).

Le prove di degradazione effettuate in acqua a 37°C (1 mg/ml) mostrano che il tasso di erosione delle Ca – MSN è elevato durante la prima settimana e poi decresce. In generale, comunque, la dissoluzione risulta favorita dall'aggiunta del calcio: dopo due settimane è stato rilasciato il 22% del silicio iniziale (e il 67% di calcio) dalle Ca – MSN, mentre dopo quattro settimane le MSN perdono solo il 7% del silicio. Le curve sono osservabili in Figura 45. A causa della degradazione il diametro dei pori aumenta in entrambe le particelle, portando nelle Ca – MSN alla parziale distruzione dei canali.

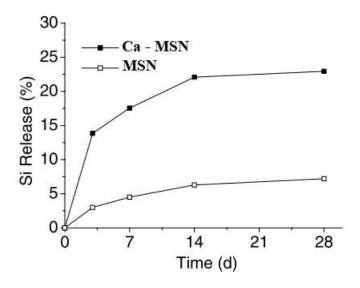


Figura 45: rilascio percentuale di silicio a seguito di immersione in acqua [90]

La dissoluzione del network avviene più velocemente nelle Ca – MSN rispetto alle MSN perché sono presenti più siti "attivi" che possono subire l'attacco nucleofilo da parte degli OH in soluzione; si tratta di atomi di ossigeno non legati e meno connessi alla struttura, che vengono esposti per esempio quando il calcio si allontana.

2.1.2 Manganese

Il manganese (Mn) è uno degli elementi essenziali per il corpo, coinvolto nella sintesi di enzimi, proteine e vitamine e nel metabolismo di glucosio e lipidi; viene facilmente assorbito ed escreto

e non mostra tossicità; inoltre, grazie al paramagnetismo, può essere usato come agente di contrasto in risonanza magnetica [129]. Il legame Mn – O può essere scisso in ambiente acido e in ambiente riducente (schema illustrato in Figura 46), come è per esempio il microambiente tumorale. Durante la scissione vengono rilasciati ioni Mn²⁺ e si creano dei difetti nella struttura della particella. Per questo motivo l'introduzione del legame Mn – O nel network della silice cambia il comportamento di degradazione.

Un esempio dell'applicazione di questo meccanismo si trova nello studio di L. Yu et al. [128] in cui vengono preparate particelle di silice mesoporosa cave (HMSN) successivamente dopate con il manganese (Mn – HMSN). La degradazione è testata in SBF a 37°C in agitazione. Per valutare l'influenza del pH la prova viene effettuata in ambiente acido (pH = 5) e neutro (pH = 7,4), mentre per valutare il comportamento in ambiente riducente si aggiunge del GSH (5-10 mM).

La sintesi è effettuata in due step: prima si preparano le MSN dissolvendo il CTAC e il TEA in acqua a 80°C per 20 min, si aggiunge il TEOS e si mescola ancora per 4 ore; la rimozione del tensioattivo è eseguita in una soluzione di NaCl e metanolo per 12 h. Successivamente viene realizzato il doping con il manganese disperdendo le MSN in acqua e aggiungendo una soluzione di MnSO4 e malato di sodio. Infine, le particelle subiscono un trattamento termico a 180°C per 12 h che serve sia per completare il doping sia per rendere le particelle cave. Si ottengono particelle sferiche cave di 80 nm di diametro con struttura mesoporosa ben definita, area superficiale di 222 m²/g, volume poroso di 0,53 cm³/g e diametro dei pori di 3,8nm. Il legame covalente del manganese, distribuito uniformemente nella struttura, con la silice è confermato dallo spettro XRD.

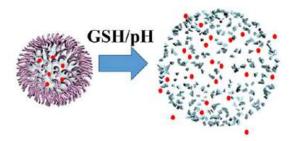


Figura 46: l'ambiente riducente o il pH acido causano la degradazione della Mn – HMSN [128]

Come anticipato, il legame Mn – O integrato nel network in ambiente acido si rompe, portando al rilascio di Mn²⁺. In SBF a pH = 5 la mesostruttura della Mn – HMSN è quasi completamente degradata in due giorni, mentre rimane intatta a pH = 7,4. Poiché la degradazione è provocata dal rilascio del manganese, viene misurata la quantità di Mn rilasciato (Figura 47). Inoltre, viene misurato anche il silicio, rilasciato a causa dalla degradazione della particella. Confrontando i due pH si nota chiaramente l'influenza dell'ambiente acido sulla degradazione: a pH acido sia la quantità di manganese rilasciato sia quella di silicio sono significativamente maggiori.

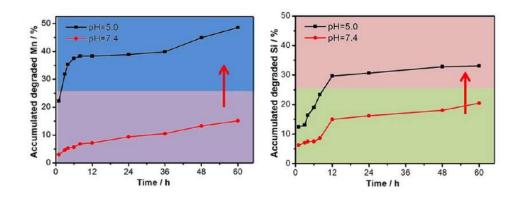


Figura 47: rilascio percentuale di Mn e Si in SBF a pH diversi [128]

Le stesse misurazioni sono ripetute a pH neutro ma a concentrazione crescente di GSH, per valutare l'influenza dell'ambiente riducente sulla degradazione: concentrazioni maggiori conducono a rilasci maggiori, come si vede in Figura 48, e di conseguenza ad una degradazione più veloce.

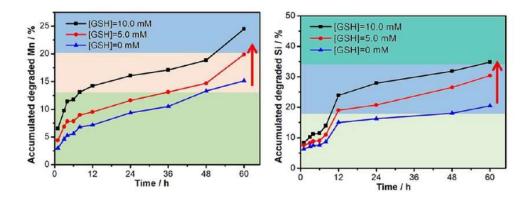


Figura 48: rilascio percentuale di Mn e Si in SBF a concentrazioni diverse in GSH [128]

Unendo le due condizioni più favorevoli alla degradazione, cioè pH = 5 e ambiente riducente, il rilascio e la degradazione accelerano ulteriormente.

2.1.3 Zirconio

L'inclusione dello zirconio porta alla formazione di un altro ossido, la zirconia ZrO₂, che si mescola all'ossido di silice. La zirconia è un materiale ceramico inerte ampiamente utilizzato in ambito biomedico, in particolare per la realizzazione di componenti di protesi, grazie alla biocompatibilità e alla stabilità in ambiente fisiologico [130]. A pH neutro la zirconia è tre/quattro ordini di grandezza meno solubile della silice [62]; incorporare la zirconia all'interno della matrice di silice causa un aumento della stabilità del materiale, perché le specie di silice dissolte si ricondensano sui centri di zirconio dieci volte più velocemente che sui centri di silicio [95]. La solubilità della silice in soluzioni in cui sono presenti particelle di silice – zirconia è minore rispetto a quella di una soluzione in cui le particelle sono di silice pura [62].

In casi come questi, si parla di materiali mesoporosi "di ossidi misti" perché sono presenti due ossidi, la silice e la zirconia; si può usare anche l'allumina, ma la stabilità in ambiente acquoso migliora in misura minore [95].

Film in silice/zirconia sono preparati per dip – coating su substrati di silicio, scaldando a 60° C per 8 – 10 ore e poi altre 24 h a 130° C come trattamento termico. La rimozione del tensioattivo avviene per calcinazione. La zirconia aggiunta alla soluzione sostituisce il 5 o il 10% molare di TEOS, i rapporti molari sono riportati in Tabella 11:

Tabella 11: rapporti molari per la fabbricazione di silice dopata con zirconia [62], [95]

	TEOS	ZrCl ₄	EtOH	H ₂ O	F127
SiO ₂ – Zr 5%	0,95	0,05	40	10	0,005
SiO ₂ – Zr 10%	0,9	0,1	40	10	0,005

Rispetto ai film di silice preparati in maniera simile (con l'eccezione del tetracloruro di zirconio) hanno porosità più alta e diametro dei pori più grande; nonostante ciò, dimostrano maggiore stabilità in ambiente acquoso. Immergendo 2 cm² di film in 8 ml di PBS (a pH neutro) a 37°C, la costante iniziale di dissoluzione misurata per la SiO₂ – Zr 5% risulta essere sei volte

più piccola rispetto a quella misurata per la silice pura, quella della SiO₂ – Zr 10% addirittura cento volte più piccola [95].

Nanoparticelle di silice/zirconia sono prodotte mediante aerosol: la soluzione di sintesi, con gli stessi rapporti molari elencati in Tabella 11, viene agitata per un'ora a temperatura ambiente e poi nebulizzata in una camera di riscaldamento a 350°C. Si ottengono particelle di 300 nm, ulteriormente stabilizzate 24 h a 70°C e poi trattate termicamente (rampa di temperatura da 25 a 200°C, 5 h a 200°C, rampa fino a 550°C e 16 h a 550°C). La stabilità è testata sempre in PBS ad una concentrazione di particelle in soluzione di 1 mg/ml.

Come detto, i centri di zirconio agiscono da centri di ricondensazione per l'acido silicico; a mano a mano che la silice si dissolve vengono esposti più atomi di zirconio, per cui si riesce a mantenere la concentrazione di silice dissolta al di sotto del limite di ricondensazione [62]. Maggiore è la quantità di zirconio che sostituisce i centri di silicio, sia che si tratti di nanoparticelle sia di film, e maggiore è l'effetto di stabilizzazione [62], [95].

2.2 Inclusione di specie per degradazione *pH – responsive*

Una strategia per ridurre la potenziale tossicità dei sistemi di *drug delivery*, per quanto riguarda gli effetti collaterali del farmaco, è il rilascio stimolato [30] perché il farmaco viene rilasciato solo nel sito di interesse, arriva in quantità maggiore e non danneggia altri tessuti. Tra i vari sistemi di *drug delivery* che rispondono a stimoli ci sono quelli *pH – responsive*, in cui la variazione di pH causa la degradazione della particella e il rilascio del suo contenuto. A differenza della OMS pura, che in ambiente acido non degrada, la modifica della composizione della silice, realizzata come nei due esempi che seguono, garantisce la stabilità in ambiente neutro, per esempio quando le particelle si trovano nel flusso sanguigno, e incentiva la degradazione in ambiente acido, quello che caratterizza i tessuti tumorali.

2.2.1 Idrossiapatite

Il gruppo di ricerca di Hao et al. [131] ha realizzato delle particelle di silice ibride contenenti idrossiapatite (HAP, *Hydroxyapatite*) che aiuta non solo a promuovere la degradazione, ma

anche ad aumentare la quantità di farmaco che può essere caricato e a migliorare l'efficienza di rilascio.

Sintesi: il CTAB viene dissolto in acqua e NaOH in agitazione, si aggiunge Na₂HPO₄, che fornisce gli ioni PO₄³⁻, e si continua l'agitazione a 70°C; dopo mezz'ora si aggiunge il TEOS e in seguito il CaCl₂, fonte di ioni Ca²⁺; la temperatura di 70°C viene mantenuta ancora per 4 ore. Per l'estrazione del tensioattivo il materiale viene calcinato 2 h a 400°C. Il rapporto molare tra calcio e silicio è di 1:3.

Le MSN – HAP, così ottenute, hanno forma sferica (80-90 nm) ma struttura mesoporosa meno ordinata rispetto alle tradizionali, con tratti di pareti continue e pori più evidenti. L'area superficiale è minore rispetto alle MSN tradizionali ($\sim 543 \text{ m}^2/\text{g}$ contro $\sim 1500 \text{ m}^2/\text{g}$) e anche la distribuzione dimensionale dei pori conferma una struttura complessa in cui sono presenti pori compresi tra 2 e 16 nm. Nello spettro XRD è visibile il picco corrispondente all'idrossiapatite e l'analisi FTIR dimostra l'esistenza del legame Si – O – Ca. Gli ioni calcio si inseriscono nel reticolo della silice producendo gruppi di legame Si – O – Ca – O – Si.

La degradazione viene valutata immergendo le particelle (2 mg/ml) a 37°C in una soluzione tampone a pH acido (pH = 5), dove per le MSN tradizionali non ci si aspetta degradazione. Dopo 4 h sono visibili dalle immagini TEM detriti sparsi, dopo 12 h le particelle MSN – HAP sono distrutte in frammenti di 20 nm. Il meccanismo è mostrato in Figura 49.

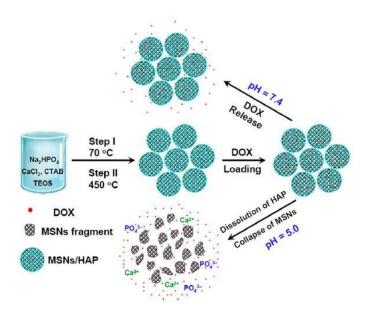


Figura 49: schema della procedura di preparazione e del meccanismo di degradazione delle MSN – HAP [131]

La rottura delle particelle è causata dal rilascio degli ioni calcio, che dopo 8 h a pH = 5 sono quasi completamente rimossi dalla struttura (Figura 50). La rimozione completa dell'HAP, grazie alla facilità di dissoluzione in ambiente acido [132] causa il collasso della struttura e la distruzione della particella.

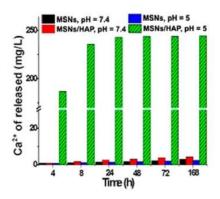


Figura 50: rilascio di calcio dalle MSN - HAP in funzione del tempo e del pH [131]

2.2.2 Calcio - Fosfato

Il rilascio del farmaco in ambiente neutro delle MSN – HAP progettate da Hao [131] non è nullo, e potrebbe comportare la degradazione delle particelle; per questo motivo He et al. [133] hanno proposto un sistema ibrido simile pH – responsive, ma con l'incorporazione di calcio – fosfato (CAP) nel framework di silice.

Sintesi: si prepara una soluzione di acqua, ammoniaca ed etanolo a cui si aggiungono due precursori di silice (C₁₈TMS, n-*octadecyltrimethoxysilane*, e TEOS), Na₂HPO₄ e CaCl₂; la reazione procede 6 ore a 30°C e poi il materiale viene calcinato a 550°C per altre 6 ore.

Le MSN – CAP sono sferiche (~ 50 nm) e hanno una distribuzione dimensionale dei pori bimodale, con un picco a 3,44 e uno a 24,33 nm; l'area superficiale misurata è più piccola rispetto alle MSN tradizionali (378,96 m²/g), ma il volume poroso è molto ampio (1,27 cm³/g). Anche in questo caso il calcio sostituisce alcuni atomi di silicio, per cui si formano legami Si – O – Ca all'interno del network di silice.

La degradazione viene valutata tramite TEM in PBS a pH = 4,5: dopo 4 h le particelle cominciano a essere erose, perdono la forma sferica e cominciano a rompersi; dopo 8h si ritrovano solo frammenti nanoscopici, che dopo 24h sono quasi completamente dissolti; il meccanismo è illustrato in Figura 51.

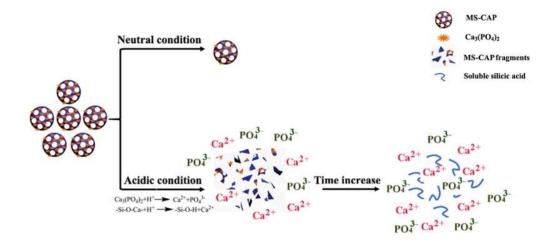


Figura 51: meccanismo di degradazione delle MSN - CAP [133]

Un secondo metodo di valutazione della degradazione anche in questo caso consiste nella misura del calcio rilasciato in soluzione; i pH testati sono quattro: 4,5-5,5-6,5-7,4.

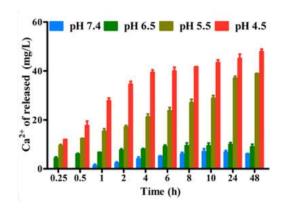


Figura 52: rilascio di calcio in funzione del tempo e del pH [133]

Dalla Figura 52 si nota che il rilascio di calcio è dipendente dal pH, suggerendo che a pH neutri o quasi la particella sia più stabile: dopo due giorni a pH = 7,4 viene rilasciato poco più del 12% del calcio presente inizialmente, mentre a pH = 4,5 si supera il 98%.

L'obiettivo iniziale, cioè ottenere un rilascio prematuro del farmaco inferiore rispetto a quello delle MSN – HAP, è stato raggiunto: infatti, se nello studio con le MSN – HAP a pH = 7,4 il rilascio di farmaco cumulativo dopo 50 h supera il 40%, le MSN – CAP rilasciano poco più del 20% (il farmaco utilizzato è per entrambe la Doxorubicina).

In entrambi gli esempi proposti, è il rilascio del calcio (presente nell'HAP e nel CAP) a stimolare la rottura della particella e la conseguente degradazione; l'allontanamento è dovuto a processi di scambio ionico. Il calcio, legato alla silice mediante legame Si – O – Ca, quando viene allontanato lascia un ossigeno libero in grado di reagire (Si – O⁻) e sito preferenziale di attacco nucleofilo da parte degli OH in soluzione, che promuovono la dissoluzione della silice. I due materiali hanno composizioni simili per quanto riguarda le percentuali atomiche (riportate in Tabella 12), quindi ci si aspetta che il comportamento sia paragonabile, anche se il confronto è difficile poiché il mezzo di degradazione non è lo stesso e la procedura di sintesi cambia.

Tabella 12: percentuali atomiche delle MSN dopate con idrossiapatite e con calcio-fosfato [131], [133]

	MSN – HAP	MSN – CAP
Silicio (Si)	28,48%	29,64%
Fosforo (P)	3,65%	1,47%
Calcio (Ca)	5,32%	2,21%
Ossigeno (O)	62,55%	66,68%

Infine, si può sottolineare come l'utilizzo di fosforo da solo non ha lo stesso effetto, anzi, studi hanno dimostrato che l'incorporazione di PO₄ nella matrice di silice mesoporose riduce la dissoluzione in acqua perché il fosforo sostituisce il silicio, formando legami Si – O – P che aumentano il grado di *cross-linking* della silice [40].

3. Funzionalizzazione con specie organiche

La funzionalizzazione superficiale consiste nell'introduzione di gruppi funzionali sulle superfici esterne, interne o entrambe della silice mesoporosa; è possibile inserire contemporaneamente anche diversi tipi di gruppi funzionali, scelti in modo da conferire al materiale le proprietà desiderate.

La coniugazione di gruppi funzionali alla superficie della OMS altera l'interfaccia silice/ambiente e controlla la sua interazione con i fluidi biologici [93]. L'introduzione di specie organiche nella struttura inorganica consente di combinare i vantaggi di entrambi e superare i rispettivi limiti, portando benefici in varie applicazioni [55].

Le funzionalizzazioni più diffuse sono quelle che utilizzano organosilani, aventi formula del tipo $(R'O)_3 - Si - R$ in cui R rappresenta un gruppo organico. Bisogna distinguere silice

mesoporosa funzionalizzata con specie organiche, cioè contenente sia il precursore di silice sia l'organosilano, che mantiene il nome di OMS, dal materiale in cui l'unica fonte di silice è offerta dagli organosilani, che in questo caso prende il nome di PMO (*Periodic Mesoporous Organosilica*) e ha proprietà e caratteristiche diverse. Nel primo caso i gruppi organici sono ancorati alle superfici mesoporose, mentre nel secondo caso i gruppi organici si trovano all'interno della matrice in silice e si utilizzano precursori del tipo (R'O)₃Si – R – Si(OR')₃, in cui la molecola organica fa da ponte tra due atomi di silicio [56].

Un'altra funzionalizzazione superficiale possibile è quella in cui vengono inseriti polimeri organici sulla superficie esterna della silice mesoporosa in forma di particelle. La modifica della superficie esterna permette di ancorare molecole ingombranti senza alterare il volume poroso interno, per migliorare l'interazione con l'ambiente circostante. Uno dei rivestimenti più effettuati sulle particelle è quello con il PEG (Poli – Etilen – Glicol), che serve sia per migliorare la stabilità e incrementare il tempo di circolazione, sia per ridurre l'adsorbimento di proteine.

Le modifiche che subisce il materiale hanno effetto anche per quanto riguarda il comportamento alla degradazione, e spesso vengono effettuate proprio a tale scopo, perché alterano le interazioni tra materiale e l'ambiente, in alcuni casi promuovendola, in altri inibendola.

3.1 Meccanismi di funzionalizzazione

I meccanismi principali per l'inserimento dei gruppi funzionali, o per effettuare il rivestimento polimerico, sono due: co-condensazione e post-grafting.

3.1.1 Co – condensazione (o sintesi *one* – pot)

Questo meccanismo implica che la funzionalizzazione avvenga in contemporanea alla sintesi del materiale: precursore di silice, agente templante e organosilano che contiene il gruppo funzionale con cui si vuole funzionalizzare il materiale vengono dispersi nella stessa soluzione; quest'ultimo sostituisce una piccola percentuale del precursore [134]. Durante i processi di autoassemblaggio e co-condensazione, i gruppi funzionali degli organosilani vengono incorporati direttamente sulla superficie del materiale, che comunque avrà una struttura mesoporosa. In Figura 53 è raffigurato uno schema del procedimento. Il grado di funzionalizzazione è determinato dalla concentrazione, dalla dimensione molecolare e dall'idrofobicità/idrofilicità del reagente di co – condensazione [135].

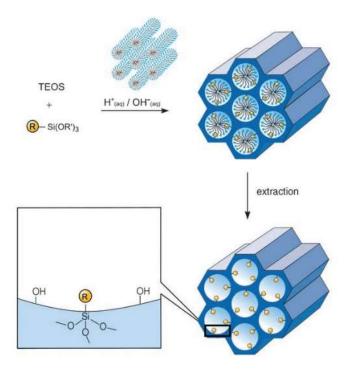


Figura 53: funzionalizzazione per co – condensazione [56]

Il vantaggio di questa tecnica è che si ottiene una distribuzione uniforme dei gruppi funzionali [23]. La presenza degli organosilani però potrebbe influenzare il processo di assemblaggio tra silice e tensioattivo, e di conseguenza alterare la struttura mesoporosa della OMS, impattando soprattutto sull'ordine mesoscopico; la quantità di gruppi funzionali non dovrebbe eccedere il 25% della superficie per non avere ripercussioni sull'ordine strutturale [112]. Un altro aspetto da considerare è che quando il materiale è sintetizzato, per rimuovere l'agente templante non è più possibile effettuare la calcinazione, perché la parte organica verrebbe distrutta.

3.1.2 Post – grafting (o sintesi *stepwise*)

La funzionalizzazione per post – grafting richiede due passaggi: per prima cosa va fabbricata la OMS pura, secondo la procedura che si ritiene più opportuna, che poi viene funzionalizzata tramite innesto; il procedimento è schematizzato in Figura 54. La funzionalizzazione può avvenire, per esempio, per impregnazione in soluzione o per esposizione a vapori volatili [136].

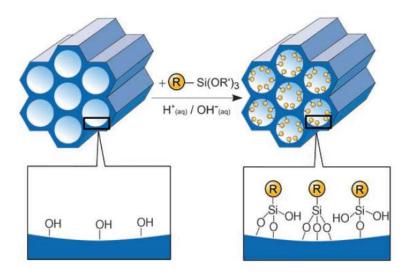


Figura 54: funzionalizzazione per post – grafting [56]

Il vantaggio principale è che la struttura mesoporosa viene preservata, così come altre caratteristiche del materiale. Confrontando per esempio MSN funzionalizzate con il gruppo amminico tramite co-condensazione di TEOS e un organosilano contenente il gruppo amminico oppure mediante post-grafting, si osserva un aumento della dimensione delle particelle nel primo caso, rispetto alle MSN non funzionalizzate, mentre nel secondo caso la dimensione non cambia [137]. Un altro vantaggio è che funzionalizzando la OMS mediante post-grafting è possibile confrontare cosa succede quando si utilizzano silani diversi, senza che cambino le proprietà iniziali del materiale [134].

Lo svantaggio è la distribuzione non omogenea dei gruppi funzionali, che si concentrano principalmente sulla superficie esterna dove i silanoli sono più accessibili. Inoltre, c'è anche il rischio che i gruppi funzionali si accumulino all'entrata dei pori, inibendo l'entrata delle molecole non solo durante la funzionalizzazione, ma anche in seguito, compromettendo, potenzialmente, l'incorporazione di eventuali farmaci o la degradazione del materiale. Anche in questo caso la rimozione del tensioattivo è un aspetto da tenere in conto: la calcinazione potrebbe lasciare una densità superficiale di silanoli troppo bassa, ma l'estrazione con solvente potrebbe lasciare residui [23]. Infine, effettuare la funzionalizzazione prima di rimuovere il tensioattivo permette di aggraffare i gruppi funzionali selettivamente sulle superfici esterne, lasciando inalterate le proprietà dei pori [138].

Per rimarcare la differenza tra OMS funzionalizzata con organosilani dalla PMO, che invece è prodotta utilizzando organosilani a ponte e in cui le molecole organiche sono distribuite all'interno della matrice in silice, è stato riportato in Figura 55 anche uno schema di preparazione della PMO.

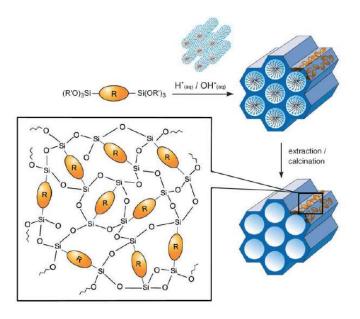


Figura 55: schema di sintesi della PMO [56]

3.2 Funzionalizzazione con organosilani

Difficilmente le particelle di silice utilizzate come DDS vengono introdotte nel corpo così come sono, tipicamente vengono dotate di molecole superficiali esterne in grado di legare proteine, anticorpi o ligandi, in modo da poter raggiungere il target. Inoltre, possono essere modificate anche con molecole superficiali interne che consentono una migliore interazione con il farmaco e il rilascio più controllato. Per poter eseguire queste funzionalizzazioni si utilizzano organosilani, contenenti gruppi funzionali all'estremità che possono legare con altre molecole. La varietà di organosilani che possono essere utilizzati è molto ampia, un esempio è riportato in Figura 56.

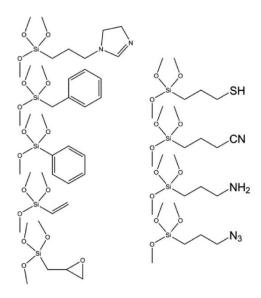


Figura 56: esempio di organosilani che possono essere utilizzati per funzionalizzare la OMS [134]

3.2.1 Silice SBA – 15 funzionalizzata con gruppi metile e tiolo

(CH₃) presente nel metiltrietossisilano (MTES Il metile MTEOS, methyltriethoxysilane) aumenta il carattere idrofobico della superficie della silice SBA – 15, sia che si tratti di funzionalizzazione post - grafting [139] sia che sia eseguita per co condensazione [62]. Il gruppo metile stabilizza il legame Si – O perché riduce il carattere elettropositivo del centro di silicio, grazie all'effetto induttivo di donatore, e sfavorisce la sostituzione nucleofila del legame Si - O - Si. Con l'aumento del numero di centri metilati il numero di centri di silicio non metilati che vengono idrolizzati preferenzialmente decresce così come la velocità di dissoluzione [62]. Allo stesso modo, l'octiltrimetossisilano (OTMS, octyltrimethoxysilane), contenente il gruppo C₈H₁₇ è usato come agente idrofobico per ridurre l'adsorbimento di molecole di acqua sulla superficie della particella, impedendo l'attacco nucleofilo ai legami silossano [139]. In Figura 57 sono rappresentate le strutture dei due organosilani.

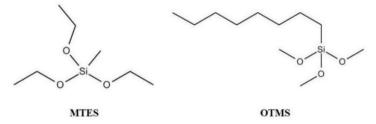


Figura 57: struttura degli organosilani. MTES = metiltrietossisilano; OTMS = octiltrimetossisilano

La funzionalizzazione per co-condensazione si realizza aggiungendo il MTES al TEOS in una soluzione di F127, acqua, HCl ed etanolo, tenuta in agitazione per un'ora a temperatura ambiente e poi 16 h a 130°C; la rimozione del tensioattivo viene realizzata scaldando il materiale 30 minuti a 200°C e altri 10 minuti a 300°C [62].

La funzionalizzazione per post-grafting viene effettuata immergendo le particelle in una soluzione di toluene e agente funzionalizzante [139]. Le particelle di partenza sono del tipo SBA – 15, realizzate mediante procedura classica: P123 dissolto in acqua e HCl a 35°C e aggiunta di TEOS, agitazione 12 h a 35°C e poi trattamento termico 24 h a 100°C. Rimozione del tensioattivo ottenuta per calcinazione. Nella Figura 58 sono mostrati i profili di rilascio della silice dopo immersione delle particelle in SBF a 37°C [139]; come anticipato, la funzionalizzazione con gruppi metili aumenta l'idrofobicità della silice, e ne diminuisce di conseguenza la degradazione.

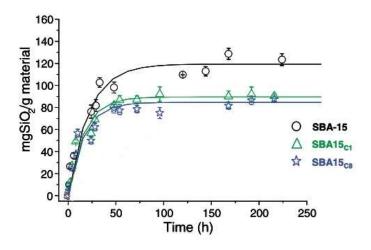


Figura 58: profili di rilascio della silice (mg di silice rilasciata / 1 g di materiale) in SBF; SBA – 15 è la silice tal quale, SBA – 15 C1 è la silice funzionalizzata con il MTES, SBA – 15 C8 è la silice funzionalizzata con l'OTMS [139]

Lo stesso comportamento si osserva nelle silici SBA funzionalizzate con gruppi tioli (–SH), sempre grazie all'idrofobicità del gruppo, che rende la superficie resistente all'azione delle soluzioni acquose [62]. L'effetto è anche più evidente rispetto al gruppo metile perché le funzionalità tiolo si posizionano distese sulla superficie, creando rivestimenti idrofobici più estesi [62]. Il gruppo tiolo è vantaggioso anche da un altro punto di vista, infatti può creare ponti disolfuro con le molecole biologiche. La funzionalizzazione solitamente viene realizzata

utilizzando come organosilano il mercaptopropiltrietossisilano (MPTS, *Mercaptopropyltriethoxysilane*), la cui struttura è osservabile in Figura 59.

Figura 59: organosilano MPTS = mercaptopropiltrietossisilano

Silice SBA – 15 funzionalizzata con MPTS per co-condensazione degrada tre volte più lentamente rispetto alla silice non funzionalizzata, sintetizzata in maniera simile [82]. La sintesi avviene in soluzione di P123 in acqua, HCl e TEOS a 40°C, a cui viene aggiunto dopo 45 minuti il MPTS; l'agitazione e la temperatura vengono mantenute ancora 20 h, poi si esegue un trattamento termico a 100°C per 24 h; l'estrazione del tensioattivo avviene in etanolo per 24 h. Il test di dissoluzione è svolto in acqua a temperatura ambiente e pH neutro [82]. L'efficacia del gruppo tiolo utilizzato per ritardare la degradazione grazie alla sua natura idrofobica è stata dimostrata anche per pH più alti, dove sono presenti numerosi ioni idrossili capaci di attacco nucleofilo [140].

3.2.2 Silice MCM – 41 funzionalizzata con gruppo fenile e cloro

La silice del tipo MCM – 41, funzionalizzata per co-condensazione con feniltrietossisilano (PTES, *Phenyltriethoxysilane*) e con cloropropiltrimetossisilano (Cl–PTES, *Chloropropyltrimethoxysilane*), rappresentati in Figura 60, degrada più velocemente rispetto a quella non funzionalizzata [31].

Figura 60: struttura degli organosilani. PTES = feniltrietossisilano; Cl - PTES = cloropropiltrimetossisilano

Un esempio di sintesi di MCM – 41 funzionalizzata mediante co-condensazione può essere il seguente [31]: TEOS e TEA vengono scaldati a 90°C per 20 minuti, il 10%mol di precursore di silice viene sostituito con l'organosilano; la soluzione viene aggiunta a quella di CTAC e acqua, precedentemente portata alla temperatura di 60°C e viene mantenuta in agitazione per 12 h a temperatura ambiente (rapporti molari → 0,9TEOS:0,1organosilano:0,20CTAC:10,37TEA:130,15H₂O). La rimozione del tensioattivo avviene tramite reflusso a 90°C per 45 minuti in NH₄NO₃ ed etanolo e 45 minuti in HCl ed etanolo.

La degradazione delle particelle di silice mesoporose in questo studio è valutata tramite le variazioni dell'area superficiale; l'area superficiale rimanente è espressa in percentuale di quella di partenza. A seguito di immersione in SBF a 37°C, si può notare come in soli 4 giorni l'area superficiale delle CMS – Cl (cioè particelle funzionalizzate con Cl – PES) passi da 632 a 8,52 m²/g. Per le CMS – Ph (funzionalizzate con PTES) è sufficiente addirittura un giorno solo per passare da 1241 a 0,49 m²/g. Nella Figura 61 è mostrato anche il confronto con le particelle non funzionalizzate Un – CMS (in 4 giorni l'area superficiale si riduce da 1135 a 325 m²/g) [31].

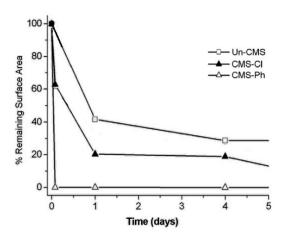


Figura 61: percentuali di area superficiale rimanente a seguito di immersione in SBF a 37°C [31]

3.2.3 Funzionalizzazione con gruppi amminici

Per la funzionalizzazione con il gruppo amminico (–NH₂) l'organosilano che si utilizza è l'amminopropiltrietossisilano (APTES, *Aminopropyltriethoxysilane*), raffigurato in Figura 62.

Figura 62: aminopropiltrietossisilano (APTES)

La funzionalità amminica è particolarmente interessante per le applicazioni di *drug delivery* perché permette di legare proteine e anticorpi direttamente sulla superficie delle particelle [68].

È già stato ribadito il fatto che la stabilità della silice si riduce significativamente in soluzioni alcaline; funzionalizzando la superficie con gruppi amminici, di natura basica in ambiente acquoso, ci si aspetta una variazione della degradazione della silice [140]. L'influenza di questo gruppo sul comportamento di degradazione della OMS non è univoca: in alcuni casi l'aggiunta di APTES determina l'aumento della stabilità della silice [62][56][139][68][17], in altri invece l'opposto [87][46][82][140][31][141]. Non è il metodo di funzionalizzazione ad incidere, perché particelle di silice funzionalizzate per post-grafting accelerano [140] o rallentano [139] la degradazione, allo stesso modo la co-condensazione può aumentare la stabilità [68] o diminuirla [31]; non è il tipo di silice (SBA o MCM) a determinare l'effetto, perché silice del tipo SBA funzionalizzata per co-condensazione può sia degradare di più [82] che di meno [62], e così anche l'MCM. Fontecave et al. [62] hanno proposto che il motivo di questi comportamenti discordanti potrebbe essere la percentuale di funzionalizzazione. A supporto di questa ipotesi, in Figura 63 è riportata l'energia di attivazione apparente del processo di dissoluzione dei materiali ibridi in funzione del rapporto di funzionalizzazione: come si può notare la funzione non è monotona.

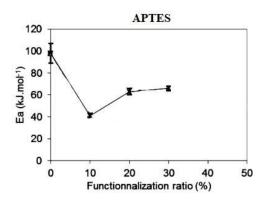


Figura 63: energia di attivazione apparente del processo di dissoluzione di materiali ibridi in funzione del rapporto di funzionalizzazione [62]

Per provare a verificare quest'ipotesi, in Tabella 13 sono stati raccolti i dati relativi al tipo di silice, al metodo di funzionalizzazione, alla quantità di APTES presente in rapporto al TEOS e i rapporti molari di sintesi. Non sempre la spiegazione fornita da Fontecave sembra concordare con i dati sperimentali; ad esempio, stesso metodo e stessa percentuale (10%) conducono a due risultati opposti. In conclusione, probabilmente intervengono altri fattori, oltre al rapporto di funzionalizzazione, nel favorire o meno la stabilità del materiale.

Tabella 13: silici funzionalizzate con APTES ed effetto sulla stabilità, in ordine di citazione [87][46][31][82][68][62][139][17][140]

Tipo di silice	Metodo di funzionalizzazione	Rapporto di funzionalizzazione	Sintesi	Stabilità rispetto alla silice non funzionalizzata
MCM – 41	Co-condensazione	6%	0,94TEOS:0,06APTES:0,58CTAB:1,14TEA:1412H ₂ O	Minore
MCM – 41	Co-condensazione	9%	0,9TEOS:0,1APTES:0,2CTAB:10,7TEA:0,3NH ₄ F:121H ₂ O	Minore
MCM – 41	Co-condensazione	10%	0,9TEOS:0,1APTES:0,2CTAC:10,37TEA:130,15H ₂ O	Minore
SBA – 15	Co-condensazione	10%	0,9TEOS:0,1APTES:0,07P123:104HCl	Minore
MCM – 41	Co-condensazione	15%	0,85TEOS:0,15APTES:0,14CTAB:40EtOH:0,24HCl:5H ₂ O	Maggiore
SBA – 16	Co-condensazione	10%	0,9TEOS:0,1APTES:0,005F127:40EtOH:0,09HCl:50H ₂ O	Maggiore
SBA – 16	Co-condensazione	20%	0,8TEOS:0,2APTES:0,005F127:40EtOH:0,09HC1:50H ₂ O	Maggiore
SBA – 16	Co-condensazione	30%	0,7TEOS:0,3APTES:0,005F127:40EtOH:0,09HCl:50H ₂ O	Maggiore
SBA – 15	Post-grafting	20%	1TEOS:0,02P123:5,89HCl:161,23H ₂ O	Maggiore
SBA – 15	Post-grafting	n.a.	1TEOS:0,02P123:15HCl:175H ₂ O	Maggiore
Gel di silice	Post-grafting	1,35 mmol/g	n.a.	Minore

Un'altra ipotesi riguarda il rapporto tra i gruppi amminici protonati e quelli non protonati: [NH₃+]/[NH₂] [136]. Infatti, il gruppo amminico in acqua può trovarsi in forma protonata (NH₃⁺) e possono instaurarsi legami a idrogeno tra le ammine e i silanoli della superficie della silice (Figura 64).

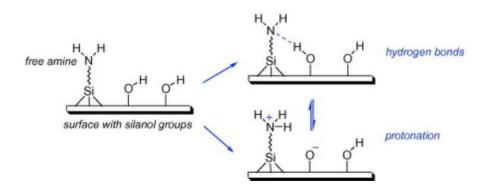


Figura 64: le ammine esposte dall'APTES possono creare legami a idrogeno con i silanoli della superficie della silice, oppure possono presentarsi in forma protonata [56]

Quando sono presenti piccole quantità di gruppi funzionali amminici, questi si stabilizzano trasferendo il protone al gruppo Si – O⁻, e creando un'entità stabile intermedia tra un legame a idrogeno (-NH₂···HO-Si) e un'interazione elettrostatica (-NH₃+/-O-Si) [136]. La coda propilica copre la superficie della silice rendendola più idrofobica e meno reattiva alla dissoluzione [62].

La protonazione dei gruppi amminici conferisce maggior stabilità alla silice in ambiente acquoso [140], perché il gruppo disattiva l'atomo di silicio vicino dall'attacco nucleofilo dell'acqua, rendendo il materiale più stabile all'idrolisi [56]. Se però il gruppo amminico si trova in forma non protonata, la sua presenza catalizza il processo di idrolisi della silice [56].

La funzionalizzazione realizzata mediante post-grafting consente di avere concentrazioni di gruppi funzionali aggraffati più alte, ma comunque in dipendenza dalla quantità di silanoli disponibili in superficie., Anche aumentando la concentrazione di APTES durante il processo di funzionalizzazione (generalmente ottenuta disperdendo le particelle di silice in toluene) il massimo di molecole aggraffate non varia se tutti i silanoli sono occupati [140]. Inoltre, una certa quantità di silanoli presenti in superficie non reagisce, a causa dell'ingombro sterico dell'organosilano.

La degradazione comincia rompendo il legame tra l'organosilano e la superficie della silice (Figura 65) [140]. Non tutte le molecole di APTES aggraffate alla superficie vengono liberate, ma solo quelle che hanno il gruppo amminico in forma non protonata, le altre rimangono legate alla superficie. A questo punto la degradazione può procedere dalla massa della particella.

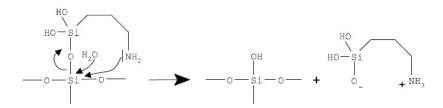


Figura 65: idrolisi del legame silossano tra superficie della silice e organosilano [140]

Funzionalizzare un materiale mediante post-grafting produce una variazione delle caratteristiche strutturali: area superficiale, volume poroso e diametro dei pori diminuiscono, mentre aumenta lo spessore delle pareti. Si può osservare un esempio in Tabella 14 dove vengono confrontate le caratteristiche di particelle del tipo SBA - 15 funzionalizzate e tradizionali [139]. Questa modifica di caratteristiche strutturali potrebbe contribuire al rallentamento della degradazione, come si può vedere dalle curve in Figura 66, dov'è riportato l'esempio di una silice funzionalizzata, la quale si degrada meno e più lentamente rispetto al corrispettivo non funzionalizzato. I gruppi funzionali interferiscono con la corrosione delle pareti da parte dei cationi presenti in SBF [17], rallentando la degradazione. Si può notare come l'APTES riduca il volume microporoso tipico del SBA – 15, reagendo con i silanoli presenti all'interno dei micropori, (o ne inibisca l'individuazione) [79]. Nel processo di funzionalizzazione mediante co-condensazione, invece, le caratteristiche strutturali non variano eccessivamente, per esempio nello studio di Pham [82] l'area superficiale delle particelle SBA - 15 è di 636 m²/g, mentre delle particelle funzionalizzate con l'APTES è di 570 m²/g. In letteratura non si trovano molti casi di silice MCM – 41 funzionalizzata con APTES per postgrafting, perché c'è il rischio di occludere i mesopori, che hanno dimensioni minori rispetto all'SBA – 15 [142].

Tabella 14: variazione delle caratteristiche strutturali a seguito della funzionalizzazione per post-grafting di SBA-15 con APTES [139]

	Area superficiale (m²/g)	Volume poroso (cm³/g)	Volume microporoso (cm³/g)	Diametro pori (nm)	Spessore pareti (nm)
SBA – 15	899	1,03	0,046	8,1	2,7
SBA – 15 NH ₂	381	0,663	~0	5,4	5

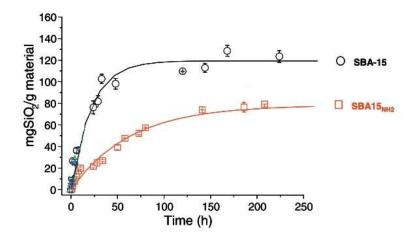


Figura 66: profili di rilascio della silice (mg di silice rilasciata / 1 g di materiale) funzionalizzata e non funzionalizzata in SBF [139]

Nei materiali ibridi ottenuti per co-condensazione c'è il rischio che quantità eccessive di APTES possano perturbare il grado di ordine mesoscopico [143], perché disturbano la zona di interazione tra tensioattivo e silice [137] durante il processo di formazione della OMS. Nel caso di organosilani idrofobici, invece, le catene si allineano alle code del tensioattivo all'interno della micella [137]. Inoltre, la densità di gruppi funzionali che si ottiene con questa tecnica è minore rispetto a quella che si può ottenere per post-grafting [143]. La quantità eccessiva di gruppi amminici rende il materiale funzionalizzato mediante co-condensazione più fragile [56] perché l'organosilano agisce da difetto nella struttura della parete porosa, causando instabilità (Figura 67) [46].

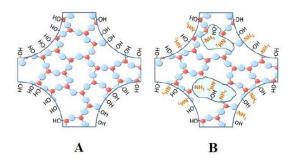


Figura 67: la presenza dell'APTES crea dei difetti nella struttura delle pareti porose (B), che non sono presenti nel materiale non funzionalizzato (A), e che quindi causano instabilità idrolitica [46]

Infine, la funzionalizzazione con gruppi amminici conferisce un potenziale zeta maggiore rispetto a quello che avrebbe la particella in silice tal quale [87]. Di conseguenza, le particelle sono ben disperse e non c'è il rischio che l'area superficiale si riduca a causa dell'aggregazione; inoltre, la carica positiva della forma protonata dell'ammina attrae i gruppi fosfati presenti nel PBS e accelera la degradazione della particella in questo ambiente [87].

3.3 Funzionalizzazione con PEG

Il PEG è un polimero biocompatibile ed emocompatibile, non tossico e non immunogenico, già ampiamente impiegato in ambito biomedico. Per quanto riguarda la silice, la sua applicazione era già stata testata sui film di silice e sulle particelle non porose del tipo Stöber, per questo motivo il gruppo di ricercatori di Cauda et al. [31][144] ha pensato di sperimentare il suo utilizzo sulle nanoparticelle colloidali di silice mesoporosa (CMS). In Figura 68 è riportata la struttura del PEG.

$$H = \begin{bmatrix} O \\ D \end{bmatrix}_{n} O^{H}$$

Figura 68: struttura del PEG

Le particelle in silice funzionalizzate esternamente con il PEG non si aggregano, perché il rivestimento polimerico funziona da stabilizzatore sterico, in più viene inibita la precipitazione di apatite sulle superfici e viene evitato il fenomeno di *pore – blocking*. Inoltre, è stato

dimostrato che il PEG aiuta le particelle ad evitare la fagocitosi ed eludere la cattura da parte di fegato, milza e tessuto polmonare [145].

La funzionalizzazione avviene mediante co-condensazione: si prepara un PEG-silano partendo da un polimero commerciale (Mw = 550 KDa) e un organosilano (l'APTES) secondo il procedimento illustrato in Figura 69, da aggiungere nella soluzione durante la sintesi delle CMS.

$$H_{3}C = O \longrightarrow OH \qquad TsCl \qquad H_{3}C = O \longrightarrow OTs$$

$$H_{3}C = O \longrightarrow OTs \qquad APTES (1.0 equiv.)$$

$$CHCl_{3}, 70 °C, 8 h$$

$$reflux$$

$$PEG-silane precursor$$

Figura 69: preparazione del PEG – silano [144]

La sintesi delle particelle è così realizzata: una miscela di TEOS e TEA è lasciata 20 minuti a 90°C, si aggiunge la soluzione acquosa di CTAC, precedentemente portata alla temperatura di 60°C, dopo mezz'ora si aggiunge il PEG – silano insieme ad ulteriore precursore di silice e si tiene la soluzione in agitazione per 12 ore a temperatura ambiente. Questo metodo di sintesi viene chiamato anche "co – condensazione ritardata" a causa del tempo che intercorre tra la prima condensazione che porta alla formazione delle particelle, e la seconda condensazione, che le funzionalizza, come rappresentato in Figura 70.



Figura 70: processo di co-condensazione ritardata, per funzionalizzare con il PEG [144]

I rapporti molari della prima condensazione sono: 1TEOS:0,20CTAC:10,37TEA:130,15H₂O. Il PEG – silano aggiunto è l'1%mol della quantità totale di silice nella sintesi.

La rimozione del tensioattivo avviene tramite estrazione: 45 minuti in reflusso in nitrato d'ammonio ed etanolo a 90°C, seguiti da altri 45 minuti in acido cloridrico ed etanolo.

Il test di biostabilità consiste nell'immersione di 100 mg di particelle in 50 ml di SBF a 37°C e pH = 7,4 tenuto in agitazione costante per un mese; la valutazione della degradazione delle particelle viene effettuata a determinati *time point*. Il confronto tra particelle funzionalizzate e non è volto a verificare l'efficacia del PEG.

Le principali caratteristiche delle particelle tal quali (CMS) e funzionalizzate (CMS – PEG) sono riportate nella seguente tabella (Tabella 5).

Tabella 15: caratteristiche strutturali di CMS e di CMS – PEG [31]

	Area superficiale (m²/g)	Volume poroso (cm ³ /g)	Diametro pori (nm)
CMS	1135	0,857	3,77
CMS – PEG	1012	0,697	3,77

Analizzando la biostabilità di questi materiali, già dopo due ore si osserva una riduzione graduale dei parametri strutturali per le CMS. Dopo 24 h si osservano anche allargamento della curva di distribuzione dimensionale dei pori e perdita della mesoporosità. Le CMS – PEG, invece, mantengono la mesoporosità fino a 4 giorni di immersione e per tutto il mese è possibile misurarne ancora area superficiale, volume poroso e diametro dei pori, a differenza delle CMS. Inoltre, sulle CMS cominciano a vedersi dei cristalli di idrossiapatite, che invece non si formano sulle CMS – PEG.

Un ulteriore confronto viene fatto tra particelle funzionalizzate con PEG di diverso peso molecolare. A tal fine si preparano tre tipi di particelle (il numero indica il peso molecolare in KDa del polimero) le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 6:

- 1) CMS PEG₅₅₀: a catene corte
- 2) CMS PEG₅₀₀₀: a catene lunghe
- 3) CMS PEG₅₅₀ PEG₅₀₀₀: a catene miste (75% corte e 25% lunghe)

Tabella 16: caratteristiche strutturali delle CMS – PEG funzionalizzate con polimero a diverso peso molecolare [144]

	Area superficiale	Volume poroso	Diametro pori
	(m^2/g)	(cm ³ /g)	(nm)
CMS – PEG ₅₅₀	994	0,87	3,9
CMS – PEG ₅₀₀₀	750	0,62	3,8
CMS – PEG ₅₅₀ – PEG ₅₀₀₀	781	0,66	4,0

Nonostante le CMS – PEG e le CMS – PEG₅₅₀ siano state preparate seguendo la stessa procedura di sintesi, con rapporti molari, tempi e temperature uguali, la caratterizzazione porta a risultati diversi (le caratteristiche strutturali iniziali sono riportate in Tabella 16, e si possono confrontare con le altre in Tabella 15). Queste differenze fanno pensare che il processo di sintesi non sia totalmente riproducibile o che qualche parametro sia stato modificato da una sintesi all'altra. Purtroppo, sulla base delle informazioni fornite nel paper non è possibile dedurre ad una motivazione certa. La Figura 71 raffigura le tre diverse funzionalizzazioni.

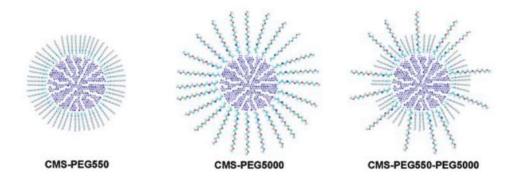


Figura 71: le tre diverse funzionalizzazioni delle CMS ottenute con PEG a diverso peso molecolare [144]

Tutte le particelle mantengono la struttura mesoporosa del tipo *worm* – *like* e la dimensione di pori non varia rispetto alle non funzionalizzate, suggerendo che il PEG non entri all'interno dei pori; le differenze nel volume poroso sono da attribuire probabilmente all'ostruzione di parte delle porosità. Le catene a diverso peso molecolare si distribuiscono con densità differenti sulla superficie delle particelle: 1,3 – 2,1 molecole/nm² per le CMS – PEG₅₅₀, 0,5 – 0,7 per le CMS – PEG₅₀₀₀ e 1,5 – 2,0 per le CMS – PEG₅₅₀ – PEG₅₀₀₀; come ci si aspetta, la densità minore si ottiene con le catene più lunghe, a causa dell'ingombro sterico maggiore.

Tra le funzionalizzazioni, conferisce maggiore biostabilità quella a catene lunghe e dense (CMS – PEG₅₅₀ – PEG₅₀₀₀) che dopo un mese riesce a mantenere il 50% dell'area superficiale iniziale e il 40% del volume poroso; ma anche le altre due hanno sicuramente una cinetica di degradazione molto più lenta rispetto alle CMS; la mesostruttura originale è osservabile per tutto il mese di immersione e non ci sono precipitazioni di cristalli di apatite.

Infine, è necessario sottolineare come sia indispensabile che il rivestimento con il PEG sia omogeneo, perché altrimenti non riesce a svolgere la funzione di protezione della particella contro la degradazione; per esempio, nanoparticelle di silice (non mesoporosa) funzionalizzate con PEG tramite post – grafting [141] non migliorano la stabilità in acqua probabilmente perché il PEG non è distribuito in modo uniforme sulla superficie.

3.4 Funzionalizzazione con PEI

Un altro polimero che può essere utilizzato per funzionalizzare la superfice della particella è poli-etilen-immina (PEI), la cui struttura è rappresentata in Figura 72. Il PEI è un polimero a carattere fortemente cationico, in grado di convertire la carica negativa delle particelle di OMS tradizionali in carica positiva, favorendo l'adsorbimento cellulare e il caricamento di agenti terapeutici negativi, come le proteine e l'RNA. Bisogna, però, prestare particolare attenzione al peso molecolare del PEI: se troppo basso rischia di essere inefficace, mentre se alto potrebbe causare citotossicità. Il PEI, infatti, sfrutta un effetto di "proton sponge" (trattenimento dei protoni) che facilita la fuoriuscita endosomiale dei materiali internalizzati dalla cellula, ma può causare anche un'attività eccessiva della pompa protonica della cellula, inducendo swelling osmotico del compartimento endocitico e rottura endosomiale [146].

$$\left[\begin{array}{c} N \\ H \end{array}\right]_n$$

Figura 72: struttura del PEI

Solitamente la funzionalizzazione con PEI avviene per post – grafting: il PEI viene disperso in etanolo e nella soluzione sono introdotte le MSN a cui è stato rimosso il tensioattivo, si lascia in incubazione per mezz'ora e poi si lava con etanolo per allontanare il PEI non assorbito [147]; l'assorbimento avviene tramite interazioni elettrostatiche grazie all'opposizione di carica tra silice negativa e polimero cationico.

La funzionalizzazione del PEI può essere effettuata per scopi diversi e, in base a come viene condotta, può provocare variazioni nel comportamento alla degradazione delle particelle; si riportano a tal proposito due esempi, in cui l'applicazione del PEI modifica la degradazione delle particelle rispetto a quelle non funzionalizzate.

3.4.1 Utilizzo del PEI per ritardare la degradazione

Nella sperimentazione di Chen et al. [51] il PEI viene applicato sulla superficie di particelle *core* – *shell* contenenti al loro interno una particella magnetica di ferro per valutare come questa funzionalizzazione influenzi il comportamento alla degradazione. La presenza della particella superparamagnetica di Fe₃O₄ conferisce alle particelle proprietà aggiuntive, per esempio possono essere usate come agenti di contrasto per la risonanza magnetica; questo tipo di particelle prende il nome di M – MSN, dove M indica che sono magnetiche.

La procedura di sintesi è la seguente: nanoparticelle di Fe₃O₄ stabilizzate in acido oleico sono disperse in una soluzione acquosa di CTAB, la dispersione viene aggiunta alla soluzione di acqua e NaOH, tenuta in agitazione a 70°C; dopo 10 minuti si aggiungono TEOS e acetato di etile, continuando l'agitazione e mantenendo la temperatura per ancora 3 ore. Il tensioattivo viene rimosso tramite reflusso a 60°C in etanolo e nitrato d'ammonio.

La funzionalizzazione avviene incubando a temperatura ambiente la stessa quantità di particelle e PEI (Mw = 25 kDa) per mezz'ora, la miscela viene poi centrifugata per 10 minuti e lavata con etanolo e PBS per rimuovere l'eccesso di PEI.

Si ottengono particelle di circa 50 nm a struttura core - shell in cui il guscio esterno ha una mesostruttura di tipo worm - like con canali radiali rispetto alla superficie e distribuzione dimensionale dei pori stretta ($\sim 3,7$ nm).

La degradazione viene testata in PBS in agitazione a 37°C, utilizzando un tubo da dialisi contenente 2 ml di mezzo e 4 mg di particelle, immerso in ulteriori 38 ml di mezzo.

È stato dimostrato che l'utilizzo di particelle di ferro come "semi" per la nucleazione conduce a una condensazione veloce della silice e un framework più disordinato e irregolare. La degradazione parte proprio da qui: la particella comincia a dissolversi dall'interno e la nanoparticella di ferro si ricolloca perché non più trattenuta dalla silice; la forma sferica si mantiene ancora per qualche ora e poi la particella collassa. Le particelle funzionalizzate con il PEI seguono lo stesso processo di degradazione ma in maniera più lenta, la forma sferica rimane fino a 50 ore.

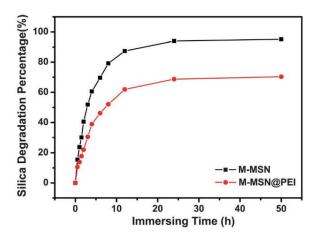


Figura 73: percentuali di degradazione della silice in PBS a 37°C [51]

Le curve di degradazione, rappresentate in Figura 73, permettono di individuare due fasi, la prima di degradazione veloce e la seconda lenta, fino al raggiungimento di un plateau: le M – MSN degradano fino al 95%, mentre le M – MSN – PEI arrivano fino al 70%.

L'effetto di ritardo nella degradazione promosso dal PEI è dovuto a due fattori [51]:

- Le catene di PEI assorbono le specie di silice dissolte per interazione elettrostatica (PEI positivo e silice negativa);
- Il PEI genera un microambiente localmente basico intorno alla particella che stimola la ricondensazione della silice.

Il confronto tra i meccanismi di degradazione delle particelle funzionalizzate e non è schematizzato in Figura 74.



Figura 74: confronto tra degradazione di particelle non funzionalizzate (a) e funzionalizzate (b) [51]

3.4.2 Utilizzo del PEI per promuovere la degradazione

Lo studio di Choi et al. [147] ha lo scopo di indagare come la superficie esterna delle particelle influisca sulla degradazione e si basa proprio sul secondo fattore identificato dallo studio precedente [51], cioè la formazione intorno alla particella di un microambiente localmente basico favorevole alla ricondensazione della silice. Nel caso dello studio di Choi, però, si ottiene l'effetto opposto.

La sintesi delle particelle avviene nel modo seguente: il CTAB viene dissolto in acqua e NaOH, la soluzione viene agitata e scaldata fino a 80°C, a questo punto si aggiunge il TEOS e si tiene in agitazione altre due ore e poi si raffredda fino a temperatura ambiente. La rimozione del tensioattivo avviene per reflusso in metanolo e acido cloridrico per un giorno intero.

La funzionalizzazione si effettua incubando le particelle in etanolo a temperatura ambiente in cui è disperso anche il PEI (Mw = 0,8 KDa), mezz'ora di agitazione e poi le particelle vengono lavate con etanolo, sonicate e centrifugate per eliminare i residui di PEI non assorbiti. In questo caso la quantità di MSN e di PEI non è la stessa (10 mg di particelle e la concentrazione di PEI nell'EtOH è 2,6 mg/ml) e il procedimento è ripetuto tre volte, per assicurare la copertura completa della superficie. La quantità di polimero determinata con analisi termogravimetrica (TGA) è di circa 26 wt% rispetto alla massa della silice.

Il test di degradazione consiste nell'incubazione delle particelle in PBS a 37°C ad una concentrazione di particelle in soluzione di 1 mg/ml, il mezzo non viene agitato, ma viene sostituito giornalmente. La prova viene condotta a due pH diversi (5 e 7,4) per valutare come il

PEI agisce in ambiente acido, come quello che si trova all'interno della cellula, e in cui la silice pura solitamente non degrada.

Le particelle funzionalizzate mantengono la forma sferica e la dimensione varia di poco (da 80 nm a 82 nm), mentre l'area superficiale e il volume poroso si abbassano drasticamente a causa della difficoltà dell'azoto di entrare nei pori per effettuare le misurazioni tramite curve di assorbimento; anche la dimensione dei pori non è misurabile. Il potenziale zeta delle particelle passa da negativo a positivo.

Come si può notare dalla Figura 75, le particelle funzionalizzate con il PEI raggiungono una percentuale di degradazione maggiore rispetto a quelle non funzionalizzate, sia a pH neutro che a pH acido.

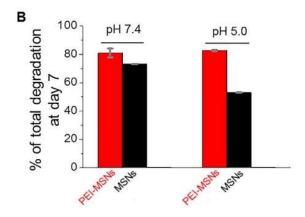


Figura 75: percentuali di degradazione delle particelle in PBS al settimo giorno [147]

La degradazione delle PEI – MSN parte dall'esterno: il primo giorno comincia l'erosione e si perde la forma sferica, poi le particelle cominciano a collassare e aggregarsi. Al contrario, le MSN non funzionalizzate resistono più a lungo alla degradazione e la dissoluzione della silice procede dalle pareti dei pori, che non sono ostruiti. La differenza più evidente è visibile a pH = 5, dove le MSN si degradano più difficilmente.

Il meccanismo di degradazione idrolitica in ambiente acido è lo stesso proposto precedentemente, ma conduce al risultato opposto: il PEI agisce come "proton sponge" attirando i protoni, grazie ai gruppi amminici presenti crea un microambiente basico che promuove la dissoluzione della silice (come mostrato in Figura 76). Il ruolo del PEI quindi è

quello di "buffer", che cambiando il pH in basico migliora la degradazione in ambiente neutro e permette quella in ambiente acido.

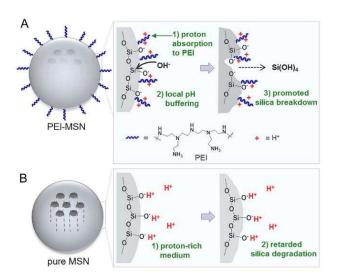


Figura 76: processo di degradazione in ambiente acido [147]

Le ragioni che spiegano le diverse conseguenze della funzionalizzazione sono difficili da comprendere; la funzionalizzazione avviene in maniera simile, ma nello studio di Chen non è specificata la quantità di PEI che viene assorbita, probabilmente meno rispetto allo studio di Choi perché l'entrata dei pori non viene ostruita e la dissoluzione può procedere dall'interno. Cambiano anche i pesi molecolari del polimero: il secondo è a catena più corta, quindi la densità presumibilmente è maggiore. Un altro aspetto da considerare è l'esecuzione della prova di degradazione, nel secondo caso il mezzo viene cambiato giornalmente, di conseguenza le specie dissolte sono allontanate e non ricondensano.

4. Introduzione di legami scindibili

Come già ripetuto più volte, la degradazione delle particelle può venire anche per frammentazione, per cui una delle strategie attuabili per degradare il *carrier* è quella di inserire all'interno del framework dei legami che possono essere scissi e di conseguenza causare la rottura della matrice in silice. I legami possono essere per esempio ponti disolfuro e diselenio che si scindono in ambiente riducente, legami ammidici degradabili enzimaticamente, gruppi funzionali che possono essere idrolizzati oppure molecole fotolabili.

4.1 Ponte disolfuro

Per inserire un ponte disolfuro all'interno della struttura è necessario utilizzare un organosilano a ponte, in particolare si utilizza il bis(trietossisilil-propil)disolfuro (BTDS), in Figura 77, che sostituisce una parte del precursore di silice nella procedura di sintesi [148].

Figura 77: bis(trietossisilil-propil)disolfuro

Il ponte disolfuro è un legame covalente che può essere facilmente scisso in ambienti riducenti, il cui utilizzo è già stato proposto per altri sistemi di *drug delivery* per innescarne l'auto degradazione [149]. Grazie all'elevata concentrazione di GSH all'interno della cellula si innesca la rottura del legame S – S presente nel framework, che accelera l'idrolisi del legame silossano, portando ad una rapida degradazione delle particelle [35].

Si effettua una co-condensazione tra BTDS e TEOS (in rapporto molare 30:70), per il resto si segue la procedura già vista di Stöber modificata: il CTAB è dissolto in acqua, etanolo e NaOH, la soluzione è agitata a 70°C, poi si aggiungono i precursori di silice e si lascia la soluzione in agitazione per 6 h. Il tensioattivo è rimosso tramite reflusso in etanolo e acido cloridrico [148]. Le particelle hanno forma sferica e distribuzione dimensionale stretta; dallo spettro XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*) si conferma che l'incorporazione del ponte ha avuto successo e dalla mappa EDX (*Energy Dispersive X-ray*) che la distribuzione è omogenea. La struttura è mesoporosa, con diametro dei pori di 2,2 nm, ma meno ordinata a causa della presenza dei ponti disolfuro.

La degradazione viene testata in PBS, alla concentrazione di particelle di 0,1 mg/ml e alla temperatura di 37°C, in agitazione e con l'aggiunta di GSH (10 mM). Dalle immagini TEM si osserva la frammentazione strutturale della particella, che invece non si vede in assenza dell'agente riducente. Nella Figura 78 sono mostrate le immagini TEM di confronto tra le particelle in presenza e in assenza di GSH.

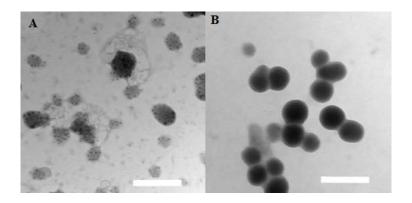


Figura 78: immagini TEM delle particelle al settimo giorno di incubazione in PBS a 37°C (A = PBS + GSH 10 mM; B = PBS) [148]

L'ambiente riducente è essenziale affinché la degradazione sia innescata. La rottura del ponte disolfuro causa difetti e vacanze nella struttura di silice che portano prima alla frammentazione e poi alla degradazione completa, che avviene più lentamente.

È importante che il ponte disolfuro sia accessibile, altrimenti anche in presenza di GSH la degradazione non avviene, anzi, produce l'effetto opposto di stabilizzazione della particella, la cui degradazione è ulteriormente rallentata. Si riporta l'esempio di MSN *core* – *shell* funzionalizzate [46], ottenute tramite co-condensazione ritardata (procedimento riportato in Figura 79), in cui la *shell* espone gruppi tioli in superficie e il *core*, oltre al BTDS, presenta gruppi amminici.

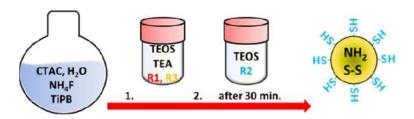


Figura 79: co-condensazione ritardata per la realizzazione di MSN core-shell funzionalizzate (R1 = APTES, R2 = MPTES, R3 = BTDS) [46]

La presenza del ponte disolfuro non promuove la degradazione della particella, né in PBS né in PBS e GSH, per qualunque percentuale di BDTS incorporata; le percentuali di degradazione in funzione del tempo sono riportate in Figura 80.

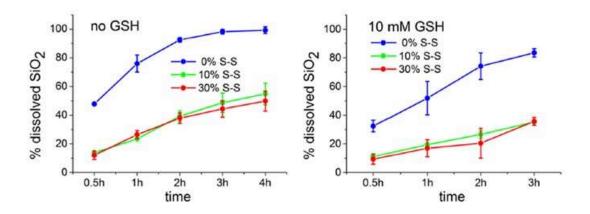


Figura 80: percentuali di dissoluzione in PBS (pH = 6,2) in ambiente non riducente e in presenza di GSH [46]. Le diverse curve si riferiscono a campioni con differenti percentuali di ponti disolfuro.

Probabilmente il motivo è che i ponti si trovano nascosti nella matrice in silice e i gruppi tioli superficiali creano un rivestimento idrofobico della particella. La differenza di degradazione tra MSN contenenti il ponte e quelle senza, nonostante entrambe abbiano i gruppi idrofobici in superficie, potrebbe essere dovuta al fatto che il ponte disolfuro è un legame covalente stabile che finché non viene spezzato mantiene la struttura più salda.

4.2 Legame carbammato

I ponti disolfuro sono scissi in ambiente riducente, per cui è necessario aggiungere dei reagenti come il GSH per stimolare la degradazione. Nel caso si volesse implementare un sistema che sia degradabile in acqua ad un rate maggiore rispetto a quelli tradizionali si potrebbe inserire un legame carbammato all'interno del framework di silice [150]. Il legame carbammato è costituito da un gruppo amminico e un gruppo estereo, che formano il legame – NH(CO)O – ; in condizioni neutre è soggetto a idrolisi.

Per inserire questo legame all'interno della particella viene preparato un precursore di silice, da usare insieme al TEOS, formato dall'unione di 3-isocianatopropiltrietossisilano (ICPTES) e sorbitolo. L'ICPTES contiene il gruppo (N=C=O), il sorbitolo è uno zucchero facilmente metabolizzato dal corpo umano avente formula $C_6H_{14}O_6$; la reazione tra i due è rappresentata in Figura 81, dove si vede che sono presenti due funzionalità carbammato.

Figura 81: formazione del precursore (ICPTES – sorbitolo) contenente il legame carbammato [150]

La funzionalizzazione avviene per co – condensazione dei due precursori, TEOS e ICPTES – sorbitolo, controllando il rapporto tra i due in modo da ottenere particelle sferiche e degradabili (eccesso di ICPTES – sorbitolo ostacola la formazione di particelle sferiche uniformi, mentre eccesso di TEOS limita la degradabilità). L'ICPTES – sorbitolo viene dissolto in etanolo, vengono aggiunti NH₄OH e TEOS, continuando l'agitazione per due ore a temperatura ambiente. Si ottengono particelle sferiche non porose del diametro di circa 122 nm.

La degradazione viene testata in acqua a pH neutro e in soluzioni acquose di acido cloridrico per modificare il pH (pH = 2 e pH = 4). A seguito dell'immersione in acqua cominciano a formarsi dei mesopori all'interno della particella, la cui presenza è verificata dalla curva di assorbimento di azoto, che da III tipo diventa di IV tipo. La dissoluzione procede dall'interno della particella, che mantiene la forma ancora per diversi giorni prima di degradare completamente; il processo si può osservare tramite immagini al TEM (Figura 82), le quali mostrano come la degradazione avvenga in tre mesi. Non si conosce la concentrazione alla quale le particelle sono disperse in acqua, per cui i tempi lunghi potrebbero essere dovuti a delle condizioni iniziali molto lontane da quelle di saturazione delle specie dissolte. Anche nella soluzione acquosa acida, a pH = 4, le particelle vengono frammentate in pezzi di forma irregolare e degradano nel giro di tre mesi.

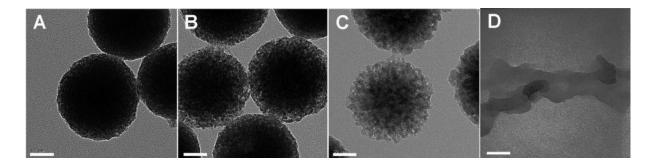


Figura 82: processo di degradazione in acqua (pH = 7) delle particelle contenenti il legame carbammato (A = 1g, B = 5g, C = 21g, D = 90g) [150]

L'idrolisi del legame carbammato lascia dei gruppi amminici esposti sulla matrice in silice, come si vede in Figura 83, che oltre a cambiare il potenziale zeta della particella (da negativo a positivo) potrebbero agire come buffer, come spiegato da Choi per il PEI [147], e creare un microambiente basico; questo spiegherebbe il perché la degradazione avviene anche a pH acidi, dove generalmente né il legame carbammato né la silice dissolvono.

Figura 83: idrolisi del precursore ICPTES – sorbitolo [150]

Si potrebbe provare se l'aggiunta di un tensioattivo durante la sintesi, per formare particelle mesoporose fin dall'inizio, sia un approccio attuabile oppure no per ottenere gli stessi risultati.

4.3 Molecola fotolabile

Un metodo non invasivo per stimolare la degradazione delle particelle è quello di inserire una molecola fotolabile che si rompa quando irradiata ad una certa lunghezza d'onda [138]. Il vantaggio di questo sistema è che è di facile controllo spazio – temporale: la particella mantiene la sua stabilità finché non arriva al sito di interesse e non si rompe se non è irradiata.

Nel processo di sintesi delle particelle viene aggiunta una molecola di bis-alcossisilano, rappresentata in Figura 84, contenente un gruppo etere nitro-benzenico.

Figura 84: bis-alcossisilano contenente il gruppo etere nitro-benzenico [138]

Il gruppo etere nitro-benzenico ha proprietà fisico-chimiche note perché è già stato utilizzato in altre applicazioni biomediche; inoltre, ha un impedimento sferico ridotto, per cui non impedisce la formazione di una mesostruttura ordinata. La scissione avviene quando il gruppo è colpito da luce UV a $\lambda = 327$ nm; l'ambiente acquoso accelera il procedimento di fotodegradazione [151]. La reazione è mostrata in Figura 85.

$$(EtO)_3Si \longrightarrow O \longrightarrow Si(OEt)_3 \xrightarrow{hv} Si(OEt)_3 \longrightarrow O \longrightarrow O \longrightarrow Si(OEt)_3$$

Figura 85: reazione di fotodegradazione della molecola fotolabile, che avviene in ambiente acquoso quando è irradiata da luce UV [138]

La sintesi delle particelle deve avvenire necessariamente al buio, si effettua la co-condensazione di TEOS e del bis-alcossisilano fotolabile (in rapporto molare 2,25:1), che vengono aggiunti ad una soluzione acquosa di CTAB, etanolo e ammoniaca; la soluzione rimane in agitazione a temperatura ambiente tutta la notte e l'estrazione del tensioattivo si esegue in reflusso per 24 h a 80°C in etanolo.

Si ottengono particelle sferiche di circa 300 nm, in cui è presente una mesostruttura non ordinata. Il diametro dei pori è di 2,4 nm mentre area superficiale e volume poroso sono più bassi rispetto a quelli delle particelle tradizionali (318 m²/g e 0,26 cm³/g); la quantità rilevata di componente organica, cioè quella del bis-alcossisilano, è del 30%wt.

La degradazione viene valutata disperdendo le particelle a concentrazione di 0,1 mg/ml in una soluzione di acqua ed etanolo: il rapporto tra i due liquidi è di 1:5 perché non si vuole indurre l'idrolisi della particella. A seguito di irradiazione con luce UV a $\lambda = 327$ nm la superficie delle particelle comincia ad apparire più ruvida, la degradazione procede dall'esterno, dopo 6 h si perde la forma e si formano piccoli detriti. Il meccanismo di degradazione è illustrato in Figura 86.

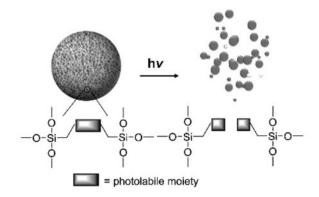


Figura 86: meccanismo di degradazione della particella [138]

Ripetendo lo stesso esperimento al buio si verifica la stabilità delle particelle, dimostrando che la degradazione avviene solo in presenza dello stimolo.

Capitolo 5: Influenza dell'incorporazione di farmaci

1. Introduzione

È stato già discusso come una delle applicazioni più diffuse nello studio della silice mesostrutturata sia quella di DDS: le particelle, caricate di farmaco, vengono introdotte all'interno del corpo e, una volta raggiunto il target, rilasciano il farmaco.

Le strategie più comuni per inserire il farmaco, o l'agente terapeutico, nel *carrier* si basano su tre principi:

i. Se le particelle sono porose, come sono quelle in OMS, il farmaco può essere introdotto all'interno dei pori. OMS tradizionale può trasportare circa 200-300 mg di agente terapeutico per grammo di silice o quantità anche superiori nel caso di particelle cave [32]. Inoltre, è possibile caricare anche farmaci diversi sullo stesso supporto. Il rilascio del farmaco avviene per diffusione e non è necessario che il *carrier* sia degradato.

Il farmaco può essere caricato immergendo la silice mesoporosa in una soluzione contenente il farmaco e mantenuta in agitazione per favorirne l'ingresso nei canali [2]. Oppure la soluzione di farmaco può essere nebulizzata tramite uno spray [152]. Tra le altre tecniche per caricare i farmaci, vi è anche l'utilizzo di CO₂ supercritica: il farmaco viene dissolto nel fluido supercritico e lasciato diffondere all'interno dei pori; quando il sistema viene depressurizzato il gas viene rimosso mentre il farmaco rimane imprigionato all'interno delle porosità del supporto [93].

Un vantaggio di utilizzare OMS come *carrier* è che all'interno dei pori i farmaci mantengono una forma amorfa, più solubile rispetto a quella cristallina (motivo per cui si utilizza questo tipo di sistema per migliorare la solubilità di farmaci scarsamente solubili in acqua [153]). Inoltre, il farmaco è protetto da idrolisi, ossidazione o altre forme di degradazione che potrebbe subire prima di arrivare a destinazione e svolgere il proprio ruolo. Lo svantaggio è che a volte le interazioni troppo deboli tra farmaci e matrice potrebbero causare un rilascio iniziale troppo veloce ("burst release") [93].

- ii. Il farmaco può essere adsorbito fisicamente o legato chimicamente alla superficie di particelle di silice, che quindi possono essere non porose o porose (OMS) [152]. Nel primo caso il farmaco sarà solamente sulle superfici esterne, mentre nel secondo può trovarsi anche all'interno delle porosità.
- iii. Le molecole di farmaco possono essere incorporate all'interno della matrice di silice amorfa, formando una struttura mista SiO₂/farmaco in cui il rilascio avviene in contemporanea alla degradazione della particella [154], [155]. Si tratta in questo caso di particelle non porose, due esempi sono proposti nel paragrafo 3.

Qualsiasi sia la tecnica di incorporazione usata, i meccanismi di rilascio sono principalmente due: desorbimento e diffusione controllata del farmaco dai pori, senza degradazione della matrice; oppure rilascio controllato dovuto alla degradazione della silice, sia per dissoluzione che per frammentazione, come schematizzato in Figura 87.

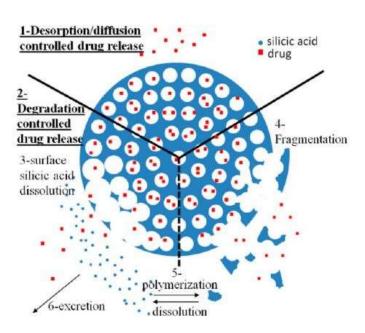


Figura 87: meccanismi possibili per il rilascio del farmaco [62]

La presenza del farmaco influisce in maniera evidente sulla degradazione del *carrier* di silice perché le molecole di farmaco riducono l'area superficiale accessibile e reattiva. L'area superficiale di una particella mesoporosa è prevalentemente dovuta ai mesopori; riempiendo i pori il comportamento di degradazione si avvicina a quello delle particelle non porose [64].

Inoltre, anche la natura del farmaco incorporato condiziona la cinetica di degradazione; per esempio, un farmaco idrofobico comporterà una dissoluzione più lenta della OMS perché ostacolerà l'entrata delle molecole di acqua all'interno delle porosità [68].

L'applicazione della OMS implica quasi necessariamente che ci sia un farmaco o un agente terapeutico al loro interno. L'utilità della OMS tal quali, infatti, è ridotta; in uno dei pochi studi di questo genere riportati in letteratura, per esempio, MSN sono state proposte per la guarigione delle ferite profonde, grazie all'effetto "ponte" tra nanoparticelle e matrice tissutale e al concomitante rilascio di acido silicico [156][102]. È opportuno, quindi, concentrarsi principalmente su OMS contenente farmaco e studiare come il coinvolgimento del farmaco influenzi il comportamento alla degradazione.

2. Farmaco introdotto nei pori della OMS

La strategia più comune è sicuramente quella di fabbricare nanoparticelle mesoporose e successivamente inserire il farmaco o l'agente terapeutico al loro interno; in questo modo non ci sono grandi vincoli sulla scelta del farmaco. L'interazione tra farmaco e *carrier* può essere modificata e modulata agendo sulla OMS, per esempio tramite funzionalizzazioni superficiali o sulla dimensione dei pori, oppure si può innescare il rilascio tramite stimoli esterni e interni [28].

Un'altra opzione per il rilascio controllato è l'utilizzo di *gatekeepers* per bloccare l'uscita del farmaco dai pori. Un esempio è quello dei sistemi di *capping* costituiti da multistrati di polimero: il primo strato è legato covalentemente alla matrice di silice e il secondo è legato in maniera labile ma in modo da ostacolare l'entrata e l'uscita dei pori; quando le condizioni ambientali cambiano il legame debole si rompe e i pori si liberano [93].

Il farmaco non è sempre di ostacolo alla degradazione, al contrario a volte la degradazione è agevolata dalla sua presenza. Per esempio, per quanto riguarda il fenomeno di occlusione che si era riscontrato nelle particelle di silice mesoporosa a causa della precipitazione del gel di silice all'interno dei pori quando immerse in SBF [88], si nota come la fuoriuscita del farmaco provochi una temporanea riapertura dei pori [157].

Un esempio della rilevanza e dell'utilità del farmaco all'interno di OMS si ritrova nello studio di Choi et al. [64] in cui si dimostra come la presenza della Doxorubicina (DOX) possa governare il processo di degradazione. In questo studio vengono preparati due tipi di particelle

di silice, una non porosa e una mesoporosa; una parte delle particelle mesoporose viene caricata di farmaco mediante immersione in una soluzione acquosa di farmaco. La sintesi delle particelle mesoporose (MSN) segue la procedura "classica" in ambiente basico: CTAB dissolto in acqua deionizzata e idrossido di sodio, soluzione agitata e scaldata fino ad 80°C, dopodiché si aggiunge il TEOS e dopo due ore di agitazione si raffredda fino a temperatura ambiente; il tensioattivo viene rimosso tramite estrazione in metanolo. La sintesi delle particelle non porose (SN) segue una procedura simile a quella di Stöber: soluzione di acqua, etanolo e idrossido di ammonio, aggiunta di TEOS e agitazione per due ore. Le principali caratteristiche (diametro delle particelle e dei pori, superficie specifica) delle particelle ottenute sono riportate in Tabella 17. La degradazione dei materiali così sintetizzati viene testata in PBS a 37°C, cambiando il mezzo ogni giorno.

Tabella 17: caratterizzazione delle particelle porose, non porose e caricate con il farmaco [64]

	Diametro (nm)	Area superficiale (m ² /g)	Diametro pori (nm)
MSN	169,5	1328,4	2,41
MSN – DOX	167,5	586,1	2,41
SN	188,6	46,5	n.a.

Come riportato in Figura 88, le MSN si degradano più in fretta rispetto alle SN grazie all'area superficiale maggiore, ma ad un certo punto la loro degradazione si ferma. Le SN inizialmente hanno rate di degradazione minore, ma il procedimento continua per più tempo, fino a raggiungere percentuali di silicio rilasciato più alte.

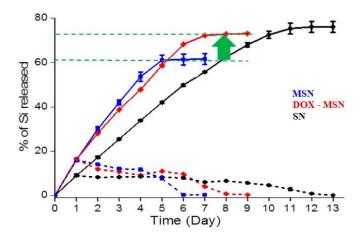


Figura 88: rilascio giornaliero (linea tratteggiata) e cumulativo (linea piena) di silicio in PBS [64]

La spiegazione di questo risultato può essere attribuita al fatto che la degradazione nelle particelle porose avviene principalmente dalle pareti porose: il diametro delle particelle rimane pressoché costante mentre il diametro dei pori si espande (Tabella 18), a mano a mano che l'erosione dalle pareti porose procede la particella finisce per collassare su se stessa, lasciando aggregati informi di particelle. Al contrario, la degradazione delle particelle non porose procede dalla superficie esterna, il diametro si riduce e l'area superficiale per unità di massa cresce Tabella 18), ma la forma è mantenuta più a lungo prima dell'aggregazione.

Le particelle caricate hanno un comportamento intermedio tra le MSN e le SN: la cinetica di degradazione iniziale è simile a quella delle MSN, anche se di poco inferiore a causa della minor area superficiale, ma la percentuale di silicio rilasciata raggiunge valori più alti, vicini a quelli delle SN. La presenza del farmaco all'interno dei pori ritarda il collasso della struttura, e di conseguenza la perdita della forma, consentendo un rilascio maggiore (e più prolungato nel tempo) di silicio.

Tabella 18: misurazioni effettuate dopo un giorno di esposizione al PBS [64]

	Diametro (nm)	Area superficiale (m ² /g)	Diametro pori (nm)
MSN	161,2	723,9	5,43
MSN – DOX	162,5	341,7	3,29
SN	172,9	72,3	n.a.

3. Farmaco incorporato nella matrice di silice delle particelle

I due requisiti fondamentali da garantire quando si utilizza un sistema di DDS sono:

- Rilascio controllato dell'agente terapeutico
- Degradazione ed eliminazione del *carrier*

Per soddisfarli entrambi, tra le soluzioni proposte c'è quella di fabbricare un *carrier* che abbia proprietà "autodistruttive": il rilascio del farmaco avviene in maniera controllata contemporaneamente alla degradazione della matrice, che a sua volta, oltre a guidare il rilascio del farmaco è determinata dalla sua uscita.

Un esempio di sistema autodistruttivo realizzato in silice è stato presentato da Zhang et al. nel 2013 [154] e ampliato da Zhao et al. nel 2015 [155].

3.1 Autodistruzione del carrier e simultaneo rilascio di farmaco

Le particelle studiate da Zhang e Zhao [154] [155] sono sferiche, di silice amorfa, non porose (Tabella 19) e sintetizzate tramite una procedura convenzionale modificata: soluzione di acqua, ammoniaca ed etanolo a cui si aggiunge una certa quantità di blu di metilene (MB) utilizzato come modello di farmaco; si introduce il TEOS e si tiene in agitazione per 24 h.

L'integrazione tra l'MB e la silice è possibile grazie alle cariche opposte delle due specie. Il modello di farmaco si dispone in maniera radiale: è presente, quindi, un gradiente di concentrazione dal centro della particella fino alla superficie esterna.

Tabella 19: caratterizzazione delle particelle [154]

	Dimensione (nm)	Area superficiale (m ² /g)	Volume poroso (cm ³ /g)	
SiO ₂ /MB	80	45,4	0.32	

Le particelle sono poi disperse ad una concentrazione di 1 mg/ml in una soluzione acquosa (PBS a 37°C). Dalle curve di rilascio del farmaco e di misurazione di silicio rilevato in soluzione si nota una correlazione tra i due processi, che sembrano avvenire in maniera simultanea (Figura 89).

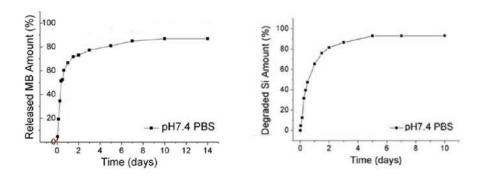


Figura 89: rilascio di MB e degradazione della silice [154]

La degradazione è innescata dal rilascio del MB, che comincia dal centro, dove è presente più farmaco e meno silice, formando una cavità interna che progressivamente si espande; rimane un guscio di silice e farmaco sempre più sottile che con il tempo si danneggia e collassa (Figura 90).

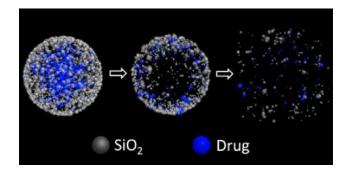


Figura 90: meccanismo contemporaneo di decomposizione della matrice e rilascio di farmaco [154]

3.2 Integrazione di due farmaci nella matrice

Il concetto di fondo dell'autodistruzione del *carrier* provocata dal rilascio di farmaco di Zhang [154] viene ripresa e migliorata da Zhao [155], aggiungendo uno strato esterno di farmaco alla particella, in particolare di Bleomicina (BLM). Il DDS caricato sia esternamente che internamente consente di avere un effetto immediato del farmaco sulla superficie e un rilascio ritardato del farmaco incorporato nella matrice.

La sintesi segue la procedura di Zhang, valutando l'effetto di alcune variazioni come la quantità di farmaco o la quantità di TEOS nella soluzione, e porta alla creazione di particelle sferiche in cui la concentrazione di farmaco è radiale con valori maggiori al centro. L'incorporazione del secondo farmaco avviene tramite immersione in soluzione (eventualmente la soluzione può contenere di nuovo il primo farmaco) (Figura 91).

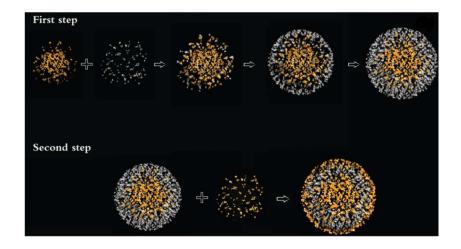


Figura 91: procedura di sintesi delle particelle con doppio caricamento [155]

Le particelle sono poi disperse in acqua deionizzata a 37°C sostituita giornalmente per garantire la massima degradazione. Il comportamento che si osserva è lo stesso riportato da Zhang [154], come si vede dalla Figura 92: la degradazione parte dall'interno e procede assottigliando il guscio della particella. Il fatto che la particella mantenga la sua dimensione per tutto il tempo prima di collassare è un vantaggio, perché in questa maniera si evita l'escrezione del *carrier* prima che sia stato completato il rilascio.

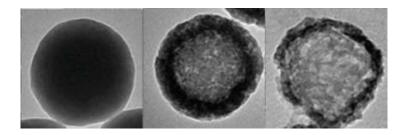


Figura 92: immagini al TEM che mostrano la degradazione della particella immersa in acqua [155]

La quantità di TEOS utilizzato nella sintesi delle particelle ne modifica il comportamento: per quantità maggiori si forma un network di silice più denso, il farmaco fa più fatica ad uscire e anche la degradazione è più lenta. Al contrario, impiegare quantità maggiori di farmaco ne velocizza il rilascio e, di conseguenza, la degradazione del *carrier*.

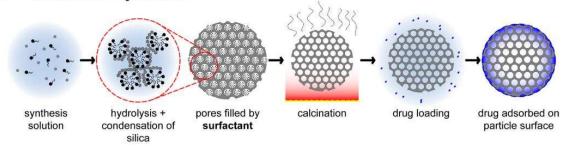
I sistemi proposti sono validi, ma presentano delle limitazioni: innanzitutto il farmaco deve poter interagire con la silice (ad esempio tramite interazioni elettrostatiche), altrimenti non verrebbe incorporato; inoltre, le condizioni di sintesi decisamente non blande potrebbero denaturare alcuni tipi di farmaco.

4. Farmaco utilizzato come agente di template

Un altro approccio possibile è quello di progettare un sistema in cui una molecola funzioni sia da agente templante che da agente terapeutico, come è stato proposto da Fontecave et al. nel 2013 [152] e da Stewart et al. nel 2018 [158].

In Figura 93 si può vedere lo schema di preparazione di questo tipo di silice mesoporosa confrontata con quella di OMS tradizionale.

a Traditional Synthesis



b Drug-Templated Synthesis

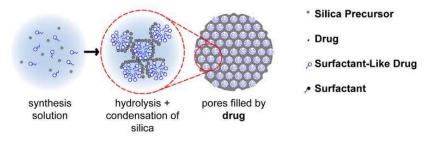


Figura 93: schema di preparazione della OMS per il trasporto di farmaci [158]

I vantaggi sono molteplici, ma in particolare se ne elencano quattro:

- Sintesi one step: non è necessario fabbricare prima le particelle, poi calcinarle e infine caricarle di farmaco, in un solo passaggio si realizza OMS che contiene il farmaco;
- Alto caricamento di farmaco, maggiore rispetto a quello che può essere introdotto nei mesopori di OMS già formata, perché la tortuosità della mesostruttura rende il percorso di diffusione più lungo;
- Riduzione della quantità di matrice inorganica e, di conseguenza, della tossicità che potrebbe provocare;
- Utilizzare direttamente il farmaco come template riduce il problema di tossicità associato ai residui di tensioattivo che possono essere ancora presenti.

Il limite di questo sistema è di nuovo legato alla scelta del farmaco che deve essere anfifilico e formare micelle in ambiente acquoso, cioè deve agire come un tensioattivo; inoltre, è necessario anche in questo caso verificare che le molecole di farmaco non vengano danneggiate durante il processo di sintesi.

I seguenti paragrafi riportano i principali risultati degli studi di Fontecave e Stewart.

4.1 Drug – Templating: Film

Nello studio di Fontecave sono utilizzati tre diversi farmaci costituiti da molecole anfifiliche, Stearoil – ioduro di colina (SC), Glicosil – Resveratrolo (GR) e Sophorolipids (SL), per la realizzazione di silice mesoporosa in forma di film. La sintesi si svolge in ambiente acido e in presenza di etanolo; il rapporto molare tra precursore di silice (TEOS) e agente di template non è uguale nei tre casi, ma ottimizzato in modo da ottenere una mesostruttura migliore (Tabella 20); la soluzione viene versata su un wafer di silicio e lasciata due giorni a 70°C.

Tabella 20: rapporti molari delle soluzioni di sintesi usate nel lavoro di Fontecave [152]

	TEOS	farmaco	H ₂ O	EtOH	HCl
Film_SC	1	0,18	5	60	1,1
Film_GR	1	0,17	5	60	1,1
Film_SL	1	0,06	5	60	1,1

Le prove di degradazione sono effettuate in PBS a 37°C (1 cm² di film in 50 ml di soluzione) e le misurazioni sono eseguite tramite analisi ellissometrica; dai dati ottenuti si calcola la frazione volumetrica residua di silice per monitorarne la dissoluzione.

Il GR e l'SL hanno teste idrofiliche simili e interagiscono con la matrice di silice allo stesso modo, prevalentemente tramite legami ad idrogeno, ma il rilascio di GR avviene due volte più velocemente rispetto all'SL (Figura 94). I due film si differenziano per la qualità della mesostruttura: il *Film_SL* ha una porosità che segue una struttura esagonale 2D, con diametro dei pori di 2,1 nm; nel *Film_GR*, invece, si forma una mesostruttura di bassa qualità, con diametro dei pori compreso tra 2 e 6 nm, a causa dei gruppi fenoli presenti nelle code idrofobiche che interagiscono con la silice e ostacolano la formazione delle micelle. La mesostruttura più omogenea agevola un rilascio più lento ma più controllato del farmaco, mentre la mesostruttura disomogenea conduce ad un rilascio iniziale veloce.

Anche l'SC produce una mesostruttura omogenea, in questo caso del tipo *worm-like* con dimensione dei pori di 2,4 nm, ma le interazioni tra il farmaco e la silice sono elettrostatiche, più forti rispetto al legame ad idrogeno, di conseguenza il rilascio di SC è molto più lento (Figura 94). È una scoperta interessante perché grazie a interazioni forti tra farmaco e matrice

si può garantire una cinetica di rilascio di farmaco e dissoluzione del *carrier* più lenta, nonostante la silice non sia altamente condensata (non è stata calcinata).

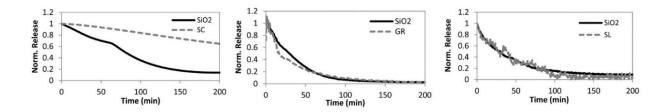


Figura 94: profili di rilascio di farmaco e di silice dopo immersione in PBS [152]

Come anticipato, le differenze tra le curve di dissoluzione della silice del Film_SL e del Film_SC mostrate in Figura 94 sono dovute alle diverse interazioni farmaco/matrice. Nel caso del Film_SL le molecole di acqua diffondono facilmente nell'interfase e promuovono il rilascio di farmaco e la dissoluzione della silice perché possono competere nella formazione del legame a idrogeno; il discorso può essere applicato anche ad altri farmaci idrofilici caricati su OMS tradizionale. Nel caso del Film_SC l'interfase è più idrofobica, le molecole di acqua non sono spinte ad entrare e diffondere, il rilascio è dovuto al semplice desorbimento delle molecole di farmaco e la dissoluzione della silice, prima lenta, accelera grazie all'area superficiale esposta che aumenta; succede lo stesso quando si caricano farmaci idrofobici su OMS.

4.2 Drug – Templating: Nanoparticelle

La ricerca di Stewart applica il meccanismo di *drug – templating* per fabbricare nanoparticelle sferiche mesoporose, impiegando l'octenidina dicloridrato (OCT) come agente surfattante; lo scopo della ricerca era di progettare un sistema ad alto contenuto di farmaco, maggiore di quello raggiungibile da MSN tradizionali. Lo studio, purtroppo, non indaga la degradabilità delle particelle ottenute.

La sintesi segue una procedura classica: tensioattivo (OCT) dissolto in acqua e idrossido di sodio, soluzione mantenuta in agitazione e aggiunta del TEOS; si lascia a riposo un giorno intero a temperatura ambiente e altre 24 h in stufa a 65°C.

Rapporti molari → 1TEOS:0,03OCT:0,052NaOH:150H₂O

Si ottengono particelle sferiche che nelle immagini TEM appaiono non porose; a seguito dell'estrazione dell'OCT si riscontra una mesostruttura disordinata, con distribuzione dimensionale dei pori trimodale, ma la distribuzione spaziale delle micelle di OCT all'interno della struttura è uniforme (Tabella 21).

Tabella 21: confronto tra MSN fabbricate per *drug templating* e MSN tradizionali, le misurazioni di area superficiale, volume poroso e dimensione dei pori sono state effettuate a seguito del rilascio di OCT [158]

	Dimensione (nm)	Area superficiale (m²/g)	Volume poroso (cm³/g)	Dimensione pori (nm)	Quantità di OCT
OCT – MSN	425	856	0,47	1,4 – 1,7 – 2,0	~ 35%
MSN	71	1098	1,08	n.a.	< 1%

Il vantaggio di questo sistema è che il rilascio di farmaco è più duraturo (le forti interazioni tra farmaco e silice ne rallentano l'uscita) e più prevedibile rispetto a quello dei materiali caricati in un secondo momento.

Il rilascio del farmaco avviene comunque per diffusione e non per degradazione della silice: infatti i lunghi tempi di *aging* delle particelle potrebbero aver reso la silice molto condensata e più stabile in soluzioni acquose; sarebbe interessante valutare come i tempi di *aging* influiscono sulla dissoluzione della matrice.

Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro consiste nella comprensione dei meccanismi che governano la degradazione della silice mesoporosa, in particolare sottoforma di particelle, e delle strategie che si possono adottare per controllarla, in modo che sia il più idoneo possibile alla funzione attribuita al materiale.

La silice mesoporosa ordinata è potenzialmente una candidata promettente per essere usata come *carrier* di farmaci, grazie alle numerose proprietà vantaggiose che possiede:

- **Dimensione e morfologia regolabili**, anche nella stessa scala dimensionale delle cellule dei sistemi viventi in modo da consentire interazioni più strette.
- Area superficiale e volume poroso ampi, che garantiscono grandi capacità di incorporazione di farmaci o altri agenti terapeutici.
- Disposizione porosa ordinata e dimensione dei pori controllabile, per avere un controllo preciso del profilo farmacocinetico.
- Facilità di funzionalizzazione e composizione chimica variabile, in modo da fornirla di un comportamento reattivo agli stimoli.

Nonostante ciò, i *trials* clinici che comprendano la OMS sono molto rari [159], perché alcuni limiti non sono ancora stati superati. Primo fra tutti la riproducibilità e l'impossibilità di effettuare confronti affidabili tra sistemi diversi [159]. Si è visto, infatti, come a volte seguendo le stesse procedure di sintesi le caratteristiche strutturali delle particelle ottenute non fossero uguali. Per poter essere testata su larga scala una nanotecnologia deve essere scalabile [16], sia per quanto riguarda i costi sia per la riproducibilità; tuttavia i fattori che entrano in gioco durante i processi di sintesi sono ancora tanti e probabilmente, almeno per il momento, non sempre controllabili.

Il secondo problema coinvolge l'eliminazione dal corpo in breve tempo a seguito della somministrazione; in questo elaborato si è cercato di indagare quale fosse il destino della silice in risposta all'interazione con l'ambiente fisiologico, concentrandosi su prove di degradazione

in vitro. Il risultato è tutt'altro che univoco, i fattori coinvolti sono tanti e diversi, cambiarne anche solo uno conduce a esiti differenti.

Gli studi che si possono reperire in letteratura non danno risposte univoche, e spesso capire quali siano i motivi delle differenze non è così semplice. Lo stesso tipo di materiale, per esempio, può mostrare un comportamento bioattivo oppure no, la struttura mesoporosa durante la degradazione può collassare o può essere preservata, alcuni ioni in soluzione possono comportarsi in maniera da promuovere o da inibire la degradazione.

Avvalersi delle funzionalizzazioni e delle modifiche della composizione chimica della silice è sicuramente una buona strategia, sia per quanto riguarda il controllo della degradazione sia perché difficilmente la OMS verrebbe impiegata così com'è. In questo modo è possibile regolare la degradazione della silice, per renderla più o meno stabile in ambiente fisiologico, ma anche per renderla dipendente da stimoli, come è stato affrontato nel Capitolo 4.

Non bisogna dimenticare che la presenza del farmaco all'interno dei mesopori influisce su come il materiale interagisce con l'ambiente e di conseguenza sulla cinetica e sul meccanismo di degradazione; l'argomento è stato discusso nel Capitolo 5, ma, purtroppo, gli studi disponibili che indagano la degradazione delle particelle spesso non prendono in considerazione questo aspetto.

Concludendo, la questione della degradazione della OMS dovrebbe essere approfondita ulteriormente, magari effettuando confronti che ancora non sono stati svolti, per esempio l'influenza del tempo di *aging* o valutare che effetto hanno la centrifugazione e il processo di asciugatura, che spesso subiscono le particelle a seguito della sintesi. Inoltre, un'idea auspicabile sarebbe quella di creare dei protocolli standard per le prove di degradazione, in modo che sia possibile effettuare comparazioni tra materiali diversi; test di degradabilità standardizzati renderebbero il confronto più semplice e più significativo.

Bibliografia

- [1] R. M. Sábio, A. B. Meneguin, T. C. Ribeiro, R. R. Silva, and M. Chorilli, "New insights towards mesoporous silica nanoparticles as a technological platform for chemotherapeutic drugs delivery," *International Journal of Pharmaceutics*. 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.067.
- [2] V. Mamaeva, C. Sahlgren, and M. Lindén, "Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 5, pp. 689–702, 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.07.018.
- [3] M. Vallet-Regí, "Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine," *J. Intern. Med.*, vol. 267, no. 1, pp. 22–43, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02190.x.
- [4] Y. Zhou *et al.*, "Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 8, no. 2, pp. 165–177, 2018, doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.007.
- [5] F. Farjadian, A. Roointan, S. Mohammadi-Samani, and M. Hosseini, "Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment," *Chem. Eng. J.*, vol. 359, no. June 2018, pp. 684–705, 2019, doi: 10.1016/j.cej.2018.11.156.
- [6] M. E. Davis, "Ordered porous materials for emerging applications," *Nature*. 2002, doi: 10.1038/nature00785.
- [7] A. D. McNaught and A. Wilkinson, *IUPAC*. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). 1997.
- [8] M. Vallet-Regí, F. Balas, and D. Arcos, "Mesoporous materials for drug delivery," *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, doi: 10.1002/anie.200604488.
- [9] S. Wang, "Ordered mesoporous materials for drug delivery," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 117, no. 1–2, pp. 1–9, 2009, doi: 10.1016/j.micromeso.2008.07.002.
- [10] E. Verné et al., "Bioactive Glass-Ceramic/Mesoporous Silica Composite Scaffolds for Bone Grafting and Drug Release," Nanostructured Materials and Systems. pp. 123– 129, 23-Jun-2010, doi: https://doi.org/10.1002/9780470909812.ch14.

- [11] R. Mortera and B. Onida, "Drug Delivery from Ordered Mesoporous Matrices for Bone Tissue Engineering," *Surf. Tailoring Inorg. Mater. Biomed. Appl.*, pp. 346–358, 2012.
- [12] N. Shadjou and M. Hasanzadeh, "Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials:Recent progress," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 401–409, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.05.027.
- [13] M. Vallet-Regi, A. Rámila, R. P. Del Real, and J. Pérez-Pariente, "A new property of MCM-41: Drug delivery system," *Chem. Mater.*, vol. 13, no. 2, pp. 308–311, 2001, doi: 10.1021/cm0011559.
- [14] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, and S. Garg, "Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–49, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030118.
- [15] M. Manzano and M. Vallet-Regí, "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 2, pp. 3–5, 2020, doi: 10.1002/adfm.201902634.
- [16] M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, and M. Manzano, "Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: Current insights," *Molecules*, vol. 23, no. 1. pp. 1–19, 2018, doi: 10.3390/molecules23010047.
- [17] Y. Choi, J. E. Lee, J. H. Lee, J. H. Jeong, and J. Kim, "A Biodegradation Study of SBA-15 Microparticles in Simulated Body Fluid and in Vivo," *Langmuir*, vol. 31, no. 23, pp. 6457–6462, 2015, doi: 10.1021/acs.langmuir.5b01316.
- [18] P. Horcajada, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, and M. Vallet-Regí, "Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate," *Microporous Mesoporous Mater.*, 2004, doi: 10.1016/j.micromeso.2003.12.012.
- [19] G. Yang, S. Z. F. Phua, A. K. Bindra, and Y. Zhao, "Degradability and Clearance of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications," *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 10, pp. 1–23, 2019, doi: 10.1002/adma.201805730.
- [20] A. Watermann and J. Brieger, "Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery vehicles in cancer," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 7, 2017, doi: 10.3390/nano7070189.
- [21] S. Jafari, H. Derakhshankhah, L. Alaei, A. Fattahi, B. S. Varnamkhasti, and A. A.

- Saboury, "Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, no. August 2018, pp. 1100–1111, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.167.
- [22] A. Hoppe, N. S. Güldal, and A. R. Boccaccini, "A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics," *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 2757–2774, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.
- [23] T. Asefa and Z. Tao, "Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, no. 11, pp. 2265–2284, 2012, doi: 10.1021/tx300166u.
- [24] J. Lu, M. Liong, Z. Li, J. I. Zink, and F. Tamanoi, "Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals," *Small*, vol. 6, no. 16, pp. 1794–1805, 2010, doi: 10.1002/smll.201000538.
- [25] F. Tang, L. Li, and D. Chen, "Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery," *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, 2012, doi: 10.1002/adma.201104763.
- [26] J. G. Croissant, Y. Fatieiev, and N. M. Khashab, "Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles," *Adv. Mater.*, vol. 29, no. 9, 2017, doi: 10.1002/adma.201604634.
- [27] S. P. Hudson, R. F. Padera, R. Langer, and D. S. Kohane, "The biocompatibility of mesoporous silicates," *Biomaterials*, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.07.007.
- [28] Y. Song, Y. Li, Q. Xu, and Z. Liu, "Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: Advances, challenges, and outlook," *International Journal of Nanomedicine*. 2017, doi: 10.2147/ijn.s117495.
- [29] K. S. Finnie *et al.*, "Biodegradability of sol-gel silica microparticles for drug delivery," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 49, no. 1, pp. 12–18, 2009, doi: 10.1007/s10971-008-1847-4.
- [30] E. B. Ehlerding, F. Chen, and W. Cai, "Biodegradable and renal clearable inorganic nanoparticles," *Adv. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1002/advs.201500223.
- [31] V. Cauda, A. Schlossbauer, and T. Bein, "Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol)," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 132, no. 1–2, pp.

- 60–71, 2010, doi: 10.1016/j.micromeso.2009.11.015.
- [32] C. Bharti, N. Gulati, U. Nagaich, and A. Pal, "Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review," *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 5, no. 3, p. 124, 2015, doi: 10.4103/2230-973x.160844.
- [33] J. M. Kim and R. Ryoo, "Disintegration of mesoporous structures of MCM-41 and MCM-48 in water," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 17, no. 1. pp. 66–68, 1996.
- [34] G. B. Alexander, W. M. Heston, and R. K. Iler, "The solubility of amorphous silica in water," *J. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 6, pp. 453–455, 1954, doi: 10.1021/j150516a002.
- [35] X. Du, F. Kleitz, X. Li, H. Huang, X. Zhang, and S. Z. Qiao, "Disulfide-Bridged Organosilica Frameworks: Designed, Synthesis, Redox-Triggered Biodegradation, and Nanobiomedical Applications," *Adv. Funct. Mater.*, 2018, doi: 10.1002/adfm.201707325.
- [36] J. A. Cecilia, R. M. Tost, and M. R. Millán, "Mesoporous materials: From synthesis to applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 13, pp. 20–23, 2019, doi: 10.3390/ijms20133213.
- [37] B. Singh *et al.*, "Functional Mesoporous Silica Nanomaterials for Catalysis and Environmental Applications," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 93, no. 12, pp. 1459–1496, 2020, doi: 10.1246/bcsj.20200136.
- [38] S. H. Wu and H. P. Lin, "Synthesis of mesoporous silica nanoparticles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 9, pp. 3862–3875, 2013, doi: 10.1039/c3cs35405a.
- [39] A. Mehmood, H. Ghafar, S. Yaqoob, U. F. Gohar, and B. Ahmad, "Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review," *J. Dev. Drugs*, vol. 06, no. 02, 2017, doi: 10.4172/2329-6631.1000174.
- [40] J. L. Paris, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Manzano, and M. Vallet-Regí, "Tuning mesoporous silica dissolution in physiological environments: a review," *J. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 15, pp. 8761–8771, 2017, doi: 10.1007/s10853-017-0787-1.
- [41] S. Nafisi, M. Schäfer-Korting, and H. I. Maibach, "Perspectives on percutaneous penetration: Silica nanoparticles," *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 5, pp. 643–657, 2015, doi: 10.3109/17435390.2014.958115.

- [42] H. Nabeshi *et al.*, "Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application," *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 2713–2724, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.042.
- [43] C. Buzea, I. I. Pacheco, and K. Robbie, "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity," *Biointerphases*, vol. 2, no. 4, pp. MR17–MR71, 2007, doi: 10.1116/1.2815690.
- [44] J. G. Croissant, Y. Fatieiev, A. Almalik, and N. M. Khashab, "Mesoporous Silica and Organosilica Nanoparticles: Physical Chemistry, Biosafety, Delivery Strategies, and Biomedical Applications," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1–75, 2018, doi: 10.1002/adhm.201700831.
- [45] C. Vautier-Giongo and H. O. Pastore, "Micellization of CTAB in the presence of silicate anions and the exchange between bromide and silicate at the micelle surface: A step to understand the formation of mesoporous molecular sieves at extremely low surfactant and silicate concentrations," *J. Colloid Interface Sci.*, 2006, doi: 10.1016/j.jcis.2006.02.040.
- [46] K. Möller and T. Bein, "Degradable Drug Carriers: Vanishing Mesoporous Silica Nanoparticles," *Chem. Mater.*, vol. 31, no. 12, pp. 4364–4378, Jun. 2019, doi: 10.1021/acs.chemmater.9b00221.
- [47] E. Molina *et al.*, "pH-mediated control over the mesostructure of ordered mesoporous materials templated by polyion complex micelles," *Beilstein J. Nanotechnol*, vol. 10, pp. 144–156, 2019, doi: 10.3762/bjnano.10.14.
- [48] N. Pal and A. Bhaumik, "Soft templating strategies for the synthesis of mesoporous materials: Inorganic, organic-inorganic hybrid and purely organic solids," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 189–190, pp. 21–41, 2013, doi: 10.1016/j.cis.2012.12.002.
- [49] H. P. Lin and C. Y. Mou, "Structural and morphological control of cationic surfactant-templated mesoporous silica," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 11, pp. 927–935, 2002, doi: 10.1021/ar000074f.
- [50] E. Yamamoto and K. Kuroda, "Colloidal mesoporous silica nanoparticles," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 89, no. 5, pp. 501–539, 2016, doi: 10.1246/bcsj.20150420.
- [51] K. Chen, J. Zhang, and H. Gu, "Dissolution from inside: A unique degradation

- behaviour of core-shell magnetic mesoporous silica nanoparticles and the effect of polyethyleneimine coating," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 41, pp. 22005–22012, 2012, doi: 10.1039/c2jm34364a.
- [52] M. Kong *et al.*, "Biodegradable hollow mesoporous silica nanoparticles for regulating tumor microenvironment and enhancing antitumor efficiency," *Theranostics*, vol. 7, no. 13, pp. 3276–3292, 2017, doi: 10.7150/thno.19987.
- [53] X. Zhou *et al.*, "Synthesis of hollow mesoporous silica nanoparticles with tunable shell thickness and pore size using amphiphilic block copolymers as core templates," *Dalt. Trans.*, vol. 43, no. 31, pp. 11834–11842, 2014, doi: 10.1039/c4dt01138d.
- [54] D. Shen *et al.*, "Biphase stratification approach to three-dimensional dendritic biodegradable mesoporous silica nanospheres," *Nano Lett.*, vol. 14, no. 2, pp. 923–932, 2014, doi: 10.1021/nl404316v.
- [55] B. Yang, Y. Chen, and J. Shi, "Mesoporous silica/organosilica nanoparticles: Synthesis, biological effect and biomedical application," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 137, no. January, pp. 66–105, 2019, doi: 10.1016/j.mser.2019.01.001.
- [56] E. Bindini, "Understanding in vivo degradation of mesoporous silica therapeutic vectors through in situ ellipsometry," 2018.
- [57] A. Martins, A. S. Monteiro, and M. Chorilli, "Microporous and Mesoporous Materials Exploiting mesoporous silica nanoparticles as versatile drug carriers for several routes of administration," no. July, 2020, doi: 10.1016/j.micromeso.2020.110774.
- [58] A. Nigro *et al.*, "Dealing with skin and blood-brain barriers: The unconventional challenges of mesoporous silica nanoparticles," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040250.
- [59] K. Braun, A. Pochert, M. Beck, R. Fiedler, J. Gruber, and M. Lindén, "Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 79, no. 2, pp. 319–327, 2016, doi: 10.1007/s10971-016-4053-9.
- [60] M. Vert *et al.*, "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012)," *Pure Appl. Chem.*, 2012, doi: 10.1351/pac-rec-10-12-04.
- [61] W. Utembe, K. Potgieter, A. B. Stefaniak, and M. Gulumian, "Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials,"

- Particle and Fibre Toxicology. 2015, doi: 10.1186/s12989-015-0088-2.
- [62] T. Fontecave, C. Sanchez, T. Azaïs, and C. Boissiére, "Chemical modification as a versatile tool for tuning stability of silica based mesoporous carriers in biologically relevant conditions," *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 22, pp. 4326–4336, 2012, doi: 10.1021/cm302142k.
- [63] S. K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S. N. Luoma, and E. Valsami-Jones, "The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies," *Sci. Total Environ.*, vol. 438, pp. 225–232, 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.066.
- [64] E. Choi and S. Kim, "How Can Doxorubicin Loading Orchestrate in Vitro Degradation Behaviors of Mesoporous Silica Nanoparticles under a Physiological Condition?," *Langmuir*, vol. 33, no. 20, pp. 4974–4980, 2017, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b00332.
- [65] M. R. C. Marques, R. Loebenberg, and M. Almukainzi, "Simulated Fluids," *Dissolution Technol.*, vol. 18, no. 3, pp. 15–28, 2011.
- [66] A. Galarneau, M. Nader, F. Guenneau, F. Di Renzo, and A. Gedeon, "Understanding the stability in water of mesoporous SBA-15 and M CM-41," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 23, pp. 8268–8277, 2007, doi: 10.1021/jp068526e.
- [67] Y. Lin, N. Abadeer, and C. L. Haynes, "Stability of small mesoporous silica nanoparticles in biological media w z," pp. 532–534, 2011, doi: 10.1039/c0cc02923h.
- [68] E. Bindini *et al.*, "Following in Situ the Degradation of Mesoporous Silica in Biorelevant Conditions: At Last, a Good Comprehension of the Structure Influence," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 12, pp. 13598–13612, 2020, doi: 10.1021/acsami.9b19956.
- [69] C. Fu, T. Liu, L. Li, H. Liu, D. Chen, and F. Tang, "The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes," *Biomaterials*, vol. 34, no. 10, pp. 2565–2575, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.043.
- [70] H. Yamada, C. Urata, Y. Aoyama, S. Osada, Y. Yamauchi, and K. Kuroda, "Preparation of colloidal mesoporous silica nanoparticles with different diameters and their unique degradation behavior in static aqueous systems," *Chem. Mater.*, vol. 24,

- no. 8, pp. 1462–1471, 2012, doi: 10.1021/cm3001688.
- [71] C. Thibaud, E. David, and L. Jacques, "The silicomolybdic acid spectrophotometric method and its application to silicate/biopolymer interaction studies," *Spectroscopy*, vol. 18, no. 4, pp. 567–576, 2004.
- [72] H. Yang *et al.*, "Molybdenum blue photometry method for the determination of colloidal silica and soluble silica in leaching solution," *Anal. Methods*, 2015, doi: 10.1039/c5ay01306b.
- [73] M. Kruk, M. Jaroniec, Y. Sakamoto, O. Terasaki, R. Ryoo, and C. H. Ko, "Determination of Pore Size and Pore Wall Structure of MCM-41 by Using Nitrogen Adsorption, Transmission Electron Microscopy, and X-ray Diffraction," *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, no. 2, pp. 292–301, 2000, doi: 10.1021/jp992718a.
- [74] L. Li, T. Liu, C. Fu, L. Tan, X. Meng, and H. Liu, "Biodistribution, excretion, and toxicity of mesoporous silica nanoparticles after oral administration depend on their shape," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 8, pp. 1915–1924, 2015, doi: 10.1016/j.nano.2015.07.004.
- [75] O. Terasaki, T. Ohsuna, Z. Liu, Y. Sakamoto, and A. E. Garcia-Bennett, "Structural study of meso-porous materials by electron microscopy," in *Studies in Surface Science and Catalysis*, 2004, doi: 10.1016/s0167-2991(04)80201-5.
- [76] M. Dietzel, "Dissolution of silicates and the stability of polysilicic acid," *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2000, doi: 10.1016/S0016-7037(00)00426-9.
- [77] B. C. Bunker, "Molecular mechanisms for corrosion of silica and silicate glasses," *J. Non. Cryst. Solids*, 1994, doi: 10.1016/0022-3093(94)90708-0.
- [78] H. Ehrlich, K. D. Demadis, O. S. Pokrovsky, and P. G. Koutsoukos, "Modern views on desilicification: Biosilica and abiotic silica dissolution in natural and artificial environments," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 8, pp. 4656–4689, 2010, doi: 10.1021/cr900334y.
- [79] A. Rimola, D. Costa, M. Sodupe, J. F. Lambert, and P. Ugliengo, "Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: Computational modeling and experiments," *Chem. Rev.*, vol. 113, no. 6, pp. 4216–4313, 2013, doi: 10.1021/cr3003054.

- [80] S. Léonardelli, L. Facchini, C. Fretigny, P. Tougne, and A. P. Legrand, "Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Study of Silica," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 16, pp. 6412–6418, 1992, doi: 10.1021/ja00042a018.
- [81] P. M. Dove, N. Han, A. F. Wallace, and J. J. De Yoreo, "Kinetics of amorphous silica dissolution and the paradox of the silica polymorphs," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 29, pp. 9903–9908, 2008, doi: 10.1073/pnas.0803798105.
- [82] A. L. T. Pham, D. L. Sedlak, and F. M. Doyle, "Dissolution of mesoporous silica supports in aqueous solutions: Implications for mesoporous silica-based water treatment processes," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 126, pp. 258–264, 2012, doi: 10.1016/j.apcatb.2012.07.018.
- [83] R. Finsy, "On the critical radius in Ostwald ripening," *Langmuir*, 2004, doi: 10.1021/la035966d.
- [84] U. Bernauer *et al.*, "Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) Revision of the opinion on the safety of the use of Silica, Hydrated Silica, and Silica Surface Modified with Alkyl Silylates (nano form) in cosmetic products," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016, doi: 10.1016/j.yrtph.2015.11.005.
- [85] J. P. Icenhower and P. M. Dove, "The dissolution kinetics of amorphous silica into sodium chloride solutions: Effects of temperature and ionic strength," *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2000, doi: 10.1016/S0016-7037(00)00487-7.
- [86] Q. He, J. Shi, M. Zhu, Y. Chen, and F. Chen, "The three-stage in vitro degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 131, no. 1–3, pp. 314–320, 2010, doi: 10.1016/j.micromeso.2010.01.009.
- [87] S. Seré *et al.*, "Altering the Biodegradation of Mesoporous Silica Nanoparticles by Means of Experimental Parameters and Surface Functionalization," *J. Nanomater.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/7390618.
- [88] R. Mortera, S. Fiorilli, E. Garrone, E. Verné, and B. Onida, "Pores occlusion in MCM-41 spheres immersed in SBF and the effect on ibuprofen delivery kinetics: A quantitative model," *Chem. Eng. J.*, vol. 156, no. 1, pp. 184–192, 2010, doi: 10.1016/j.cej.2009.10.018.
- [89] D. Rébiscoul, J. Cambedouzou, M. Brossel, M. Baum, and S. Szenknect, "Evolution of

- Silica Walls of Nanopores Filled with Water and Ions," *Procedia Earth Planet. Sci.*, vol. 17, pp. 88–91, 2017, doi: 10.1016/j.proeps.2016.12.005.
- [90] X. Li, L. Zhang, X. Dong, J. Liang, and J. Shi, "Preparation of mesoporous calcium doped silica spheres with narrow size dispersion and their drug loading and degradation behavior," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 102, no. 1–3, pp. 151–158, 2007, doi: 10.1016/j.micromeso.2006.12.048.
- [91] C. P. Guthrie and E. J. Reardon, "Metastability of MCM-41 and Al-MCM-41," *J. Phys. Chem. A*, vol. 112, no. 15, pp. 3386–3390, 2008, doi: 10.1021/jp710434y.
- [92] D. Bhavsar, V. Patel, and K. Sawant, "Systemic investigation of in vitro and in vivo safety, toxicity and degradation of mesoporous silica nanoparticles synthesized using commercial sodium silicate," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 284, no. April, pp. 343–352, 2019, doi: 10.1016/j.micromeso.2019.04.050.
- [93] A. Bakhshian Nik *et al.*, "Smart drug delivery: Capping strategies for mesoporous silica nanoparticles," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 299, p. 110115, 2020, doi: 10.1016/j.micromeso.2020.110115.
- [94] M. V. Landau *et al.*, "Wetting stability of Si-MCM-41 mesoporous material in neutral, acidic and basic aqueous solutions," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 33, no. 1–3, pp. 149–163, 1999, doi: 10.1016/S1387-1811(99)00133-X.
- [95] J. D. Bass, D. Grosso, C. Boissiere, E. Belamie, T. Coradin, and C. Sanchez, "Stability of mesoporous oxide and mixed metal oxide materials under biologically relevant conditions," *Chem. Mater.*, vol. 19, no. 17, pp. 4349–4356, 2007, doi: 10.1021/cm071305g.
- [96] X. Huang, N. P. Young, and H. E. Townley, "Characterization and comparison of mesoporous silica particles for optimized drug delivery," *Nanomater. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–15, 2014, doi: 10.5772/58290.
- [97] Y. S. Lin, K. R. Hurley, and C. L. Haynes, "Critical considerations in the biomedical use of mesoporous silica nanoparticles," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 3, pp. 364–374, 2012, doi: 10.1021/jz2013837.
- [98] Y. S. Lin and C. L. Haynes, "Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 13,

- pp. 4834–4842, 2010, doi: 10.1021/ja910846q.
- [99] S. P. Hadipour Moghaddam, R. Mohammadpour, and H. Ghandehari, "In vitro and in vivo evaluation of degradation, toxicity, biodistribution, and clearance of silica nanoparticles as a function of size, porosity, density, and composition," *J. Control. Release*, vol. 311–312, no. May, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.08.028.
- [100] T. Diedrich, A. Dybowska, J. Schott, E. Valsami-Jones, and E. H. Oelkers, "The dissolution rates of SiO2 nanoparticles as a function of particle size," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 9, pp. 4909–4915, 2012, doi: 10.1021/es2045053.
- [101] L. M. Jurkić, I. Cepanec, S. K. Pavelić, and K. Pavelić, "Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy," *Nutrition and Metabolism*. 2013, doi: 10.1186/1743-7075-10-2.
- [102] S. Quignard, T. Coradin, J. J. Powell, and R. Jugdaohsingh, "Silica nanoparticles as sources of silicic acid favoring wound healing in vitro," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 155, pp. 530–537, 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.049.
- [103] G. M. Berlyne, A. J. Adler, N. Ferran, S. Bennett, and J. Holt, "Silicon metabolism. I. Some aspects of renal silicon handling in normal man," *Nephron*, 1986, doi: 10.1159/000183709.
- [104] R. Jugdaohsingh *et al.*, "Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans," *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, doi: 10.1093/ajcn/71.4.944.
- [105] A. Sigel, H. Sigel, and R. K. O. Sigel, "Interrelations between essential metal ions and human diseases," *Metal Ions in Life Sciences*. 2013.
- [106] H. J. M. Bowen and A. Peggs, "Determination of the silicon content of food," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 35, no. 11, pp. 1225–1229, Nov. 1984, doi: 10.1002/jsfa.2740351114.
- [107] K. R. Martin, "The chemistry of silica and its potential health benefits," in *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 2007.
- [108] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Beck, "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism," *Nature*, 1992, doi: 10.1038/359710a0.

- [109] J. S. Beck *et al.*, "A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates," *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, doi: 10.1021/ja00053a020.
- [110] A. J. Schwanke, R. Balzer, and S. Pergher, "Microporous and mesoporous materials from natural and inexpensive sources," in *Handbook of Ecomaterials*, 2019.
- [111] D. Zhao *et al.*, "Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores," *Science* (80-.)., vol. 279, no. 5350, pp. 548–552, 1998, doi: 10.1126/science.279.5350.548.
- [112] C. Vercaemst, "Isomeric Olefinic Periodic Mesoporous Organosilicas: An Emerging Class of Versatile Nano- materials," pp. 1–278, 2009.
- [113] S. B. McCullen *et al.*, "A New Family of Mesoporous Molecular Sieves," *Access Nanoporous Mater.*, pp. 1–11, 2006, doi: 10.1007/0-306-47066-7_1.
- [114] G. M. Gao, H. F. Zou, D. R. Liu, L. N. Miao, G. J. Ji, and S. C. Gan, "Influence of surfactant surface coverage and aging time on physical properties of silica nanoparticles," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2009, doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.08.030.
- [115] M. Yousefpour and Z. Taherian, "The effects of ageing time on the microstructure and properties of mesoporous silica-hydroxyapatite nanocomposite," *Superlattices Microstruct.*, 2013, doi: 10.1016/j.spmi.2012.11.002.
- [116] V. Fathi Vavsari, G. Mohammadi Ziarani, and A. Badiei, "The role of SBA-15 in drug delivery," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 111, pp. 91686–91707, 2015, doi: 10.1039/c5ra17780d.
- [117] M. Imperor-Clerc, P. Davidson, and A. Davidson, "Existence of a microporous corona around the mesopores of silica-based SBA-15 materials templated by triblock copolymers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, no. 48, pp. 11925–11933, 2000, doi: 10.1021/ja002245h.
- [118] A. Galarneau, H. Cambon, F. Di Renzo, R. Ryoo, M. Choi, and F. Fajula, "Microporosity and connections between pores in SBA-15 mesostructured silicas as a function of the temperature of synthesis," *New J. Chem.*, vol. 27, no. 1, pp. 73–79, 2003, doi: 10.1039/b207378c.
- [119] M. Thommes et al., "Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of

- surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 87, no. 9–10, pp. 1051–1069, 2015, doi: 10.1515/pac-2014-1117.
- [120] E. D. M. Isa, H. Ahmad, and M. B. A. Rahman, "Optimization of synthesis parameters of mesoporous silica nanoparticles based on ionic liquid by experimental design and its application as a drug delivery agent," *J. Nanomater.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4982054.
- [121] A. Galarneau *et al.*, "SBA-15 versus MCM-41: Are they the same materials?," *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 141, no. January 2018, pp. 395–402, 2002, doi: 10.1016/s0167-2991(02)80567-5.
- [122] M. Vallet-Regí, L. Ruiz-González, I. Izquierdo-Barba, and J. M. González-Calbet, "Revisiting silica based ordered mesoporous materials: Medical applications," *J. Mater. Chem.*, 2006, doi: 10.1039/b509744d.
- [123] R. Mokaya, "Improving the stability of mesoporous MCM-41 silica via thicker more highly condensed pore walls," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, no. 46, pp. 10204–10208, 1999, doi: 10.1021/jp992233m.
- [124] B. Gouze, J. Cambedouzou, S. Parrès-Maynadié, and D. Rébiscoul, "How hexagonal mesoporous silica evolves in water on short and long term: Role of pore size and silica wall porosity," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 183, pp. 168–176, 2014, doi: 10.1016/j.micromeso.2013.08.041.
- [125] K. K. Pohaku Mitchell, A. Liberman, A. C. Kummel, and W. C. Trogler, "Iron(III)-doped, silica nanoshells: A biodegradable form of silica," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 34, pp. 13997–14003, 2012, doi: 10.1021/ja3036114.
- [126] Y. Shi, C. Hélary, B. Haye, and T. Coradin, "Extracellular versus Intracellular Degradation of Nanostructured Silica Particles," *Langmuir*, 2018, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b03980.
- [127] H. J. Forman, H. Zhang, and A. Rinna, "Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis," *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
- [128] L. Yu *et al.*, "Manganese Extraction" Strategy Enables Tumor-Sensitive Biodegradability and Theranostics of Nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no.

- 31, pp. 9881–9894, 2016, doi: 10.1021/jacs.6b04299.
- [129] J. Li, Z. Zhao, J. Feng, J. Gao, and Z. Chen, "Understanding the metabolic fate and assessing the biosafety of MnO nanoparticles by metabonomic analysis," *Nanotechnology*, 2013, doi: 10.1088/0957-4484/24/45/455102.
- [130] H. Harianawala, M. Kheur, and A. Bal, "Biocompatibility of Zirconia," *J Adv Med Dent Scie Res*, vol. 4, no. 3, pp. 35–39, 2016.
- [131] X. Hao et al., "Hybrid Mesoporous Silica-Based Drug Carrier Nanostructures with Improved Degradability by Hydroxyapatite," ACS Nano, vol. 9, no. 10, pp. 9614–9625, 2015, doi: 10.1021/nn507485j.
- [132] M. BOHNER, "5 Bioresorbable ceramics," in Woodhead Publishing Series in Biomaterials, F. B. T.-D. R. of B. M. Buchanan, Ed. Woodhead Publishing, 2008, pp. 95–114.
- [133] Y. He, B. Zeng, S. Liang, M. Long, and H. Xu, "Synthesis of pH-Responsive Biodegradable Mesoporous Silica-Calcium Phosphate Hybrid Nanoparticles as a High Potential Drug Carrier," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 51, pp. 44402–44409, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b16787.
- [134] K. Möller and T. Bein, "Talented mesoporous silica nanoparticles," *Chem. Mater.*, vol. 29, no. 1, pp. 371–388, 2017, doi: 10.1021/acs.chemmater.6b03629.
- [135] B. G. Trewyn, I. I. Slowing, S. Giri, H. T. Chen, and V. S. Y. Lin, "Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release," *Acc. Chem. Res.*, vol. 40, no. 9, pp. 846–853, 2007, doi: 10.1021/ar600032u.
- [136] A. Calvo, P. C. Angelomé, V. M. Sánchez, D. A. Scherlis, F. J. Williams, and G. J. A. A. Soler-Illia, "Mesoporous aminopropyl-functionalized hybrid thin films with modulable surface and environment-responsive behavior," *Chem. Mater.*, vol. 20, no. 14, pp. 4661–4668, 2008, doi: 10.1021/cm800597k.
- [137] J. Kobler, K. Möller, and T. Bein, "Colloidal suspensions of functionalized mesoporous silica nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 2, no. 4, pp. 791–799, 2008, doi: 10.1021/nn700008s.
- [138] P. Picchetti, B. N. Dimarco, L. Travaglini, Y. Zhang, M. C. Ortega-Liebana, and L. De

- Cola, "Breaking with Light: Stimuli-Responsive Mesoporous Organosilica Particles," *Chem. Mater.*, vol. 32, no. 1, pp. 392–399, 2020, doi: 10.1021/acs.chemmater.9b03937.
- [139] I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, M. Manzano, and M. Vallet-Regí, "In vitro stability of SBA-15 under physiological conditions," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 132, no. 3, pp. 442–452, 2010, doi: 10.1016/j.micromeso.2010.03.025.
- [140] M. Etienne and A. Walcarius, "Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium," *Talanta*, vol. 59, no. 6, pp. 1173–1188, 2003, doi: 10.1016/S0039-9140(03)00024-9.
- [141] S. A. Yang, S. Choi, S. M. Jeon, and J. Yu, "Silica nanoparticle stability in biological media revisited," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18502-8.
- [142] A. M. Putz, L. Almásy, A. Len, and C. Ianăşi, "Functionalized silica materials synthesized via co-condensation and post-grafting methods," *Fullerenes Nanotub*. *Carbon Nanostructures*, vol. 27, no. 4, pp. 323–332, 2019, doi: 10.1080/1536383X.2019.1593154.
- [143] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, and M. Fröba, "Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials," *Angewandte Chemie International Edition*. 2006, doi: 10.1002/anie.200503075.
- [144] V. Cauda, C. Argyo, and T. Bein, "Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 39, pp. 8693–8699, 2010, doi: 10.1039/c0jm01390k.
- [145] Q. He, Z. Zhang, F. Gao, Y. Li, and J. Shi, "In vivo biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: Effects of particle size and PEGylation," *Small*, vol. 7, no. 2, pp. 271–280, 2011, doi: 10.1002/sml1.201001459.
- [146] T. Xia *et al.*, "Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs," *ACS Nano*, 2009, doi: 10.1021/nn900918w.
- [147] E. Choi and S. Kim, "Surface pH buffering to promote degradation of mesoporous silica nanoparticles under a physiological condition," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 533, pp. 463–470, 2019, doi: 10.1016/j.jcis.2018.08.088.

- [148] L. Maggini, I. Cabrera, A. Ruiz-Carretero, E. A. Prasetyanto, E. Robinet, and L. De Cola, "Breakable mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery," *Nanoscale*, vol. 8, no. 13, pp. 7240–7247, 2016, doi: 10.1039/c5nr09112h.
- [149] G. Saito, J. A. Swanson, and K. D. Lee, "Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: Role and site of cellular reducing activities," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 2, pp. 199–215, 2003, doi: 10.1016/S0169-409X(02)00179-5.
- [150] Z. Gao, S. P. H. Moghaddam, H. Ghandehari, and I. Zharov, "Synthesis of water-degradable silica nanoparticles from carbamate-containing bridged silsesquioxane precursor†," *RSC Adv.*, vol. 8, no. 9, pp. 4914–4920, 2018, doi: 10.1039/c7ra12377a.
- [151] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, and J. Wirz, "Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP," *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, doi: 10.1021/ja039071z.
- [152] T. Fontecave, C. Boissiere, N. Baccile, F. J. Plou, and C. Sanchez, "Using Evaporation-Induced Self-Assembly for the Direct Drug Templating of Therapeutic Vectors with High Loading Fractions, Tunable Drug Release, and Controlled Degradation," 2013, doi: 10.1021/cm401807m.
- [153] A. Maleki, H. Kettiger, A. Schoubben, J. M. Rosenholm, V. Ambrogi, and M. Hamidi, "Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs," *J. Control. Release*, vol. 262, no. August, pp. 329–347, 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.047.
- [154] S. Zhang, Z. Chu, C. Yin, C. Zhang, G. Lin, and Q. Li, "Controllable drug release and simultaneously carrier decomposition of SiO2-drug composite nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 15, pp. 5709–5716, 2013, doi: 10.1021/ja3123015.
- [155] S. Zhao *et al.*, "Double loaded self-decomposable SiO2 nanoparticles for sustained drug release," *Nanoscale*, vol. 7, no. 39, pp. 16389–16398, 2015, doi: 10.1039/c5nr03029c.
- [156] H. Wu *et al.*, "Ceria nanocrystals decorated mesoporous silica nanoparticle based ROS-scavenging tissue adhesive for highly efficient regenerative wound healing," *Biomaterials*, vol. 151, pp. 66–77, 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.018.

- [157] R. Mortera, S. Fiorilli, E. Garrone, and B. Onida, "Structural changes of MCM-41 spheres during ibuprofen release to SBF," *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 174, no. B, pp. 1001–1004, 2008, doi: 10.1016/S0167-2991(08)80059-6.
- [158] C. A. Stewart, Y. Finer, and B. D. Hatton, "Drug self-assembly for synthesis of highly-loaded antimicrobial drug-silica particles," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19166-8.
- [159] R. R. Castillo, D. Lozano, and M. Vallet-Regí, "Mesoporous silica nanoparticles as carriers for therapeutic biomolecules," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 5, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12050432.
- [160] S. Svenson, "Carrier-Based Drug Delivery," 2004.
- [161] C. E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau, and S. Mann, "Nanoscale materials with mesostructured interiors," *Adv. Mater.*, vol. 13, no. 9, pp. 649–652, 2001, doi: 10.1002/1521-4095(200105)13:9<649::AID-ADMA649>3.0.CO;2-G.
- [162] O. Wada, "What are Trace Elements? Their deficiency and excess states," *Jpn Med Assoc J*, vol. 47, no. 5, p. 351, 2004.
- [163] G. Ingrao, G. Santaroni, and G. Tomassi, "Elementi in traccia: ruolo biologico e aspetti nutrizionali per l'uomo," *Annali dell'Isituto Superiore di Sanità*, vol. 31, no. 2. pp. 275–281, 1995.
- [164] C. J. Brinker and G. W. Scherer, Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. 2013.