

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

**Impregnazione di silice mesoporosa con
arginina**



Relatori

Prof.ssa Barbara Onida

Prof. Mauro Banchemo

Sara Saber Younes Mohamed

Candidato
Martina Misuraca

Luglio 2021

Indice

Acronimi.....	III
Introduzione.....	V
1. Struttura e funzione della pelle.....	1
1.1 Anatomia della pelle.....	1
1.2 Processo di guarigione delle ferite.....	2
1.2.1 Classificazione delle ferite.....	4
2. Agenti per la guarigione delle ferite.....	7
2.1 Arginina.....	9
2.1.1 Metabolismo dell'arginina.....	10
2.1.2 Benefici apportati dall'arginina.....	12
2.1.2.1 Arginina e guarigione delle ferite.....	13
3. Sistemi di drug delivery per la guarigione delle ferite.....	15
3.1 Sistemi di drug delivery basati sulla nanotecnologia.....	15
3.1.1 Liposomi.....	17
3.1.2 Nanoparticelle Solide Lipidiche (SLN) e Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC).....	17
3.1.3 Nanoparticelle polimeriche.....	17
3.1.4 Nanoparticelle inorganiche.....	18
3.1.5 Strutture nanofibrose.....	18
3.1.6 Idrogeli.....	19
4. Particelle di silice mesoporosa.....	21
4.1 Metodi di sintesi.....	22
4.2.1 Dimensione dei pori.....	25
4.2.2 Disposizione dei pori.....	25
4.2.3 Dimensione delle particelle.....	25
4.2.5 Volume poroso.....	26
4.3.1 Silice per la somministrazione topica di farmaci.....	27
5. Materiali e Metodi.....	31
5.1 Materiali.....	31

5.2 Sintesi	31
5.2.1 Sintesi delle PSSM.....	31
5.2.2 Sintesi delle MSM	32
5.3 Drug loading	33
5.4 Caratterizzazione	34
5.4.1 Diffrazione a Raggi X (XRD).....	34
5.4.2 Fisisorbimento di azoto	34
5.4.3 Microscopia a Scansione Elettronica a Emissione di Campo (FESEM).....	37
5.4.4 Analisi Termogravimetrica (TGA).....	37
5.4.5 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	37
5.5 Rilasci	39
6. Caratterizzazione delle silici.....	41
6.1 Caratterizzazione delle PSSM	41
6.2 Caratterizzazione delle MSM	46
7. Caratterizzazione delle silici contenenti arginina	51
7.1 Caratterizzazione delle PSSM impregnate con arginina (Arg@PSSM).....	51
7.2 Caratterizzazione delle MSM impregnate con arginina (Arg@MSM).....	56
8. Test di rilascio di arginina	63
9. Conclusioni.....	75
10. Sviluppi futuri.....	79
Bibliografia	81

Acronimi

Arg_11@MSM	Microsfere di silice mesoporosa impregnate con arginina a pH 11
Arg_5@MSM	Microsfere di silice mesoporosa impregnate con arginina a pH 5
Arg_5@PSSM	Particelle sferiche di silice mesoporosa impregnate con arginina a pH 5
Arg_11@PSSM	Particelle sferiche di silice mesoporosa impregnate con arginina a pH 11
Arg_11@MSM-10min	Campione Arg_11@MSM dopo un rilascio di 10 minuti
Arg_11@MSM-1h	Campione Arg_11@MSM dopo un rilascio di 1 ora
Arg_11@PSSM-10min	Campione Arg_11@PSSM dopo un rilascio di 10 minuti
Arg_11@PSSM-1h	Campione Arg_11@PSSM dopo un rilascio di 1 ora
Arg_5@MSM-10min	Campione Arg_5@MSM dopo un rilascio di 10 minuti
Arg_5@MSM-1h	Campione Arg_5@MSM dopo un rilascio di 1 ora
Arg_5@PSSM-10min	Campione Arg_5@PSSM dopo un rilascio di 10 minuti
Arg_5@PSSM-1h	Campione Arg_5@PSSM dopo un rilascio di 1 ora
BET	Modello di Brauner – Emmet - Teller
BJH	Modello di Barret – Joyner – Helenda
CTAB	Bromuro di cetiltrimetilammonio
DDS	Drug Delivery System
DFT	Density Functional Theory
ECM	Matrice Extracellulare
EtOH	Etanolo
FDA	Food and Drug Administration
FESEM	Microscopia a Scansione Elettronica a Emissione di Campo
FT-IR	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier
GRAS	Generally Recognized As Safe
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IWI	Incipient Wetness Impregnation
MCM	Mobil Composition of Matter
MSM	Microsfere di Silice Mesoporosa

NLC	Carrier Lipidici Nanostrutturati
NO	Monossido di azoto
NOS	Ossido Nitrico Sintasi
PSSM	Particelle Sferiche di Silice Mesoporosa
PTFE	Politetrafluoroetilene
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno
SBA	Santa Barbara Amorphous
SLN	Nanoparticelle Solide Lipidiche
TEOS	Ortosilicato Tetraetile
TGA	Analisi Termogravimetrica
TMB	Mesitilene
XRD	Diffrazione a Raggi X

Introduzione

La pelle è un organo che svolge una serie di importanti funzioni, tra cui proteggere l'organismo dall'ingresso di parassiti, microrganismi e sostanze nocive. A causa dell'esposizione all'ambiente esterno, la cute è vulnerabile a una varietà di fattori che possono provocare ferite.

La guarigione delle ferite è un processo biologico complesso che si articola in quattro fasi: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento. In determinate circostanze, la proprietà rigenerativa della pelle è compromessa e le ferite non guariscono in modo tempestivo, esponendo i pazienti a un rischio significativo per la salute [1]. Le ferite, infatti, sono principalmente classificate come acute o croniche: le prime guariscono seguendo il normale processo di guarigione, le seconde non mostrano segni di guarigione entro quattro settimane dalla lesione e causano dolore, infezione, ospedalizzazione e in alcuni casi amputazione [2], [3].

Le ferite croniche rappresentano un onere clinico ed economico significativo per il sistema sanitario poiché richiedono trattamenti a lungo termine [4]. Negli ultimi anni, il numero di persone affette da ferite croniche è aumentato notevolmente, a causa dell'invecchiamento della popolazione e del crescente tasso di obesità e diabete [5], condizioni che ostacolano il processo di guarigione [6]. Pertanto, lo sviluppo di un trattamento in grado di curare le ferite croniche è diventato una necessità primaria.

L'arginina, il principio attivo impiegato nel presente elaborato, è stata identificata come un importante mediatore del processo di guarigione delle ferite. In particolare, l'arginina è il substrato degli enzimi ossido nitrico sintasi e arginasi, fondamentali per la sintesi del monossido di azoto, delle poliammine e della prolina, molecole coinvolte nella riparazione delle ferite [7]. Durante la guarigione, i due enzimi suddetti competono per l'arginina che, di conseguenza, si esaurisce ostacolando la sintesi delle molecole che contribuiscono alla formazione di nuovi tessuti [8]. Per tale motivo, si ritiene che la somministrazione di questo amminoacido abbia degli effetti benefici sulla guarigione delle ferite, soprattutto se applicato direttamente sulla lesione [9].

Le silici mesoporose hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica come carrier di sostanze biologicamente attive per le loro eccezionali caratteristiche, quali elevata area superficiale, grande volume poroso, pori regolabili, biocompatibilità e non tossicità. Diversi studi hanno dimostrato che varie molecole possono essere incorporate e rilasciate con successo da particelle di silice mesoporosa [10], [11], [12].

Le particelle di silice rappresentano dei promettenti carrier per la somministrazione di arginina direttamente nella ferita in quanto consentono un rilascio controllato del principio attivo incorporato; rilasciano acido ortosilicico, in seguito alla loro dissoluzione, che favorisce una cicatrizzazione più rapida [13]; infine, l'interazione elettrostatica tra la silice e l'arginina incorporata può aumentare significativamente il tempo di rilascio.

Lo scopo del presente lavoro di tesi consiste nello studio di un dispositivo multifunzionale a base di silice mesoporosa in grado di rilasciare arginina per il trattamento delle ferite croniche. In particolare, gli obiettivi di questo lavoro sono: la sintesi di due silici mesoporose con stessa morfologia e differente diametro dei pori, una con pori di pochi nanometri e l'altra con pori di alcune decine di nanometri; la caratterizzazione morfologica e strutturale delle stesse;

l'impregnazione dei due materiali sintetizzati con soluzione acquosa di arginina a pH 5 e a pH 11 al fine da studiare l'effetto del pH sulle proprietà finali del carrier; infine, lo studio di rilascio del principio attivo incorporato nei carrier. L'attenzione si focalizza principalmente sull'effetto che il pH della soluzione utilizzata per l'impregnazione e la porosità del carrier hanno sul rilascio.

L'elaborato si articola in diversi capitoli:

- Il primo capitolo si concentra sulla descrizione della struttura della pelle e del processo di guarigione delle ferite. Inoltre, viene riportata la classificazione delle ferite con particolare attenzione alle ferite acute e croniche.
- Il secondo capitolo illustra alcuni agenti che favoriscono la guarigione delle ferite e si focalizza sull'arginina, il principio attivo di interesse di questo lavoro. Vengono riportate le sue proprietà e i suoi benefici in vari ambiti, tra cui nella guarigione delle ferite.
- Il terzo capitolo tratta i drug delivery systems e si focalizza sui principali sistemi impiegati nella somministrazione topica di agenti terapeutici.
- Nel quarto capitolo sono descritti i metodi utilizzati per la sintesi delle particelle di silice mesoporosa e le loro proprietà. Vengono anche riportate alcune delle loro applicazioni in ambito biomedicale come drug delivery systems e, infine, l'attenzione è posta sull'impatto positivo della silice nel processo di guarigione delle ferite.
- Nel quinto capitolo è riportato l'elenco dei materiali utilizzati per lo svolgimento della parte sperimentale. Sono descritte le procedure impiegate per la sintesi delle Particelle Sferiche di Silice Mesoporosa (PSSM) e delle Microsfere di Silice Mesoporosa (MSM) e per l'impregnazione delle stesse con arginina. Inoltre, sono riportate le varie tecniche utilizzate per la caratterizzazione dei carrier sintetizzati. Infine, è presente una descrizione dei test di dissoluzione effettuati per lo studio del rilascio di arginina.
- Nel sesto capitolo sono mostrati i risultati della caratterizzazione delle particelle di silice sintetizzate.
- Nel settimo capitolo sono riportate le caratterizzazioni dei due materiali impregnati con arginina a diversi pH.
- Nell'ottavo capitolo sono illustrati i risultati riguardanti lo studio del rilascio di arginina.
- Nel nono capitolo sono riportate le conclusioni.
- Nel decimo capitolo vengono discussi i possibili sviluppi futuri.

1. Struttura e funzione della pelle

La pelle, o cute, è l'organo più esteso del corpo, appartenente all'apparato tegumentario. Essa agisce da barriera fra l'ambiente esterno e l'interno del corpo ed è la migliore difesa contro gli agenti patogeni, i raggi UV e le sostanze chimiche [14]. La pelle svolge anche un ruolo importante nella regolazione della temperatura corporea, previene la disidratazione e consente la funzione sensoriale mediante recettori per il calore, il tatto e il dolore [15].

1.1 Anatomia della pelle

La pelle è costituita da diversi tipi di cellule, ciascuna con funzioni e proprietà diverse, e, inoltre, sono presenti una serie di annessi cutanei, ovvero i follicoli piliferi, le ghiandole sudoripare e sebacee e le unghie [16]. La struttura cutanea, rappresentata in Figura 1.1, è composta da più strati di tessuti che variano in modo significativo nella loro anatomia e funzione [17].

Lo strato più esterno è l'*epidermide*. Si tratta di un tessuto avascolare costituito da quattro o cinque strati di cellule epiteliali a seconda della sua posizione nel corpo [14]. Dal più profondo al più superficiale, questi strati sono: lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso, lo strato lucido (presente solo sui palmi delle mani e sulle piante dei piedi) e lo strato corneo [18]. Lo strato corneo è lo strato esposto all'ambiente esterno e funge da rivestimento protettivo: previene la penetrazione dei microbi, la disidratazione dei tessuti sottostanti e fornisce una protezione meccanica agli strati più interni [18]. Inoltre, modula l'assorbimento di sostanze chimiche, farmaci e particelle negli strati più profondi della pelle [15]. L'*epidermide* è ricoperta da un'emulsione di acqua e lipidi conosciuta come film idrolipidico. Questo film, alimentato dalle secrezioni delle ghiandole sebacee e sudoripare, aiuta la pelle a rimanere morbida e agisce come ulteriore barriera contro i batteri e i funghi [17].

Il *derma* è lo strato intermedio che collega l'*epidermide* all'*ipoderma*. È uno strato di tessuto connettivo, costituito da collagene ed elastina, che conferisce forza e flessibilità alla pelle. Il derma contiene anche le terminazioni nervose, gli annessi cutanei e i vasi sanguigni che forniscono nutrienti all'*epidermide* [19].

L'*ipoderma* è lo strato che collega il derma alle strutture sottostanti (ossa e muscoli). La sua funzione è di immagazzinare l'energia e di proteggere ed isolare il corpo. Esso è principalmente costituito da tessuto connettivo e tessuto adiposo [17].

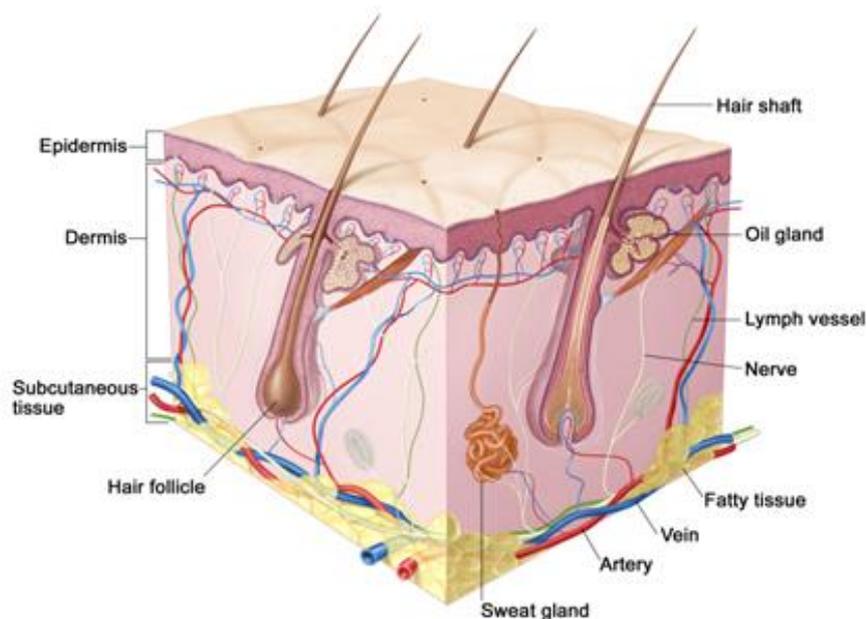


Figura 1.1: Strati cutanei [20].

1.2 Processo di guarigione delle ferite

Il corpo umano è un sistema complesso e straordinario e il processo di guarigione delle ferite è un esempio della sua grande capacità organizzativa.

La guarigione delle ferite è stata riconosciuta come importante per la salute sin dall'inizio dell'umanità [21]. Si tratta di uno dei meccanismi più complessi negli organismi multicellulari, caratterizzato da fasi che si sovrappongono temporalmente e spazialmente [22]. Inoltre, è un processo altamente ordinato ed è governato da diversi tipi di cellule, fattori di crescita e citochine [23].

Tradizionalmente, i processi di guarigione delle ferite sono stati suddivisi in quattro fasi: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento [1], mostrate schematicamente in Figura 1.2.

La risposta immediata del corpo ad una lesione cutanea è *l'emostasi* che si verifica pochi secondi dopo la lesione per fermare l'emorragia [1]. Dopo l'infortunio, la vasocostrizione dei vasi sanguigni danneggiati riduce o arresta la perdita di sangue [21], [24]. Contemporaneamente, si verifica la formazione di un tappo piastrinico, accompagnata dal rilascio dei fattori di coagulazione dalle cellule che stimolano la coagulazione del sangue: la protrombina viene trasformata in trombina, la quale converte il fibrinogeno in fibrina [25]; si forma un coagulo sanguigno contenente molecole di fibrina che blocca l'emorragia [24]. Inoltre, le piastrine secernono fattori di crescita che fungono da segnali biologici per attrarre le cellule coinvolte nella fase successiva [26].

La *fase infiammatoria* si verifica entro ventiquattro ore dalla lesione e continua per diversi giorni o settimane in base al tipo di ferita. Questa fase è caratterizzata dall'afflusso di cellule infiammatorie, cruciali per le funzioni di difesa: i primi a migrare nella ferita sono i neutrofili, seguiti dai macrofagi [27]. I neutrofili secernano proteasi e specie reattive dell'ossigeno (ROS), grazie ai quali uccidono gli agenti invasori e degradano il tessuto necrotico [21], [2]. I macrofagi supportano il processo in corso eseguendo la fagocitosi di agenti patogeni e detriti cellulari [21]. Inoltre, le cellule infiammatorie producono diversi fattori di crescita e citochine necessari per la successiva formazione dei nuovi tessuti. Infine, i neutrofili vengono fagocitati dai macrofagi o subiscono l'apoptosi oppure vengono eliminati tramite l'essudato della ferita [2].

La *fase proliferativa* inizia circa tre giorni dopo la lesione. Durante questa fase si verifica l'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi vasi sanguigni e capillari. Contemporaneamente, avviene la proliferazione dei fibroblasti i quali sintetizzano i componenti della matrice extracellulare (ECM), tra cui il collagene, necessari per la formazione del tessuto di granulazione [26], [21], [1]. Questo tessuto è ricco di fibroblasti, macrofagi, capillari e collagene e sostituisce il coagulo di fibrina [21]. Inoltre, alcuni fibroblasti si differenziano in miofibroblasti, coinvolti nel processo di contrazione della ferita, nello specifico ne tirano i bordi [1].

Il *rimodellamento*, che è l'ultima fase della guarigione della ferita, inizia due o tre settimane dopo l'infortunio e può continuare per più di un anno [2]. Durante questa fase, la formazione del tessuto di granulazione si arresta per apoptosi delle cellule e il collagene, prodotto nella fase precedente, viene sostituito da un collagene più forte ma differente rispetto a quello presente nel derma sano [21]. La cicatrice risultante, avascolare e acellulare, differisce dalla pelle non lesa e possiede una minore resistenza rispetto al tessuto originale [21], [1].

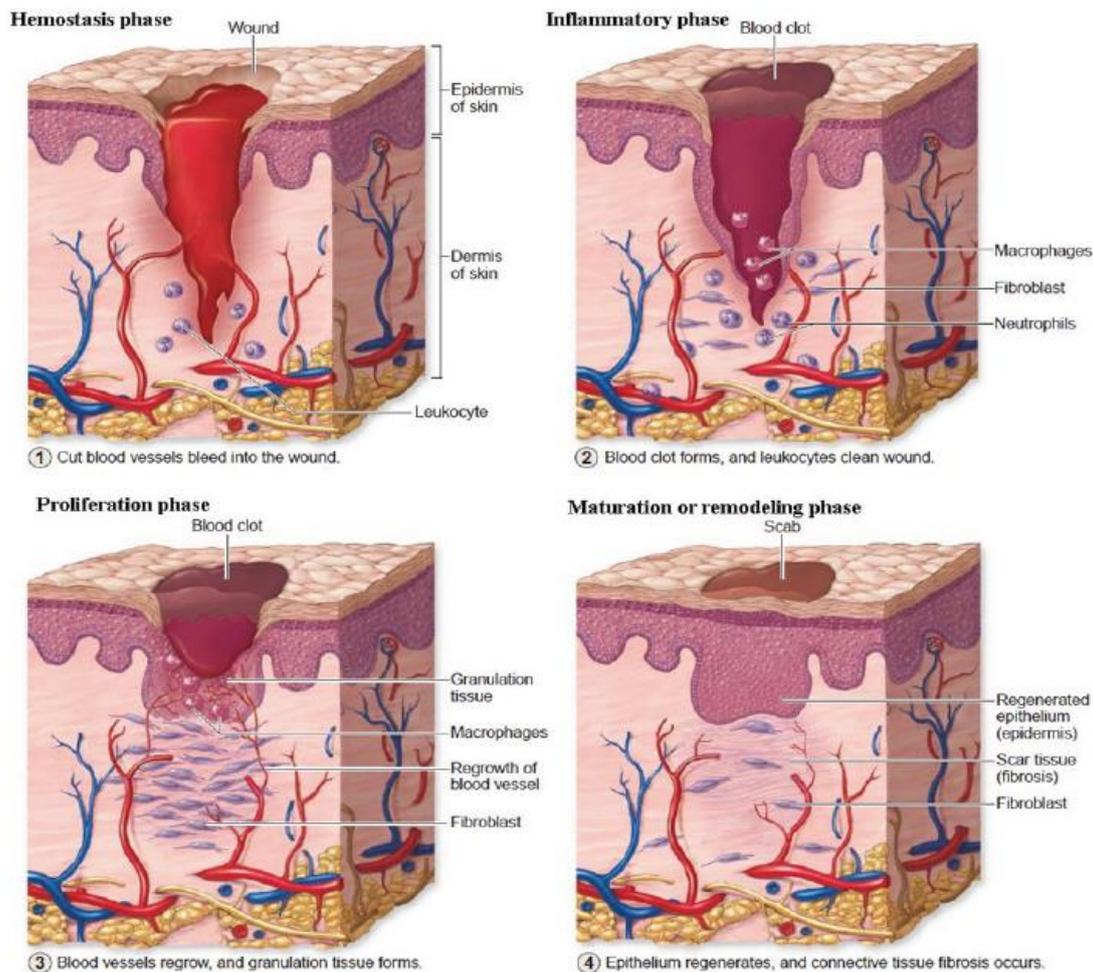


Figura 1.2: Fasi del processo di guarigione della ferita [25].

La pelle, quindi, possiede eccellenti proprietà rigenerative che le permettono di curare lesioni o tagli attraverso una serie di eventi fisiologici. Tuttavia, in alcuni casi, questa capacità rigenerativa è compromessa, le ferite non guariscono in modo tempestivo e, di conseguenza, i pazienti sono esposti a rischi significativi per la loro salute [1].

1.2.1 Classificazione delle ferite

La ferita è definita come l'interruzione della continuità cellulare, anatomica e funzionale di un tessuto vivente. Può essere prodotta da un insulto fisico, chimico, termico, microbico o immunologico al tessuto.

Quando la pelle è lacerata, tagliata o perforata, si tratta di una *ferita aperta*; quando un trauma provoca una contusione, si tratta di una *ferite chiusa*; le *ferite da ustione*, invece, sono causate da calore, freddo, sostanze chimiche o elettricità [28].

Normalmente la riparazione della pelle lesa è molto efficiente, ma può essere compromessa in determinate condizioni [1]. Questo dipende soprattutto dal tipo di ferita e dalle malattie che accompagnano il paziente [27]. Le ferite, infatti, possono essere classificate come *acute* o *croniche*, le principali differenze fra queste due tipologie di ferita sono illustrate in Figura 1.3.

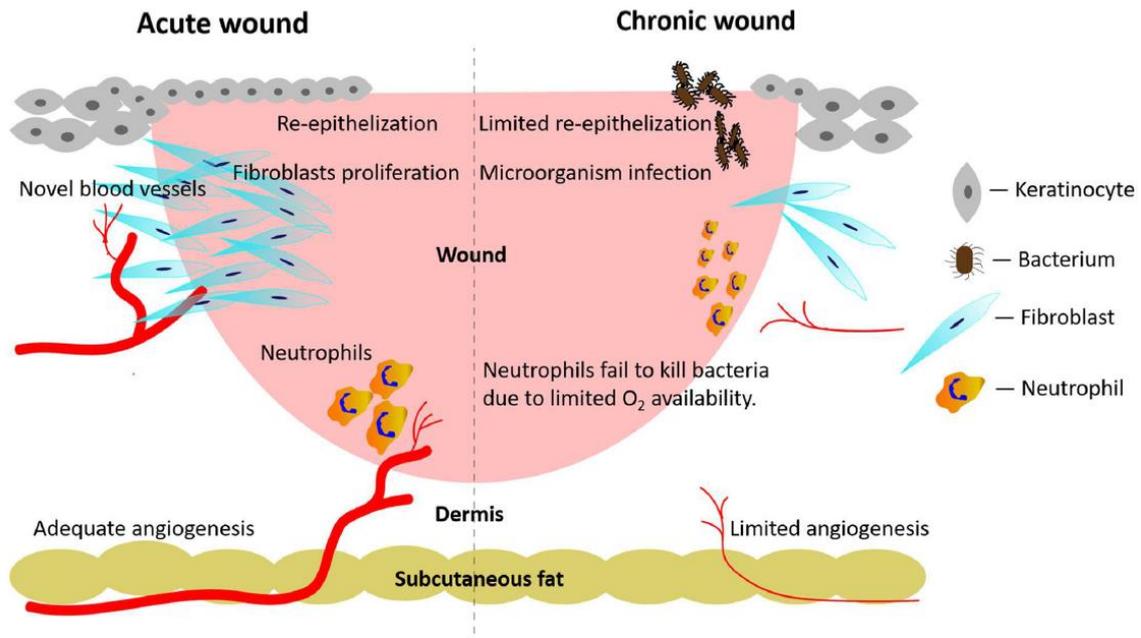


Figura 1.3: Rappresentazione grafica dell'ambiente di una ferita acuta e cronica [29].

Le ferite acute sono causate da eventi traumatici, ustioni o interventi chirurgici e si rimarginano seguendo il regolare processo di guarigione, senza interventi significativi [1], [27]. Diversamente dalle prime, le ferite croniche sono causate da un processo patologico e non mostrano segni di guarigione entro trenta giorni. Molti fattori possono provocare ferite che non guariscono, ad esempio malattie croniche, diabete, malnutrizione, invecchiamento e fattori locali come pressione inappropriata e infezioni. Queste ferite possono essere principalmente classificate in ulcere vascolari, ulcere diabetiche e ulcere da pressione [27].

Le ferite croniche non riescono a guarire e si bloccano nella fase infiammatoria, di conseguenza la vascolarizzazione è compromessa causando ipossia e la conseguente formazione di ampie regioni di tessuto non vitale le quali rappresentano un ambiente ospitale per la crescita batterica e la formazione di biofilm [1]. L'infiammazione persistente induce un continuo richiamo delle cellule infiammatorie nel sito della ferita, causando la produzione da parte dei neutrofili di una grande quantità di ROS e di proteasi. A differenza delle ferite acute, in questa tipologia di ferite il livello di proteasi è maggiore rispetto a quello dei rispettivi inibitori. L'eccessiva quantità di proteasi nelle ferite croniche porta alla distruzione della matrice extracellulare, impedendo così alla ferita di avanzare nella fase proliferativa; l'alta concentrazione di ROS causa il danneggiamento delle proteine della matrice extracellulare e la senescenza cellulare prematura. Tutto ciò amplifica l'infiammazione [27].

L'anzianità della popolazione e i crescenti tassi di diabete e obesità stanno causando un aumento della prevalenza di ferite croniche. È stato stimato che l'1-2% della popolazione nei paesi sviluppati avrà, nel corso della loro vita, almeno una ferita cronica [27]. Le ferite che non guariscono rappresentano una grande spesa per i pazienti e per il sistema sanitario e, inoltre, causano dolore, infezioni, perdita di funzionalità e conducono spesso ad amputazioni. Per questi motivi, diversi studi sono orientati verso lo sviluppo di terapie efficaci per la guarigione delle ferite.

2. Agenti per la guarigione delle ferite

La guarigione delle ferite è un processo complesso che richiede nutrienti specifici quali vitamine, amminoacidi e minerali per promuovere la riparazione dei tessuti.

La malnutrizione è un fattore importante che influisce negativamente sul processo di guarigione [30]. La presenza di una lesione aumenta le richieste metaboliche e, inoltre, grandi quantità di proteine possono essere perse ogni giorno attraverso l'essudato della ferita. I tipici pazienti con ferite croniche sono gli anziani, particolarmente a rischio di carenze nutrizionali a causa di difficoltà mediche, psicologiche, fisiologiche, sociali ed economiche [31].

Nella Tabella 2.1 sono riportati i nutrienti essenziali per ogni fase del processo di guarigione delle ferite. In particolare, alcuni nutrienti che hanno dimostrato di migliorare il processo di guarigione includono vitamina C, vitamina E, zinco, arginina e glutammina [30].

Tabella 2.1: Nutrienti essenziali nelle fasi di guarigione delle ferite [32].

Wound healing phase	Effect
Haemostasis	
Drugs, herbs, vitamins, amino acids, minerals	Blood clotting
Inflammatory phase	
Vitamin A	Enhances early inflammatory phase
Bromelain and adequate protein intake	Prevents prolonging inflammatory phase
Vitamin C	Enhances neutrophil migration and lymphocyte transformation
Proliferative Phase	
Vitamin C, <i>Centella asiatica</i>	Necessary for collagen synthesis
Glucosamine	Enhances hyaluronic acid production
Vitamin A	Promotes epithelial cell differentiation
Zinc	Required for DNA synthesis, cell division, and protein synthesis
<i>Aloe vera</i>	Support formation of granulation tissue
Remodelling phase	
Amino acids and proteins	Wound remodelling

Le proteine sono uno dei più importanti fattori nutritivi che influenzano la guarigione delle ferite. Esse sono necessarie per la risposta immunitaria che, se compromessa, può ritardare il passaggio dalla fase infiammatoria a quella proliferativa [33]. Inoltre, nelle fasi proliferativa e rimodellante, le proteine sono essenziali per la formazione dei capillari, la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi del collagene e il rimodellamento della ferita [6], [33]. Dunque, una carenza proteica può compromettere l'intero processo di guarigione.

Tra gli amminoacidi, la glutammina e l'arginina svolgono un ruolo particolarmente importante nella guarigione delle ferite. La glutammina ha un ruolo cruciale nella stimolazione della risposta infiammatoria, una delle prime fasi della guarigione delle ferite. È stato dimostrato che l'integrazione orale di glutammina aumenta i livelli di collagene. L'arginina partecipa a diverse fasi del processo di guarigione delle ferite e la richiesta metabolica di questo amminoacido aumenta in presenza di una lesione. La sua integrazione ha dimostrato di essere un'efficace terapia adiuvante nella guarigione delle ferite [6].

Oltre ai macronutrienti, diversi micronutrienti svolgono un ruolo cruciale nel processo di guarigione delle ferite. Le vitamine C, A ed E mostrano potenti effetti antiossidanti e antinfiammatori [6]. Ad esempio, la vitamina E è un potenziale agente per il trattamento di ustioni, ferite chirurgiche e altre tipologie di ferite. Essa agisce come agente riducente eliminando i radicali liberi in modo da prevenire i danni ai tessuti. In diversi studi, la vitamina E è stata somministrata negli animali, diabetici e sani, per via topica, orale o intramuscolare, dimostrando promettenti proprietà curative. Il suo utilizzo ha favorito la formazione di nuovi capillari sanguigni, l'epitelizzazione e la sintesi di collagene [34]. Inoltre, la vitamina E topica ha effetti benefici sulla guarigione delle ferite chirurgiche nell'uomo e migliora l'aspetto della cicatrice [35].

Diversi minerali, quali rame, calcio, ferro e zinco, sono coinvolti nella guarigione delle ferite [36]. Tra questi, lo zinco è un micronutriente particolarmente importante per la pelle [30]. Lo zinco gioca un ruolo fondamentale in diverse fasi del processo di riparazione di una ferita: nella fase infiammatoria, promuove la risposta immunitaria e riduce il rischio di sviluppare infezioni; nelle fasi proliferativa e rimodellante, è essenziale per la produzione di collagene, la proliferazione dei fibroblasti e l'epitelizzazione [33]. È stato riscontrato che la carenza di zinco per cause ereditarie o dietetiche ritarda il processo di riparazione della lesione. Il trattamento della carenza di zinco favorisce una migliore guarigione della ferita [37]. Studi sulle ferite chirurgiche hanno rilevato che i trattamenti topici allo zinco facilitano significativamente la guarigione [33].

Il processo di guarigione delle ferite può essere facilitato da prodotti naturali con proprietà antinfiammatoria, antiossidante e antibatterica. Per esempio, la curcuma, il miele e l'aloe vera vengono ampiamente utilizzati per la cura delle ferite con risultati eccellenti.

La curcumina, principio attivo della curcuma, presenta attività antinfiammatorie, antinfettive, antiossidanti e cicatrizzanti. Diversi studi, sia in vivo che in vitro, hanno valutato gli effetti benefici della curcumina sulla guarigione delle ferite, evidenziando come questa sia in grado di accelerare significativamente tale processo favorendo la proliferazione dei fibroblasti e aumentando la sintesi di collagene. Nei suddetti studi, la curcumina è stata somministrata per via orale o topica, da sola o incorporata in diverse formulazioni [34],[38]. La combinazione della curcumina con sostanze chimiche idrofile (come l'acido oleico, l'acido ialuronico e la gelatina) migliora la biodisponibilità della curcumina scarsamente solubile e quindi promuove una migliore guarigione delle ferite [34].

Il miele è un rimedio tradizionale ed economico per la cura delle ferite. È stato scientificamente provato da diversi studi che il miele sia in grado di accelerare la guarigione di svariate tipologie di ferite quali ustioni, ferite chirurgiche e ferite infette. Esso, grazie alle sue caratteristiche, quali alto contenuto di zucchero, alta viscosità, basso contenuto di acqua e basso pH, funge da barriera protettiva contro gli agenti patogeni [34]. Il miele stimola l'epitelizzazione, migliora l'angiogenesi e aumenta la sintesi di collagene [39]. Inoltre, il trattamento con il miele agevola la formazione di cicatrici più sottili. Tuttavia, gli effetti del miele sul trattamento delle ferite dipendono dalla sua composizione che varia in base alla tipologia. Inoltre, insorgono preoccupazioni sia per i pazienti diabetici, essendo il miele ad alto contenuto di zucchero, sia per la sostenibilità della sua raccolta [34].

L'aloe vera è una pianta perenne sempreverde ben nota per il suo potenziale terapeutico [40]. L'applicazione topica di aloe è uno dei rimedi naturali migliori per favorire il processo di guarigione di diverse ferite, soprattutto quelle da ustione, come dimostrato da diversi studi scientifici [41]. In questa pianta sono presenti più di 75 costituenti; in particolare, contiene aminoacidi ed elettroliti come ferro, potassio, rame, sodio, zinco, essenziali per il processo di guarigione delle ferite. L'aloe è in grado di prevenire la formazione di cicatrici, stimolare la produzione cellulare e promuovere il processo di rigenerazione negli strati più profondi della pelle [40].

I mediatori che partecipano al processo di guarigione della ferita possono essere somministrati al momento opportuno nel tentativo di ridurre i tempi di guarigione e contribuire al ripristino dell'attività protettiva della pelle. Uno dei mediatori più importanti è l'arginina, più approfonditamente discussa nel paragrafo successivo.

2.1 Arginina

L'arginina, o meglio la sua forma levogira nota come L-arginina, è un aminoacido utilizzato dagli organismi viventi per la biosintesi delle proteine. È stata isolata per la prima volta nel 1886 da *E. Shulze* ed *E. Steiger* dalle piantine di lupino [42].

La sua formula bruta è $C_6H_{14}N_4O_2$, pertanto presenta una massa molare di 174.20 g/mol. L'arginina contiene un gruppo amminico, un gruppo carbossilico e una catena laterale a tre atomi di carbonio che termina con un gruppo guanidinico contenente due gruppi amminici. La Figura 2.2 mostra la sua struttura chimica. A pH fisiologico, l'acido carbossilico è deprotonato, il gruppo amminico è protonato così come il gruppo guanidinico, rendendo la molecola carica positivamente [43].

L'arginina, insieme alla lisina e all'istidina, appartiene al gruppo degli aminoacidi basici [42]. Si presenta come una polvere cristallina bianca e inodore. La sua temperatura di fusione è di 238°C. È insolubile in etere etilico e leggermente solubile in etanolo; presenta, invece, una solubilità molto alta in acqua, pari a 182 g/L a 25°C [44].

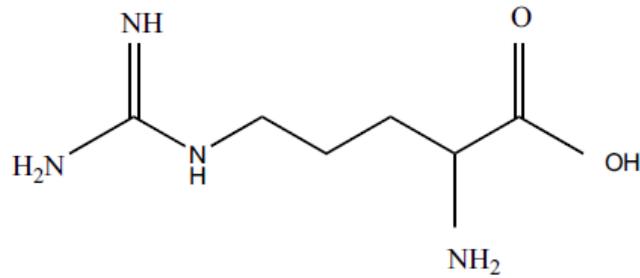


Figura 2.2: Struttura chimica dell'arginina [42].

L'arginina proviene da tre fonti: turnover delle proteine, apporto alimentare, sintesi endogena [45]. Le principali fonti alimentari di questo amminoacido sono: frutti di mare, semi, noci, alghe, carne, soia [42]. Una dieta sana consente l'assorbimento di circa 3-5 g di arginina al giorno [46]. Per gli adulti in salute, l'arginina non è essenziale: la quantità sintetizzata dall'organismo e quella integrata con la dieta è sufficiente per soddisfare le varie esigenze fisiologiche. Tuttavia, l'arginina è considerata essenziale nei bambini e nei soggetti inabili a produrre una quantità sufficiente, per esempio, in caso di gravidanza, allattamento, disfunzione intestinale o renale, guarigione delle ferite. In queste circostanze, l'arginina deve essere integrata con l'alimentazione [42]. Pertanto, l'arginina è classificata come amminoacido semi-essenziale o condizionatamente essenziale [47].

2.1.1 Metabolismo dell'arginina

L'arginina è coinvolta in diverse vie metaboliche all'interno del corpo umano, mostrate in Figura 2.3. Ovviamente i vari processi che coinvolgono l'arginina non avvengono tutti all'interno di ogni cellula, ma sono espressi in modo differenziale in base al tipo di cellula, all'età, alla dieta e allo stato di salute [47].

L'arginina è sintetizzata nel corpo, principalmente nei reni, a partire dalla citrullina. Viceversa, anche la citrullina può essere ottenuta dall'arginina in quanto entrambe sono coinvolte nel ciclo dell'urea, l'unica via nei mammiferi che consente l'eliminazione dell'ammonica dal corpo sotto forma di urea [47]. Tramite l'attività dell'enzima arginasi, l'arginina viene convertita in ornitina e urea. L'ornitina è un precursore delle poliammine, della prolina e del glutammato [42], [46], [47]. Le poliammine sono essenziali per la proliferazione e il differenziamento cellulare e sono fondamentali per la formazione dei vasi sanguigni e, inoltre, fungono da antiossidanti [46]. L'arginina è necessaria anche per la sintesi della creatina, una fonte di energia per la contrazione muscolare. Anche l'agmatina è ottenuta dall'arginina, ma la sua funzione fisiologica non è completamente nota [47].

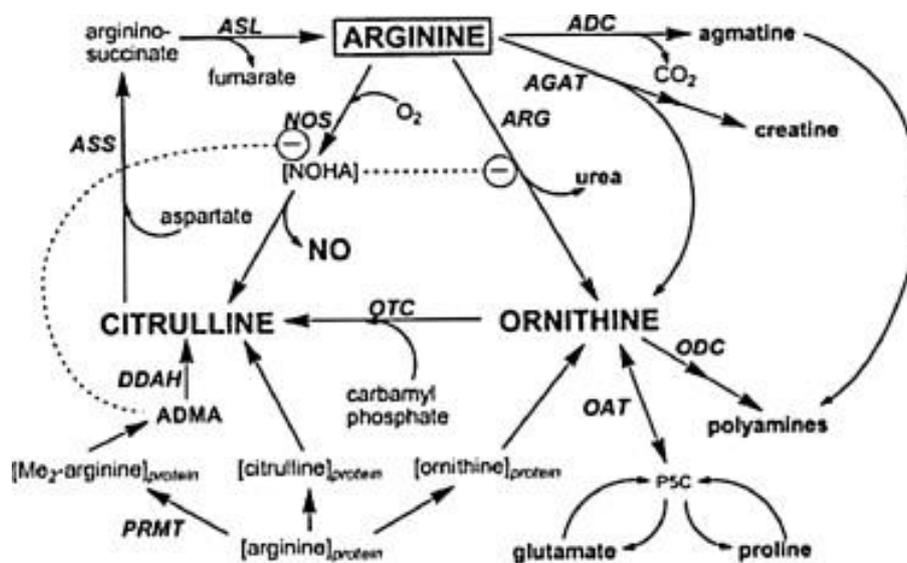


Figura 2.3: Metabolismo dell'arginina nei mammiferi [47].

L'arginina è particolarmente importante poiché è l'unico substrato per la produzione di monossido di azoto (NO), una molecola che svolge diversi processi fisiologici nel corpo umano tra cui neurotrasmissione, vasodilatazione, citotossicità e immunità [42], [47]. L'ossido nitrico sintasi (NOS) è l'enzima che catalizza la produzione di NO e citrullina a partire da ossigeno e arginina, secondo la reazione mostrata in Figura 2.4 [46]. Questo enzima presenta tre isoforme: endoteliale (eNOS) e neuronale (nNOS), costitutivamente espresse dalle cellule neuronali ed endoteliali, rispettivamente, e inducibile (iNOS), espressa dai macrofagi in risposta alle citochine e correlata alla risposta infiammatoria [7], [45], [48]. Per il loro corretto funzionamento, le isoforme di NOS hanno bisogno di cofattori, come il nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) [42].

La produzione di NO dipende dall'attività degli enzimi arginasi e NOS: una maggiore attività dell'arginasi causa una diminuzione della biodisponibilità dell'arginina per NOS, riducendo così la produzione di NO [7].

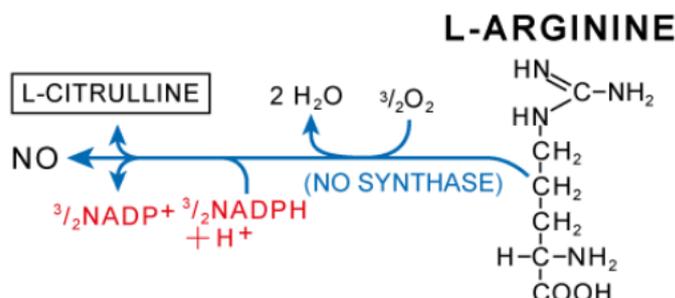


Figura 2.4: Produzione di NO e citrullina a partire da ossigeno e arginina [49].

2.1.2 Benefici apportati dall'arginina

Come detto precedentemente, l'arginina è un precursore nella biosintesi di vari composti biologicamente importanti come proteine, monossido di azoto, creatina, urea e poliammine. Pertanto, questo amminoacido svolge un ruolo cruciale in importanti processi cellulari [42].

Recentemente è emerso un crescente interesse per i potenziali effetti terapeutici dell'arginina per il trattamento dei disturbi cardiovascolari [7], [42]. Le cellule endoteliali vascolari utilizzano l'arginina come substrato e, attraverso l'enzima eNOS, producono NO, responsabile del rilassamento delle cellule muscolari lisce vascolari ed essenziale per ridurre la pressione sanguigna [50], [51]. È stata associata alla disfunzione endoteliale un'aumentata attività dell'arginasi e, di conseguenza, una ridotta produzione di NO. La disfunzione endoteliale è una delle principali cause di diverse condizioni patologiche che colpiscono il sistema cardiovascolare, tra cui ipertensione, arteriosclerosi e diabete [7], [42]. Dunque, la somministrazione di arginina e, di conseguenza, una maggiore produzione di NO, migliora la funzione cardiovascolare [47]. Studi clinici su pazienti ipertesi, diabetici e su soggetti sani indicano che l'arginina può regolare l'omeostasi vascolare. Ulteriori indagini su animali ed esseri umani sono necessarie al fine di trovare il modo adatto per l'integrazione dell'arginina nel trattamento dei disturbi cardiovascolari [42].

Le alterazioni della funzione endoteliale sono state collegate a ipertensione, diabete, tromboembolia e insufficienza renale, tutte presenti, in misura diversa, nei pazienti affetti da COVID-19. Per questi motivi, sulla base degli effetti positivi dell'arginina sulla funzione endoteliale, si può ipotizzare che l'integrazione di arginina possa essere utile per contrastare la disfunzione endoteliale nei pazienti affetti da COVID-19 [7]. *Naito T. et al.* [52] hanno studiato la proprietà antivirale dell'arginina, dimostrando che questa è in grado di sopprimere la moltiplicazione del virus Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) nelle cellule infette constatandone, inoltre, l'efficacia nelle prime ore successive all'infezione. In aggiunta, i suddetti studiosi hanno notato che l'arginina inibisce anche diversi virus a RNA, i quali hanno mostrato una diversa resistenza all'amminoacido in base alle loro proprietà intrinseche. Tuttavia, l'arginina è più efficace ad alta concentrazione, difficilmente raggiungibile nel siero, ma facilmente raggiungibile se somministrata per via topica. Dunque, l'attività antivirale dell'arginina può trovare applicazione principalmente per il trattamento delle malattie topiche provocate da virus.

Il monossido di azoto è in grado di proteggere la mucosa gastrica: alcuni studi hanno dimostrato che la somministrazione di arginina accelera la guarigione delle ulcere. Esperimenti sugli animali suggeriscono che l'NO è anche coinvolto nella memoria; si è visto che l'inibizione della sintesi di NO altera la capacità di apprendimento [47]. Recentemente, sono stati studiati dei trattamenti contro il cancro che utilizzano monossido di azoto poiché questo può inibire la crescita delle cellule tumorali [51].

Esistono forti evidenze riguardo il miglioramento della prestazione degli atleti in seguito all'assunzione di arginina [53]. L'integrazione di questo amminoacido ha effetti benefici poiché l'arginina, avendo un effetto vasodilatatore, favorisce l'apporto di nutrienti e di ossigeno durante l'esercizio, migliorando la forza muscolare e il recupero [7].

Inoltre, è stato dimostrato che l'arginina migliora la circolazione periferica e la funzione renale [47], stimola la proliferazione dei linfociti T, coinvolti nell'immunità cellulo-mediata [7], [45] e possiede proprietà antiossidanti oltre a svolgere un'azione secretogoga, ovvero stimola la secrezione dell'ormone della crescita, della prolattina e dell'insulina [46], [47].

2.1.2.1 Arginina e guarigione delle ferite

Nel 1978 fu compresa, per la prima volta, l'importanza dell'arginina nella guarigione delle ferite: *Seifter et al.* [46] hanno dimostrato i benefici dell'arginina somministrandola, tramite la dieta, ai ratti, sui quali sono state create delle ferite cutanee incisionali.

Dal momento che il corpo durante i periodi di stress non è in grado di fornire una quantità sufficiente di arginina per le varie esigenze metaboliche, l'integrazione di questo amminoacido, necessario per la riparazione dei tessuti è stata considerata un trattamento per migliorare la guarigione delle ferite [46]. L'arginina interviene nella riparazione dei tessuti tramite due meccanismi:

- Nelle prime fasi della guarigione delle ferite, l'arginina, grazie all'attività di NOS, viene trasformata in NO e citrullina dalle cellule coinvolte nella riparazione dei tessuti. Il monossido di azoto agisce come agente protettivo uccidendo gli agenti patogeni, ha effetti vasodilatatori, regola la proliferazione cellulare, controlla la deposizione di collagene e l'angiogenesi e influenza la contrazione della ferita [43], [46], [47]. Tuttavia, l'NO ad alte concentrazioni può essere tossico: reagisce con l'anione superossido (O_2^-) producendo il perossinitrito ($ONOO^-$) che presenta proprietà ossidanti [44].
- Successivamente, circa settantadue ore dopo la ferita, la produzione di NO diminuisce e si verifica un aumento dell'attività dell'arginasi; dunque, l'arginina viene convertita dai fibroblasti in ornitina, precursore della sintesi di prolina, glutammato e poliammine. La prolina è un amminoacido coinvolto nella sintesi del collagene, necessario per la riparazione e il ripristino della funzionalità tissutale [46]. Le poliammine, come già detto, sono essenziali per la proliferazione cellulare e sono fondamentali per la formazione dei vasi sanguigni, giocando, così, un ruolo primario nella generazione dei tessuti [54].

Dunque, l'arginina partecipa a diverse fasi del processo di guarigione e, poiché gli enzimi NOS e arginasi competono per lo stesso substrato, può esaurirsi velocemente, ostacolando la formazione di nuovi tessuti e di conseguenza la guarigione della ferita [8]. Inoltre, l'emivita del monossido di azoto è estremamente breve (da 0.009 a 2 secondi) [51]. Per questi motivi, molto interessanti sono i sistemi per il rilascio di farmaci, in questo caso di arginina, che permettono di controllarne il rilascio.

Sono molti gli studi, sia nell'uomo che negli animali, che hanno dimostrato la capacità dell'arginina di migliorare la deposizione di collagene e la resistenza alla rottura delle ferite acute, anche se i vari dati disponibili suggeriscono un dosaggio differente [7], [46], [47].

L'arginina può essere somministrata per via orale, topica o intravenosa. In uno studio sono stati valutati gli effetti benefici della somministrazione topica o orale dell'arginina nel processo di guarigione di una ferita chirurgica. I risultati sono stati positivi in entrambi i casi, ma l'arginina applicata per via topica è più efficace nell'accelerare il processo di guarigione [9].

Per quanto riguarda l'influenza dell'arginina sulla guarigione delle ferite croniche, in uno studio è stato mostrato che la supplementazione di questo amminoacido migliora la ridotta guarigione delle ferite nei topi diabetici, aumentando la deposizione di collagene e la forza di rottura della ferita [55]. Tuttavia, l'uso dell'arginina per la guarigione di ferite croniche necessita ancora di chiarimenti. Un passo successivo fondamentale è esaminare l'effetto della supplementazione di arginina per la guarigione di questo tipo di ferite negli esseri umani.

3. Sistemi di drug delivery per la guarigione delle ferite

I Drug Delivery Systems (DDS) sono tecnologie ingegnerizzate per la somministrazione mirata e/o il rilascio controllato di agenti terapeutici [56]. Essi sono in grado di rilasciare un farmaco in una posizione specifica nel corpo e ad una velocità definita. Il loro scopo è di facilitare il dosaggio e aumentare la durata dell'effetto terapeutico, riducendo la frequenza di somministrazione e provocando il minimo danno al paziente [57].

A seconda del farmaco, del modo in cui viene somministrato e di come risponde il paziente, possono verificarsi effetti collaterali che possono variare notevolmente da persona a persona per tipo e gravità. La somministrazione di farmaci a livello locale piuttosto che sistematico permette di ridurre gli effetti collaterali e la tossicità dei farmaci [56].

Ogni DDS ha le proprie caratteristiche chimiche, fisiche e morfologiche e una diversa affinità con i farmaci con i quali stabiliscono interazioni chimiche (ad esempio, legami covalenti e legami idrogeno) o fisiche (ad esempio, interazioni elettrostatiche) [58].

Come detto precedentemente, la somministrazione di diverse vitamine, aminoacidi e minerali, ma anche vari fattori di crescita, citochine e agenti antibatterici, potrebbe essere benefica per le ferite croniche. Negli ultimi decenni, progressi significativi nel campo della farmaceutica e della micro/nanotecnologia hanno consentito lo sviluppo di sistemi di somministrazione di agenti terapeutici per via topica, proteggendoli dalla degradazione che potrebbe verificarsi nel letto della ferita a causa dell'ambiente altamente proteolitico [1], [59], [60]. Inoltre, i DDS sono di particolare importanza poiché la compromissione vascolare della ferita può impedire il rilascio efficace del farmaco quando viene somministrato per via sistematica [1].

3.1 Sistemi di drug delivery basati sulla nanotecnologia

Le ferite di natura cronica hanno condotto allo sviluppo di terapie basate sulla nanotecnologia mirate a facilitare il processo di riparazione del tessuto danneggiato [61].

I nanocarrier presentano numerosi vantaggi rispetto ad altri sistemi di somministrazione di farmaci come una buona biocompatibilità, un rilascio controllato e prolungato, un elevato carico di farmaco e buone proprietà meccaniche [59]. Essi migliorano la solubilità dei farmaci idrofobici, consentendone, di conseguenza, una diminuzione del dosaggio [62]. Inoltre, i nanocarrier consentono la somministrazione topica dei farmaci e le piccole dimensioni favoriscono la penetrazione del farmaco nel letto della ferita e un maggiore assorbimento intracellulare [27].

Si definisce nanomateriale un materiale avente almeno una dimensione compresa tra 1 nm e 100 nm. In certi casi è necessario utilizzare dei carrier con una dimensione maggiore di 100 nm poiché sono in grado di incorporare una maggiore quantità di farmaco [58].

I più comuni DDS basati sulla nanotecnologia utilizzati per il rilascio di agenti terapeutici direttamente nell'ambiente della ferita sono le nanoparticelle lipidiche (liposomi, SLN e NLC), le nanoparticelle polimeriche, le nanoparticelle inorganiche, le strutture nanofibrose e gli idrogeli [63], mostrati in Figura 3.1.

I nanomateriali usati come carrier per il rilascio degli agenti terapeutici spesso presentano proprietà intrinseche benefiche (ad esempio, proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie o antiossidanti) per il trattamento delle ferite [64]. Ad esempio, tra le nanoparticelle inorganiche, le nanoparticelle d'oro e d'argento presentano effetti antibatterici e antinfiammatori. Al contrario, le nanoparticelle a base di lipidi non hanno effetti terapeutici evidenti. Infine, alcune nanoparticelle polimeriche stimolano l'angiogenesi (PLGA) o mostrano attività antimicrobica (chitosano) [65].

Esistono differenti modi in cui le nanoparticelle possono essere formulate per uso topico, ad esempio come formulazioni secche o viscosi (creme, lozioni, gel, unguenti). Il mezzo utilizzato per sospendere le nanoparticelle deve essere biocompatibile e deve facilitare l'assorbimento cutaneo. Il mezzo di sospensione può anche alterare la cinetica di rilascio del farmaco dalle nanoparticelle [60].

Al fine di sviluppare sistemi di somministrazione di farmaci più sofisticati ed efficaci e ottenere un rilascio più controllato, è possibile combinare diversi DDS. In particolare, le nanoparticelle possono essere incorporate, insieme ad altri farmaci, in nanofibre e idrogeli, creando un sistema nanocomposito [66]. Si tratta di un nuovo concetto di medicazione che promuove una migliore rigenerazione della pelle. Il grande vantaggio di questa medicazione innovativa è la capacità di rilasciare più agenti terapeutici, incorporati nelle nanoparticelle e nella struttura nanofibrosa o nell'idrogeli, in modo graduale [65].

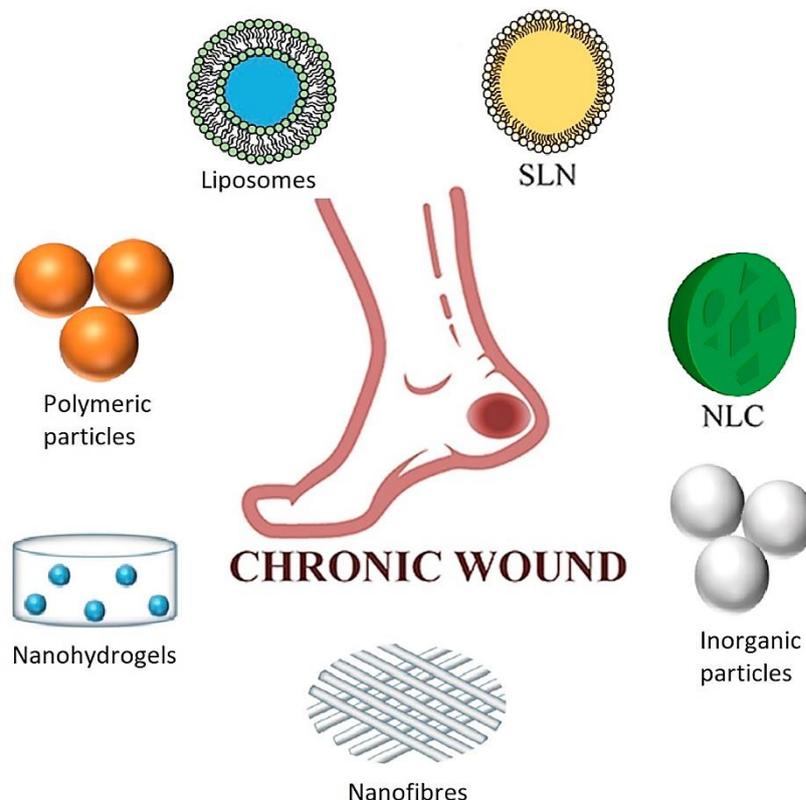


Figura 3.1: Rappresentazione schematica dei nanocarrier utilizzati per il trattamento delle ferite (immagine modificata [59], [67], [66]).

Nelle sottosezioni seguenti verranno descritti i principali DDS utilizzati per la cura delle ferite.

3.1.1 Liposomi

I liposomi sono vescicole costituite da un doppio strato di fosfolipidi aventi un diametro medio che varia tra 50 e 300 nm [60]. Essi sono atossici, biodegradabili e compatibili con la pelle [63]; hanno la capacità di incorporare sia farmaci idrofili nel compartimento acquoso che idrofobici nel doppio strato lipidico e ne consentono un rilascio prolungato [59]. Inoltre, i liposomi coprono la ferita creando un ambiente umido dopo l'applicazione, favorendo così il processo di guarigione [63].

Tuttavia, nonostante i loro benefici, i liposomi mostrano alcuni limiti nell'applicazione che ostacolano la loro espansione nell'uso clinico, come problemi di stabilità che possono causare il rilascio incontrollato del farmaco e una bassa efficienza di incorporazione [59], [63].

3.1.2 Nanoparticelle Solide Lipidiche (SLN) e Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC)

Al fine di superare i limiti dei liposomi sono state sviluppate prima le nanoparticelle lipidiche solide (SLN) e poi i carrier lipidici nanostrutturati (NLC) [67].

Le SLN hanno tipicamente una forma sferica, sono composte da un nucleo lipidico solido stabilizzato da un guscio di tensioattivi [59] e hanno un diametro medio compreso tra 50 e 1000 nm [60]. Le SLN sono dei promettenti sistemi per il trasporto di farmaci, soprattutto per le applicazioni che richiedono un rilascio prolungato. Queste, inoltre, sono biodegradabili, biocompatibili, hanno una bassa tossicità e possono essere prodotti su larga scala a costi relativamente bassi [60].

I carrier lipidici nanostrutturati sono costituiti da una miscela di lipidi solidi e liquidi. Essi rappresentano una valida alternativa alle SLN poiché presentano una struttura cristallina meno ordinata che conferisce loro una maggiore stabilità e capacità di carico [67].

3.1.3 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono sistemi colloidali che possono essere utilizzati nella somministrazione di farmaci grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e capacità di rilascio intracellulare. Le loro proprietà fisico-chimiche possono essere adattate in modo da migliorare il caricamento del farmaco e controllarne il rilascio [27].

La maggior parte dei nanocarrier polimerici sono preparati utilizzando materiali naturali o sintetici, come acido poli(lattico-co-glicolico) o PLGA, alginato, gelatina e chitosano [63]. Le nanoparticelle a base di PLGA sono ampiamente utilizzate per il rilascio controllato di farmaci per via della loro cinetica di degradazione versatile [29]. Inoltre, il PLGA funge da agente di guarigione delle ferite poiché dalla sua degradazione si ottiene il lattato che accelera l'angiogenesi [27]. Anche le nanoparticelle di chitosano sono molto interessanti per la loro attività antibatterica e proprietà pro-cicatrizante [61].

Attualmente, le nanoparticelle polimeriche vengono impiegate soprattutto per fornire molecole come peptidi, acidi nucleici e antibiotici utili alla guarigione delle ferite [27].

3.1.4 Nanoparticelle inorganiche

Varie nanoparticelle inorganiche come nanoparticelle in oro, silice e ossido di ferro sono interessanti carrier di farmaci grazie all'elevata area superficiale, le dimensioni regolabili, la loro buona biocompatibilità e versatilità [27], [58].

Una varietà di nanoparticelle metalliche ha catturato molta attenzione; in particolare, nanoparticelle di argento, ossido di rame, ossido di zinco e biossido di titanio sono utilizzati per il trattamento delle infezioni batteriche resistenti ai farmaci grazie alla loro intrinseca ed elevata attività antimicrobica [27], [60].

Le nanoparticelle d'oro hanno ricevuto un notevole interesse per via della loro stabilità e proprietà antinfiammatorie [1]. Queste sono caratterizzate da facilità di sintesi, dimensione e forma regolabili e biocompatibilità [60], [68]. Nella guarigione delle ferite, questi carrier sono stati utilizzati per il rilascio di antiossidanti e acidi nucleici [1].

Le nanoparticelle di silice mesoporosa costituiscono un'altra classe di veicoli per la somministrazione di farmaci che ha ricevuto un'attenzione significativa per la loro biocompatibilità, facilità di sintesi ed eccellente capacità di carico del farmaco. L'interazione elettrostatica tra la silice e i farmaci incorporati aumenta significativamente il tempo di rilascio di questi ultimi. Inoltre, le particelle di silice mesoporosa sono dei carrier in grado di offrire un rilascio quasi lineare del farmaco [1].

3.1.5 Strutture nanofibrose

Le strutture nanofibrose sono molto interessanti nell'ingegneria dei tessuti per la loro somiglianza strutturale con l'ECM; esse favoriscono l'adesione e la proliferazione cellulare e supportano la formazione dei tessuti [59].

Le strutture nanofibrose presentano diverse caratteristiche che le rendono interessanti DDS:

- È possibile fabbricare nanofibre da un'ampia varietà di soluzioni sia di polimeri naturali (ad esempio, chitosano, gelatina, collagene) che di polimeri sintetici (ad esempio, PLA, PGA, PLGA, poliuretano, policaprolattame) o loro combinazioni [60];
- Hanno un elevato rapporto superficie-volume che consente la somministrazione efficiente di farmaci sia idrofili che idrofobici [60];
- Il profilo di rilascio del farmaco può essere regolato modulando una varietà di parametri, come il rapporto farmaco-polimero, il diametro della fibra, la morfologia e la porosità [60]. A seconda della loro composizione, possono rilasciare gradualmente il farmaco incorporato per periodi molto lunghi [1].

Le medicazioni nanofibrose mostrano un'elevata capacità di carico del farmaco e forniscono un'eccellente protezione dai danni ambientali [59]. Inoltre, la loro struttura porosa consente la permeazione dei gas e quindi la respirazione cellulare, la rimozione degli essudati e il trattenimento dell'umidità, prevenendo la disidratazione della ferita [59]. Infine, le strutture nanofibrose sono biocompatibili, riducono la formazione di cicatrici, esercitano un impatto positivo sull'angiogenesi e sulla produzione di collagene [63]. Queste proprietà combinate con la loro somiglianza con l'ECM le rendono un ottimo DDS per la guarigione delle ferite.

3.1.6 Idrogeli

Gli idrogeli sono reticoli polimerici tridimensionali considerati ideali DDS per la cura delle ferite. La loro struttura porosa e idrofila garantisce l'assorbimento dell'essudato e crea un ambiente umido benefico per la guarigione delle ferite; la loro natura non adesiva consente di preservare il letto della ferita e permette la penetrazione dell'ossigeno, necessario per la guarigione della ferita; la loro morbida consistenza risulta confortevole nel corso del trattamento [63]. Inoltre, gli idrogeli sono in grado di incorporare vari tipi di farmaci. Possono essere preparati utilizzando materiali naturali o sintetici come chitosano, fibrina, acido ialuronico, collagene, gelatina [67].

Gli idrogeli consentono un rilascio prolungato dei farmaci. La velocità di rilascio del farmaco dipende dalla dimensione dei pori situati nel reticolo polimerico; pertanto, il profilo di rilascio può essere modulato aumentando o riducendo il grado di reticolazione del polimero [67].

Nel capitolo successivo, verranno descritte le proprietà e le applicazioni della silice mesoporosa, in quanto è il carrier di interesse di questo lavoro.

4. Particelle di silice mesoporosa

Con lo sviluppo della micro e nanotecnologia, i materiali sviluppati su scala micro e nanometrica hanno attirato una crescente attenzione in settori quali il drug delivery, l'imaging diagnostico e l'ingegneria [26]. Tra tutti i materiali disponibili, le silici mesoporose, sotto forma di particelle, hanno acquisito negli ultimi anni ampia popolarità in diversi ambiti.

Secondo la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un materiale mesoporoso è un materiale contenente pori con un diametro compreso tra 2 e 50 nm disposti in modo ordinato [69].

Nel 1992, la Mobile Research and Development Corporation ha sintetizzato la prima silice mesoporosa denominata MCM-41 (Mobil Crystalline Materials o Mobil Composition of Matter) [70]. Successivamente, sono stati sintetizzati altri tipi di MCM variando i precursori di partenza e le condizioni di reazione, come la MCM-48, caratterizzata da una disposizione cubica, e la MCM-50, avente una disposizione lamellare [70].

Nel 1998, all'università della California, a Santa Barbara, è stata sintetizzata un nuovo tipo di silice mesoporosa, con pori più grandi compresi tra 4,6 e 30 nm. Il materiale è stato chiamato SBA-15 (Santa Barbara Amorphous).

Altri tipi di silici mesoporose sono la TUD-1, la HMM-33 e la COK-12 [69]. Una rappresentazione di alcune silici è mostrata in Figura 3.2. La MCM-41 insieme a SBA-15 sono le silici mesoporose più studiate in letteratura per la somministrazione dei farmaci, seguite da MCM-48 e SBA-16 [71].

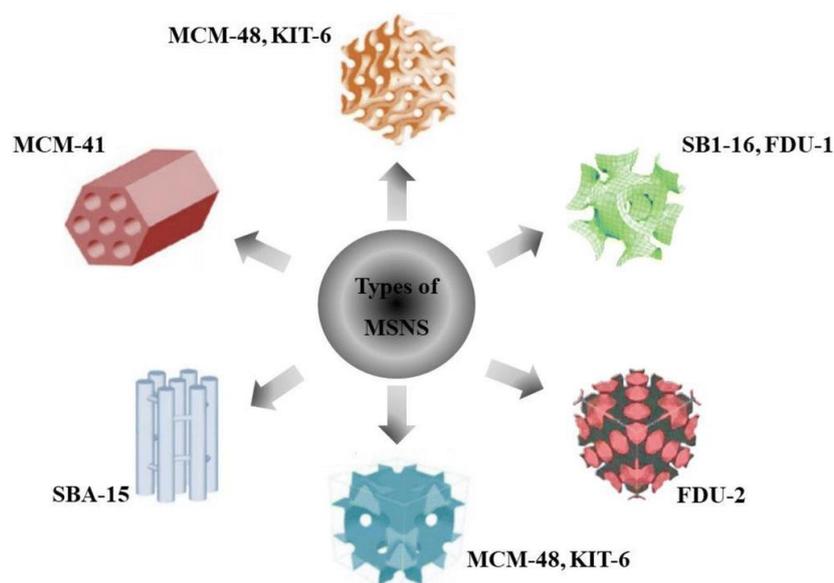


Figura 3.2: Rappresentazione schematica di alcune tipologie di silici mesoporose [69].

4.1 Metodi di sintesi

Gli elementi principali per la sintesi delle particelle di silice mesoporosa sono tre: una fonte di silice, un tensioattivo che funge da agente templante, necessario per creare i pori, e un catalizzatore acido o basico [72]. Essi devono essere scelti in modo da conferire alle particelle di silice mesoporosa tutte le caratteristiche desiderate [73].

Le particelle di silice mesoporosa sono comunemente sintetizzate con il metodo di Stöber modificato, noto anche come processo *sol-gel* [74] che consiste in una serie di reazioni di idrolisi e di condensazione dei monomeri alcossido inorganici al fine di ottenere delle particelle colloidali (sol) disperse in un liquido e convertirle in un network continuo che include una fase liquida (gel) [75]. Un esempio di processo è rappresentato dai seguenti quattro passaggi principali:

- 1) Si prepara una soluzione acquosa contenente il tensioattivo al di sopra della concentrazione micellare critica, in modo che esso formi delle micelle, consentendo, nella fase successiva, l'idrolisi e la condensazione del precursore della silice su di esse [74]. Il tensioattivo più usato è il bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB) [73];
- 2) Si aggiungono il catalizzatore e il precursore della silice, solitamente un alcossisilano $\text{Si}(\text{OR})_4$, alla miscela e si agita. Gli alcossisilani più utilizzati sono il tetraetil ortosilicato (TEOS) e il tetrametil ortosilicato (TMOS) [75]. In questa fase avviene l'idrolisi e la condensazione dell'alcossisilano, le reazioni sono mostrate in Figura 4.1; Il processo di idrolisi genera i gruppi silanolicci (Si-OH). Successivamente, i gruppi silanolicci reagiscono con altri silanoli, formando silossani ed acqua, o con alcossisilani, formando silossani e alcol, attraverso una serie di reazioni di condensazione [73]. All'aumentare dei silossani (Si-O-Si), le particelle formano degli aggregati e la loro condensazione porta alla formazione di un gel che intrappola l'acqua e l'alcol [75];

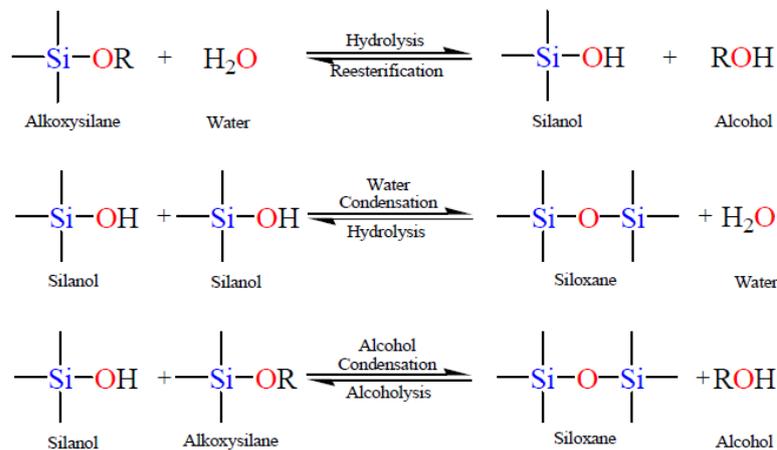


Figura 4.1: Schema delle reazioni di idrolisi e di condensazione del processo *sol-gel* [75].

- 3) Si procede con un processo di invecchiamento e si ottiene una struttura solida di silice e surfattante;
- 4) Si rimuove il tensioattivo mediante calcinazione o estrazione con solvente in modo da generare i pori. La calcinazione viene eseguita riscaldando le particelle di silice mesoporosa sintetizzate ad alta temperatura in modo da decomporre il tensioattivo. Lo svantaggio della calcinazione è legato all'alta temperatura che modifica la superficie

delle particelle. In particolare, i gruppi Si-OH reagiscono formando gruppi Si-O-Si causando il restringimento dei pori e una diminuzione dell'area superficiale. Nell'estrazione con solvente, la temperatura notevolmente inferiore rappresenta un vantaggio, mentre lo svantaggio è costituito dall'alto costo dei processi di separazione del solvente [76].

I passaggi appena descritti sono mostrati in Figura 4.2.

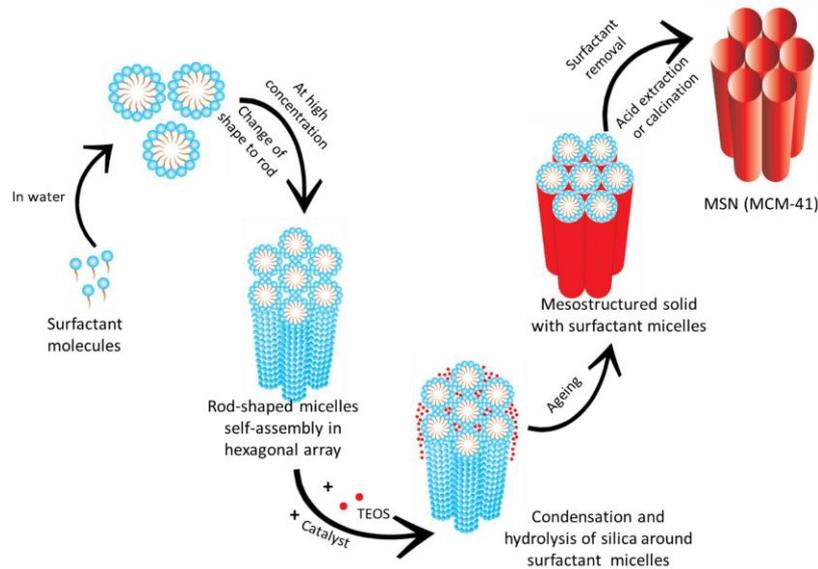


Figura 4.2: Rappresentazione schematica della sintesi di una MCM-41 con il metodo *sol-gel* [70].

Sono stati sviluppati altri metodi per la sintesi delle particelle di silice mesoporosa tra cui *hydrothermal synthesis*, *microwave synthesis*, *evaporation induced self assembly* e *ultrasonic synthesis* [70].

L'*hydrothermal synthesis* è simile al procedimento *sol-gel*: si miscelano acqua, un tensioattivo e un catalizzatore acido o basico e si aggiunge la fonte di silice. Successivamente, la soluzione viene posta in un'autoclave, dunque ad alta temperatura e pressione e, infine, viene rimosso l'agente templante [77].

La tecnica *microwave synthesis* prevede l'applicazione di un campo elettromagnetico nell'intervallo delle microonde e l'uso di alte temperature. Rispetto alla precedente tecnica, questo metodo di sintesi è più semplice e richiede un tempo più breve [77].

Nel metodo *evaporation induced self assembly*, soprattutto utilizzato per la preparazione di film, la silice e il tensioattivo vengono disciolti in acqua ed etanolo. Successivamente, viene eseguita una progressiva evaporazione dell'etanolo che determina l'autoassemblaggio delle micelle di tensioattivo e silice e la loro ulteriore organizzazione in mesofasi liquido-cristalline. Dopo aver rimosso il tensioattivo, si ottengono film mesoporosi altamente ordinati [74].

L'*ultrasonic synthesis* è un metodo di sintesi ad ultrasuoni che viene eseguito in condizioni acide utilizzando un tensioattivo cationico e una fonte di silice organica. Si ottengono particelle di silice con una struttura mesoporosa ben ordinata, con un'area superficiale superiore a 1100

m^2/g e volume dei pori intorno a $1 \text{ cm}^3/\text{g}$. Inoltre, il tempo di sintesi è molto più breve rispetto al processo *sol-gel* [74].

Per ottenere particelle di silice mesoporosa con le caratteristiche desiderate, è necessario regolare attentamente alcune condizioni di sintesi, quali il pH di reazione, la temperatura, il tensioattivo, la fonte di silice e il catalizzatore [77]. Ad esempio, la scelta del tensioattivo è importante poiché determina la dimensione dei pori che crescerà al crescere della lunghezza delle catene dei tensioattivi [70]. Se sono necessari pori più grandi è possibile aggiungere un agente rigonfiante [76]. Il tipo di catalizzatore definisce quale reazione tra l'idrolisi e la condensazione del precursore della silice sarà più veloce. In presenza di un catalizzatore acido, l'idrolisi è molto più veloce della condensazione e si formano tante piccole particelle di silice; invece, un catalizzatore basico favorisce la condensazione e si ottengono delle particelle di silice più grandi [76]. Aggiungendo determinati additivi come alcoli, ammine, basi inorganiche e sali inorganici oppure aumentando la concentrazione del precursore della silice, si verifica un aumento della dimensione delle particelle [70]. Un aumento della temperatura comporta un incremento della velocità delle reazioni di condensazione dei monomeri di silice e di conseguenza si ottengono particelle di dimensione maggiore [70].

Infine, manipolando opportunamente i parametri di sintesi è possibile cambiare anche la morfologia delle particelle di silice mesoporosa. Tuttavia, le particelle con morfologia sferica sono le più studiate [72].

4.2 Proprietà

Le particelle di silice mesoporosa presentano diverse caratteristiche:

- *Struttura porosa uniforme*: sono costituite da pori ordinati, spesso non interconnessi. Ciò consente un controllo preciso del caricamento del farmaco e della cinetica di rilascio [69].
- *Elevata area superficiale e elevato volume dei pori*: l'area superficiale si estende tipicamente intorno a $700\text{-}1000 \text{ m}^2/\text{g}$ e il volume dei pori è di circa $0,6\text{-}1 \text{ cm}^3/\text{g}$. Ciò consente un elevato carico di farmaco e una buona velocità di dissoluzione dello stesso, entrambi di particolare interesse per i farmaci scarsamente idrosolubili [71].
- *Due superfici funzionali*: sia la superficie dei pori che la superficie all'esterno delle particelle possono essere facilmente funzionalizzate grazie alla presenza dei gruppi silanolici. Questo permette un migliore controllo del caricamento e del rilascio del farmaco e, inoltre, consente il rilascio mirato degli agenti terapeutici, riducendo gli effetti collaterali [71].
- *Struttura inorganica robusta*: sono caratterizzate da una migliore resistenza a pH, stress meccanico, calore e idrolisi rispetto ad altri sistemi di somministrazione di farmaci [71]. Grazie alla loro stabilità proteggono i farmaci caricati durante il trasporto ai tessuti o alle cellule bersaglio [78].
- *Biocompatibilità e sicurezza*: una considerazione importante durante lo sviluppo di nuovi sistemi di somministrazione dei farmaci è la loro tossicità. La silice amorfa è stata riconosciuta "Generally Recognized As Safe" (GRAS) dalla Food and Drug Administration (FDA) ma non vi sono sufficienti studi riguardo la biocompatibilità delle particelle di silice mesoporosa. La valutazione della loro sicurezza non è semplice,

questo è dovuto al fatto che esistono diversi tipi di particelle di silice differenti per chimica superficiale, funzionalizzazione, dimensione e porosità [71].

Grazie a queste caratteristiche uniche, le particelle di silice mesoporosa sono emerse come carrier ideali per ospitare, proteggere e trasportare gli agenti terapeutici nel sito target. Inoltre, i mesopori mantengono il farmaco allo stato amorfo, meno stabile rispetto allo stato cristallino, facilitando la sua dissoluzione [26]. Questo aspetto è particolarmente importante nel caso di farmaci poco solubili in acqua.

Nelle sottosezioni seguenti verranno descritte le proprietà strutturali delle particelle di silice mesoporosa che influenzano il caricamento e il rilascio del farmaco.

4.2.1 Dimensione dei pori

La dimensione dei pori funge da setaccio molecolare determinando la dimensione massima delle molecole che possono essere adsorbite all'interno dei pori. Solitamente un diametro dei pori leggermente più grande di quello delle molecole è sufficiente per permettere l'adsorbimento, ma bisogna considerare che pori troppo piccoli possono ostruirsi durante il processo di caricamento del farmaco. È possibile adattare le matrici mesoporese in modo da ospitare sia piccole molecole sia macromolecole [79].

Inoltre, la dimensione dei pori influenza la capacità di carico del carrier e la velocità di rilascio del farmaco. Più grandi saranno i pori, più molecole potranno essere caricate all'interno della struttura mesoporosa, ma diminuirà la capacità di trattenerle e, di conseguenza, più veloce sarà il rilascio; invece, pori di piccola dimensione ostacoleranno la diffusione del farmaco [80].

4.2.2 Disposizione dei pori

La disposizione dei pori gioca un ruolo importante sui profili di somministrazione del farmaco. Silici mesoporese con pori disordinati e interconnessi rilasciano più rapidamente il farmaco [80].

Heikkilä et al. [81] hanno valutato il rilascio dell'ibuprofene (farmaco antinfiammatorio) dalla silice TUD-1, materiale mesoporoso disordinato, e dalla silice MCM-41, materiale mesoporoso ordinato. I risultati dello studio hanno dimostrato che TUD-1 presenta una cinetica di rilascio più rapida rispetto a MCM-41.

In uno studio effettuato da *Qu et al.* [82] è stato riscontrato che il rilascio di ibuprofene da MCM-48, silice mesoporosa con pori interconnessi, è più rapido rispetto al rilascio da MCM-41, silice mesoporosa con pori non connessi tra loro, poiché pori non interconnessi ostacolano maggiormente la diffusione del farmaco.

4.2.3 Dimensione delle particelle

Esiste una correlazione tra la velocità di rilascio del farmaco e la dimensione delle particelle.

Qu et al. [82] hanno confrontato quattro tipi di particelle di silice mesoporosa di tipo MCM-41, aventi dimensione differente, morfologia sferica e diametro dei pori simile, per il rilascio di ibuprofene. Hanno dimostrato che la velocità di rilascio del farmaco diminuisce all'aumentare

della dimensione delle particelle. Questo è attribuibile al fatto che l'aumento della dimensione delle particelle comporta un aumento della lunghezza dei pori, dunque il lungo percorso causa un lento rilascio del farmaco.

4.2.4 Area superficiale

L'area superficiale determina la quantità di farmaco che la silice può adsorbire, in quanto è il luogo principale in cui avviene l'interazione tra il carrier e le molecole.

Vallet-Regí et al. [79] hanno sintetizzato due tipi di silice, MCM-41 e SBA-15, con un'area superficiale rispettivamente di 1157 e 719 m² g⁻¹, caricandole, in seguito, con alendronato (farmaco utilizzato nel trattamento dell'osteoporosi). La massima quantità di farmaco incorporata è stata 139 mg g⁻¹ per MCM-41 e 83 mg g⁻¹ per SBA-15. Una superficie più ampia permette di adsorbire un quantitativo maggiore di farmaco.

4.2.5 Volume poroso

Durante il drug loading del farmaco possono instaurarsi deboli interazioni farmaco-farmaco che potrebbero portare al riempimento dei pori. In questo caso, il volume dei pori è un fattore chiave nel determinare la quantità di farmaco che il carrier può incorporare. Si può procedere con più impregnazioni in modo da ottenere un riempimento completo dei pori grazie alle interazioni intermolecolari del farmaco e, dunque, un maggiore quantitativo di farmaco incorporato [79]. Quindi un volume poroso elevato è in grado di ospitare un maggiore carico di farmaco.

4.3 Applicazioni biomediche

Di recente, le particelle di silice mesoporosa sono state proposte come carrier di agenti antitumorali, sia idrofobi che idrofili. Esse consentono il targeting attivo, ovvero è possibile funzionalizzare la superficie esterna delle particelle con vari tipi di ligandi, come un peptide, un anticorpo, un fattore di crescita o una vitamina, che hanno un'affinità specifica per i recettori presenti sulla superficie delle cellule tumorali [71], [83]. Ciò si traduce in una migliore attività antitumorale del farmaco e in una riduzione degli effetti tossici sui tessuti sani [71]. Inoltre, si possono utilizzare i gatekeeper per bloccare i pori delle particelle di silice, consentendo il rilascio del farmaco in un momento opportuno. Il rilascio, infatti, può essere innescato attraverso diversi stimoli interni (pH, enzimi e potenziale redox) o esterni (luce, campo magnetico e ultrasuoni) [71].

Le particelle di silice mesoporosa sono state proposte per il trattamento delle malattie ossee. I gruppi silanolici, presenti sulla loro superficie, reagiscono con i fluidi corporei generando idrossiapatite che favorisce lo sviluppo del tessuto osseo [26]. Inoltre, questi carrier sono molto studiati per il trattamento dell'osteoporosi: sono stati caricati con successo diversi agenti anti-rilascio e agenti anabolizzanti scarsamente solubili per indurre la formazione ossea [71].

Inoltre, le particelle di silice mesoporosa hanno suscitato molto interesse nei trattamenti topici. Come illustrato nel paragrafo successivo, diversi studi hanno mostrato che il loro utilizzo in vari disturbi della pelle migliora la terapia.

4.3.1 Silice per la somministrazione topica di farmaci

Come già descritto nel capitolo 1, la pelle è composta da più strati cutanei che ostacolano la permeazione del farmaco. Lo strato corneo, il più esterno, rappresenta la principale barriera e regola il passaggio dei principi attivi, applicati sulla superficie cutanea, in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche e a quelle del loro carrier. L'assorbimento cutaneo si verifica con un meccanismo di diffusione passiva ed è determinato dal gradiente di concentrazione del principio attivo tra la superficie della pelle e gli strati più interni [84].

Le particelle di silice mesoporosa sono un promettente sistema per la somministrazione topica dei principi attivi, poiché sono in grado di rilasciare localmente il farmaco e di favorirne la penetrazione negli strati più profondi della pelle migliorandone la biodisponibilità [85]. In questo contesto, la silice è utilizzata in molti campi di ricerca, tra cui farmaceutico, biomedicale e cosmetico [5].

Le particelle di silice sono state proposte come carrier di molecole utilizzate per la protezione dai raggi UV e per le loro proprietà antiossidanti. Ad esempio, *Sapino et al.* [86] hanno valutato il potenziale delle particelle di silice mesoporosa ammino-funzionalizzate come carrier topico per la somministrazione della quercetina, un antiossidante. La quercetina è usata in vari disturbi della pelle, come la dermatite atopica o la psoriasi, e nelle formulazioni per la protezione solare. In questo studio è stato dimostrato che l'incorporazione della quercetina nelle particelle di silice comporta un aumento della penetrazione cutanea della molecola di interesse.

Sapino et al. [85] hanno sviluppato una serie di formulazioni dermiche per la somministrazione topica di metotrexato tramite particelle di silice mesoporosa di tipo MCM-41. Si tratta di un farmaco che presenta attività citotossica, spesso usato come agente chemioterapico per il trattamento di numerosi tumori ma anche nella cura di vari disturbi della pelle, come la psoriasi. Uno dei maggiori problemi della somministrazione per via cutanea è la sua solubilità in acqua e la sua forma ionizzata a pH fisiologico che ne limitano l'assorbimento cutaneo tramite diffusione passiva. Dal suddetto studio è emerso che l'assorbimento del metotrexato migliora se incorporato nelle particelle di silice mesoporosa e che, tale assorbimento, può essere potenziato dall'aggiunta di burro di karitè (un potenziatore della permeazione) nella formulazione.

È stato anche valutato l'uso delle particelle di silice mesoporosa per la somministrazione di anestetici sulla pelle. Una formulazione topica anestetica che offre elevata biodisponibilità e permeazione cutanea, evitando i dolori legati all'iniezione, è di grande interesse [5]. In uno studio condotto da *Nafisi et al.* [87], la lidocaina, un anestetico topico caratterizzato da un assorbimento cutaneo trascurabile, è stata incorporata sia nella silice di tipo MCM-41 sia nella MCM-41 ammino-funzionalizzata (MCM-41-NH₂). È stata osservata una maggiore affinità della lidocaina per MCM-41-NH₂ che ha portato ad una maggiore incorporazione dell'anestetico all'interno dei pori. Inoltre, la silice funzionalizzata ha favorito maggiormente la permeazione cutanea della lidocaina rispetto a MCM-41.

Le infezioni fungine della pelle sono tra le condizioni dermatologiche più ricorrenti e solitamente sono trattate con creme, lozioni o polveri contenenti farmaci antifungini. Tuttavia, alcuni antimicotici hanno un utilizzo limitato a causa della loro bassa solubilità e della scarsa velocità di dissoluzione. Le particelle di silice sono interessanti carrier per prodotti

antifungini, poiché migliorano il rilascio del farmaco da un'opportuna formulazione e aumentano l'attività antifungina [5].

Esistono molti altri studi riguardanti i molteplici usi delle particelle di silice mesoporosa per la somministrazione topica di molecole terapeutiche quali corticosteroidi, antimicotici, antivirali, antibiotici, anestetici locali, antineoplastici e molecole antiossidanti [88].

4.3.2 Silice e guarigione delle ferite

Il silicio (Si) è il terzo oligoelemento più abbondante nel corpo umano dopo ferro e zinco. La sua assunzione giornaliera media da parte degli adulti è di circa 20-50 mg. Alcuni studi sugli esseri umani hanno riportato che l'integrazione di Si, o una maggiore assunzione con la dieta, migliora la salute delle ossa e della pelle [13].

La silice è un composto del silicio la cui formula è SiO_2 . Più unità tetraedriche SiO_4 unite fra loro costituiscono le particelle di silice; in esse sono presenti principalmente legami Si-O aventi una energia di legame di 452 KJ/ mol [89]. Le particelle di silice possono essere idrofile per la presenza sulla loro superficie di gruppi idrossilici, come è schematizzato in Figura 3.3. In un mezzo acquoso la silice reagisce con acqua formando acido ortosilicico (Si(OH)_4), secondo la seguente reazione:

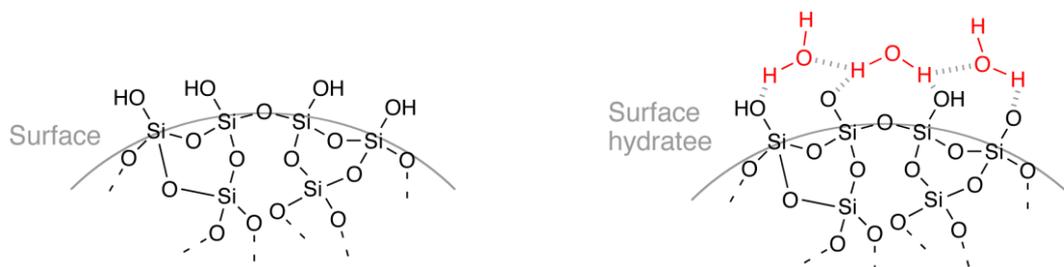


Figura 3.3: Rappresentazione schematica della superficie delle particelle di silice, in presenza o meno di un mezzo acquoso [89].

Trattamenti a base di silicio promuovono la guarigione delle ferite, favorendo una cicatrizzazione più rapida ed efficiente grazie al rilascio di acido ortosilicico. Si tratta di una piccola molecola che si diffonde facilmente, quindi il suo mantenimento nell'ambiente della ferita richiede un lento rilascio [13].

Uno studio *in vitro*, condotto da *Quignard et al.* [13], ha dimostrato che le particelle di silice possono avere un impatto positivo sulla proliferazione e sulla migrazione dei fibroblasti, favorendo la guarigione delle ferite. In particolare, le particelle cariche positivamente (funzionalizzate con 3-amminopropiltrirossisilano) promuovono maggiormente la chiusura della ferita, sono state rapidamente assorbite dalle cellule e si sono dissolte rilasciando acido ortosilicico sia all'interno che all'esterno delle cellule.

Il fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF) svolge un ruolo chiave nella guarigione delle ferite, stimola la proliferazione cellulare e la rigenerazione dei vasi sanguigni. Tuttavia, è facilmente degradabile nei sistemi biologici. *Zhang et al.* [90] hanno utilizzato le particelle di

silice mesoporosa come carrier per il rilascio prolungato del fattore di crescita. I risultati ottenuti mostrano che questo DDS è in grado di rilasciare il bFGF per 20 giorni e di promuovere la proliferazione cellulare.

Vari studi hanno messo in luce gli effetti benefici dell'ossido nitrico, una piccola molecola che svolge un ruolo importante nella guarigione delle ferite (come visto nel capitolo 2). *Hetrick et al.* [91] hanno dimostrato che le particelle di silice che rilasciano NO hanno la capacità di uccidere cellule microbiche che formano biofilm, con un'efficacia maggiore del 99,99%. La massima efficacia è stata riscontrata contro i batteri gram-negativi quali *P. aeruginosa* e *E. coli*; ciò è importante poiché i batteri gram-negativi sono più invasivi e più difficili da trattare rispetto ai batteri gram-positivi. Gli studiosi hanno inoltre riscontrato che la tossicità delle particelle di silice nei confronti dei fibroblasti è paragonabile o inferiore rispetto ad altri antisettici topici comunemente utilizzati. Il suddetto studio evidenzia l'importanza delle particelle di silice che forniscono NO per il trattamento delle infezioni, comprese quelle che caratterizzano le ferite croniche.

Le particelle di silice mesoporosa rappresentano un carrier particolarmente promettente per la guarigione delle ferite poiché, oltre a fornire acido ortosilicico quando si dissolvono, possono essere caricate con molecole terapeutiche, come l'arginina, che favoriscono la rigenerazione della cute lesa.

5. Materiali e Metodi

5.1 Materiali

Per la sintesi delle particelle di silice mesoporosa e le successive caratterizzazioni sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Acqua per cromatografia (LC-MS Grade) LiChrosolv®, Merck KGaA;
- Etanolo assoluto anidro (C₂H₅OH), Carlo Erba;
- Idrossido di ammonio (NH₄OH), 28.0-30.0% base NH₃, Sigma-Aldrich®;
- Bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB, C₁₉H₄₂BrN), BioXtra, ≥99%, Sigma-Aldrich®;
- Ortosilicato di tetraetile (TEOS, SiC₈H₂₀O₄), 99,999%, Sigma-Aldrich®;
- Acido cloridrico (HCl), 37%, Sigma-Aldrich®;
- Pluronic P123 (HO(CH₂CH₂O)₂₀(CH₂CH(CH₃)O)₇₀(CH₂CH₂O)₂₀H), Sigma-Aldrich®;
- Mesitilene (TMB, C₉H₁₂), 98%, Sigma-Aldrich®;
- Cloruro di potassio (KCl), Sigma-Aldrich®;
- L-Arginina (C₆H₁₄N₄O₂), >99,5%, Sigma-Aldrich®;

5.2 Sintesi

In questo lavoro di tesi sono state sintetizzate due tipi di particelle di silice mesoporosa, denominate Particelle Sferiche di Silice Mesoporosa (PSSM) e Microsfere di Silice Mesoporosa (MSM), con l'obiettivo di ottenere delle particelle con stessa morfologia sferica e differente diametro dei pori.

5.2.1 Sintesi delle PSSM

Per la sintesi delle PSSM, riportata in Figura 5.1, è stato utilizzato il procedimento di Ambati *et al.* [92], con la differenza che sono state raddoppiate tutte le dosi in modo da ottenere una maggiore quantità di materiale.

In questo metodo di sintesi, si utilizza il TEOS come fonte di silice e il CTAB come agente templante. Per controllare la morfologia delle particelle di silice si utilizza l'etanolo come cosolvente il quale favorisce la formazione di particelle sferiche [93].

Si miscelano 41,8 g di acqua, 53,6 g di etanolo e 13,8 g di idrossido di ammonio, si ottiene una miscela alla quale si aggiungono 2,2 g di CTAB. La miscela viene mantenuta in agitazione, con un agitatore magnetico, per trenta minuti. Successivamente, si aggiungono 4,2 g di TEOS goccia a goccia agitando continuamente per un minuto. Si procede con l'invecchiamento, mantenendo la soluzione in agitazione continua per due ore a temperatura ambiente. Si ottiene un precipitato bianco, il quale viene filtrato e lavato con acqua deionizzata al fine di rimuovere eventuali reagenti residui. In seguito, il filtrato viene essiccato in stufa a 50°C per una notte, ottenendo una polvere bianca. Infine, si procede con la calcinazione in aria della silice a 500°C per quattro ore in muffola in modo da rimuovere il tensioattivo.

Al termine della procedura di sintesi la quantità di silice ottenuta è di circa 1 grammo.

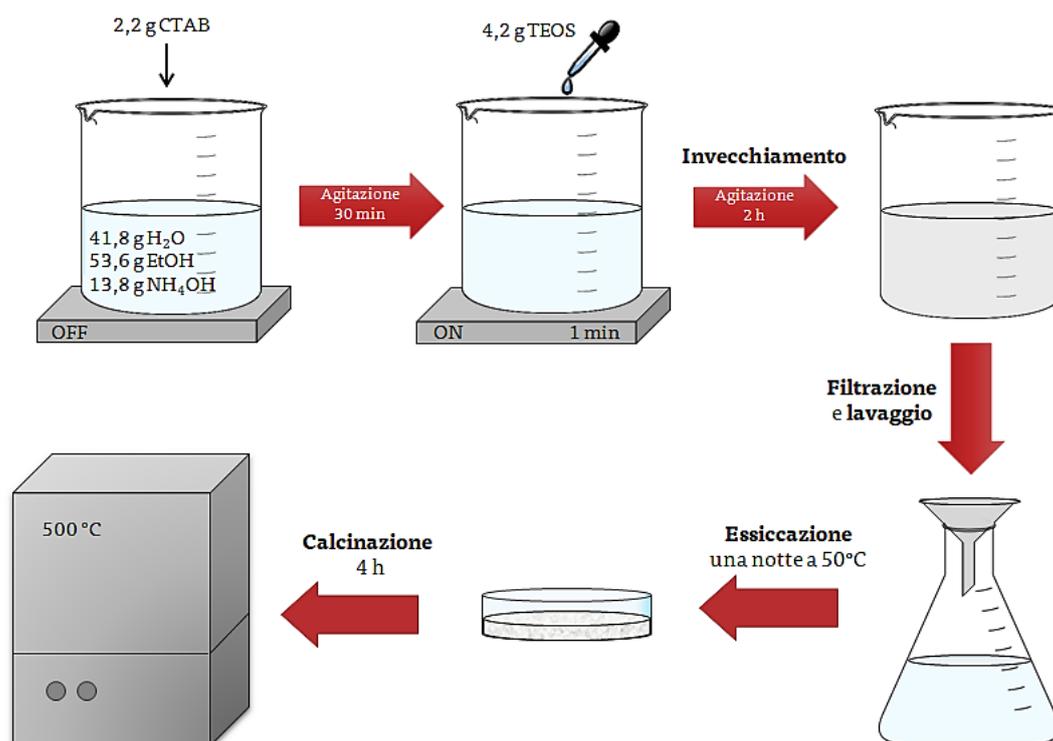


Figura 5.1: Schema di sintesi delle PSSM.

5.2.2 Sintesi delle MSM

Per la sintesi delle MSM, riportata in Figura 5.2, è stato seguito il metodo di Wang *et al.* [94].

In questa procedura di sintesi si utilizza il Pluronic P123 come agente templante e il TEOS come precursore della silice e si impiega il mesitilene come agente rigonfiante, in particolare il suo ruolo è di incrementare la dimensione dei pori. Inoltre, l'uso del mesitilene insieme al KCl consente la sintesi di particelle sferiche di silice.

Si disciolgono 23,6 g di HCl in 120 g di H₂O deionizzata, alla soluzione si aggiungono 4 g di Pluronic P123 e 6,1 g di KCl e si agita con un agitatore magnetico fin quando la soluzione risulta essere trasparente. A questo punto, si procede con l'aggiunta di 3 g di TMB. Si mantiene la soluzione in agitazione per due ore e successivamente si aggiungono 8,5 g di TEOS goccia a goccia continuando ad agitare per dieci minuti. Si pone la miscela risultate in un contenitore di politetrafluoroetilene; questo viene immerso in un bagno d'olio al fine di mantenere costante la temperatura a 35°C per ventiquattro ore. Trascorse le ventiquattro ore, si aumenta la temperatura a 100°C e la si mantiene tale per ventiquattro ore e, a differenza di quanto riportato nella procedura di riferimento, il tappo del contenitore viene chiuso in modo da effettuare un trattamento idrotermale. Il precipitato ottenuto viene filtrato e lavato con acqua deionizzata in modo da eliminare eventuali residui di sale. Per rimuovere l'acqua rimanente, si pone il filtrato in stufa a 50°C per una notte. A differenza dell'articolo di riferimento, l'essiccazione non viene effettuata in presenza di vuoto. Infine, l'agente templante si rimuove mediante calcinazione a 500°C per sei ore, utilizzando una muffola nella quale la temperatura desiderata viene raggiunta con un incremento di 1°C/min.

Con questa sintesi si ottengono circa 2,16 grammi di silice.

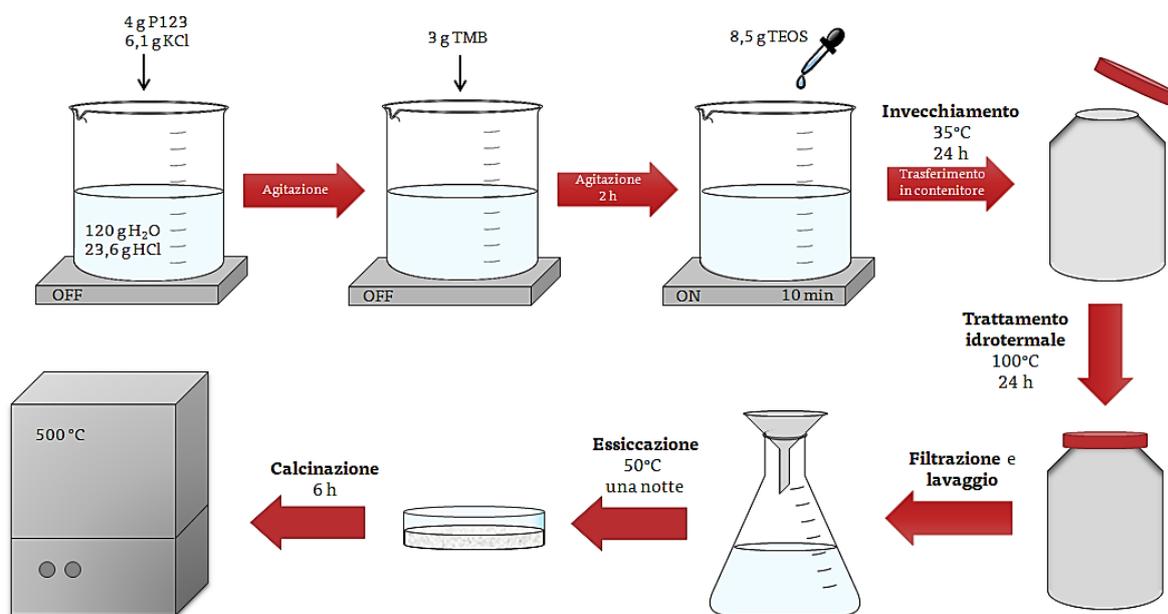


Figura 5.2: Schema di sintesi delle MSM.

5.3 Drug loading

L'incorporazione di principi attivi nei carrier inorganici può essere realizzata in vari modi, in questo lavoro è stata effettuata per impregnazione. Questo metodo prevede la preparazione di una soluzione acquosa, contenente il principio attivo, che viene aggiunta goccia a goccia al materiale mesoporoso e, di conseguenza, parte di essa andrà a riempire i pori per capillarità e il farmaco verrà adsorbito sulla superficie interna del carrier [71]. Il sistema viene essiccato per far evaporare il solvente e, durante l'essiccamento, il principio attivo situato nella soluzione fuori dai pori viene guidato all'interno di essi per diffusione.

L'impregnazione da soluzione acquosa è un processo ecosostenibile in quanto non prevede l'uso di solvente organici. Inoltre, il vantaggio principale di questa tecnica di drug loading è la possibilità di conoscere la quantità di farmaco incorporata nel carrier [95].

In questo lavoro, per l'impregnazione dei due campioni di silice sintetizzati è stata seguita una procedura riportata nell'articolo di Solanki e Patel [96] nel quale 1 g di silice di tipo MCM-48 è stato impregnato con una soluzione acquosa di arginina (0,1/10 – 0,2/20 - 0,3/30 g/ml di acqua distillata) e, successivamente, la silice è stata essiccata a 100°C per cinque ore.

Sono state effettuate due impregnazioni: una a pH circa 11 e l'altra a pH circa 5.

Inizialmente, sono stati disciolti 50 mg di arginina in 5 ml di acqua, ottenendo una soluzione avente un pH di circa 11. Dalla soluzione ottenuta, 2,5 ml sono stati pipettati su 250 mg di PSSM e 2,5 ml su 250 mg di MSM. Successivamente, le due silici sono state poste in stufa a 80°C per due ore per favorire l'evaporazione dell'acqua. I due campioni ottenuti sono stati denominati Arg_11@PSSM e Arg_11@MSM.

Per l'impregnazione a pH circa 5 si è proceduto nello stesso modo, con la differenza che nella soluzione di arginina e acqua è stato aggiunto 1 ml di soluzione acquosa di acido cloridrico

di concentrazione 1% in massa in modo da ottenere il pH desiderato. Le due silici impregnate sono state denominate Arg_5@PSSM e Arg_5@MSM.

5.4 Caratterizzazione

Per tutti i DDS, la caratterizzazione dettagliata è una parte importante del lavoro di ricerca e sviluppo al fine di realizzare dei sistemi con le proprietà desiderate.

I materiali ottenuti sono stati caratterizzati utilizzando varie analisi fisico-chimiche come la Diffrazione a Raggi X (XRD), la Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR), il fisisorbimento di azoto, l'Analisi Termogravimetrica (TGA), la Microscopia Elettronica a Scansione ad Emissione di Campo (FESEM) e la Spettroscopia UV-visibile.

Queste tecniche di caratterizzazione verranno descritte brevemente nelle sottosezioni seguenti.

5.4.1 Diffrazione a Raggi X (XRD)

La diffrazione a raggi X è una tecnica analitica non distruttiva, molto utilizzata nella caratterizzazione dei materiali, che richiede una piccola quantità di campione per l'analisi. In campo farmaceutico è la principale tecnica usata per valutare la cristallinità dei farmaci e dei carrier e per identificare le fasi cristalline dei contaminanti nei processi di sintesi [97].

I dati della XRD sono stati ottenuti con il diffrattometro *Panalytical X'Pert³ Powder* con radiazione Cu K α , utilizzando una tensione di 40 kV e una corrente di 40 mA. Sono state effettuate analisi ad alti angoli (da 5° a 60°) delle silici, grazie alle quali è possibile valutare se il materiale sia amorfo o cristallino e, inoltre, permettono di rilevare la presenza di eventuali impurità. Successivamente, sono stati analizzati i campioni impregnati con arginina per verificare che essa non abbia assunto forma cristallina.

Al termine delle analisi si ottengono dei grafici che mettono in relazione l'intensità con l'angolo di diffrazione (2θ).

5.4.2 Fisisorbimento di azoto

L'adsorbimento è un fenomeno superficiale che si verifica su un solido (adsorbente) nel momento in cui entra in contatto con un fluido (adsorbato). A seconda del tipo di interazioni che si instaurano tra adsorbato e adsorbente, l'adsorbimento è definito fisisorbimento o chemisorbimento: nel primo caso si formano interazioni deboli, principalmente forze di van der Waal, nel secondo caso si formano legami chimici. Il fisisorbimento, contrariamente al chemisorbimento, è generalmente reversibile anche a basse temperature poiché le interazioni adsorbente-adsorbato sono deboli.

L'adsorbimento di un gas da parte di un materiale è descritto quantitativamente da un'isoterma di adsorbimento che mette in relazione la quantità di gas adsorbita dal materiale e la pressione oppure, nel caso di vapori, la pressione relativa (ovvero p/p° , dove p è la pressione di equilibrio e p° è la tensione di vapore) ad una determinata temperatura [98], [75].

L'analisi di fisisorbimento di azoto è utilizzata per ottenere importanti parametri strutturali di un materiale come l'area superficiale specifica, il diametro medio e la distribuzione della dimensione dei pori e il volume poroso. L'azoto è il gas più utilizzato ma possono anche essere impiegati altri gas come l'argon [99].

Nel 2015, la IUPAC ha identificato sei tipi di isoterme di adsorbimento, due delle quali si dividono in due sottocategorie, illustrate in Figura 5.3: i materiali microporosi sono caratterizzati da un'isoterma di tipo I; le isoterme di tipo II, III e VI sono tipiche dei materiali macroporosi o non porosi; infine, le isoterme di tipo IV e V sono caratteristiche dei materiali mesoporosi [98].

Le particelle di silice mesoporosa sono caratterizzate da un'isoterma di tipo IV la quale si divide in due sottocategorie: l'isoterma di tipo IV(a) caratterizzata dal ciclo di isteresi, dovuto alla condensazione capillare che avviene nei mesopori, e l'isoterma di tipo IV(b) senza isteresi [100]. La prima si ottiene quando l'adsorbato è azoto a 77 K e in presenza di un materiale avente pori con diametro maggiore di 4 nm. Invece, la seconda si ha quando il diametro dei pori è inferiore a 4 nm.

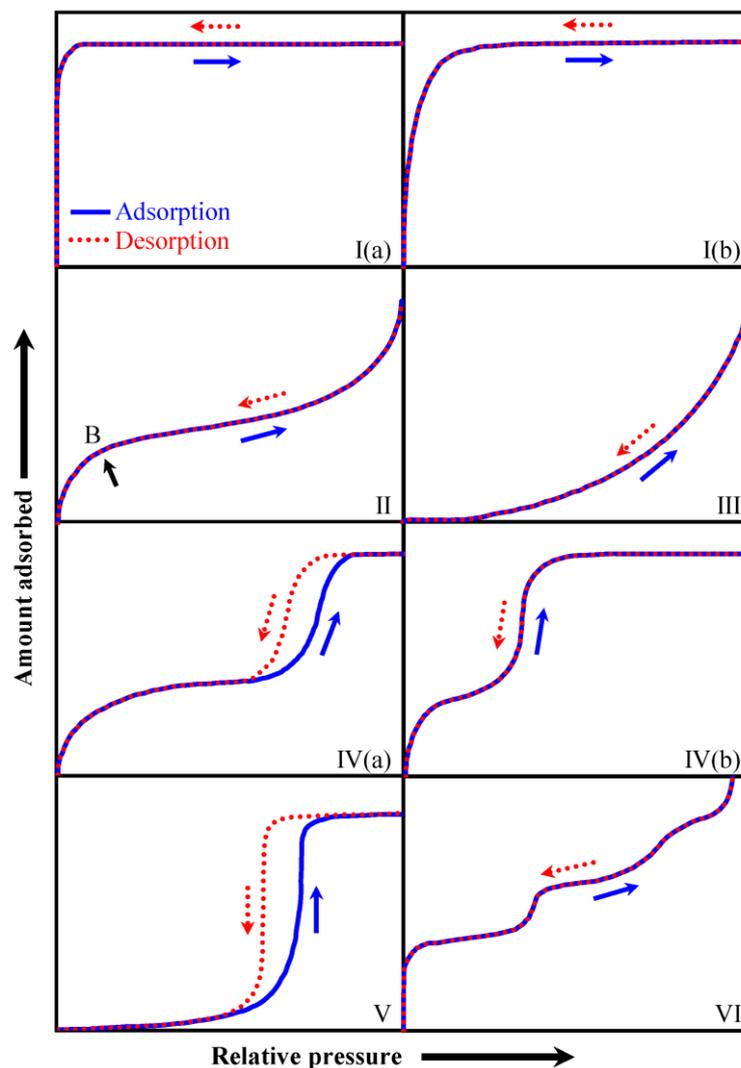


Figura 5.3: Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [100].

Il ciclo (o coppia) di isteresi è presente sia nell'isoterma di tipo IV sia in quella di tipo V. Si verifica la sua formazione quando il ramo di desorbimento è diverso da quello di adsorbimento. Si è notato che esiste una correlazione tra la struttura di un materiale mesoporoso e la forma del ciclo di isteresi. È presente anche una classificazione IUPAC dei cappi di isteresi, mostrata in Figura 5.4.

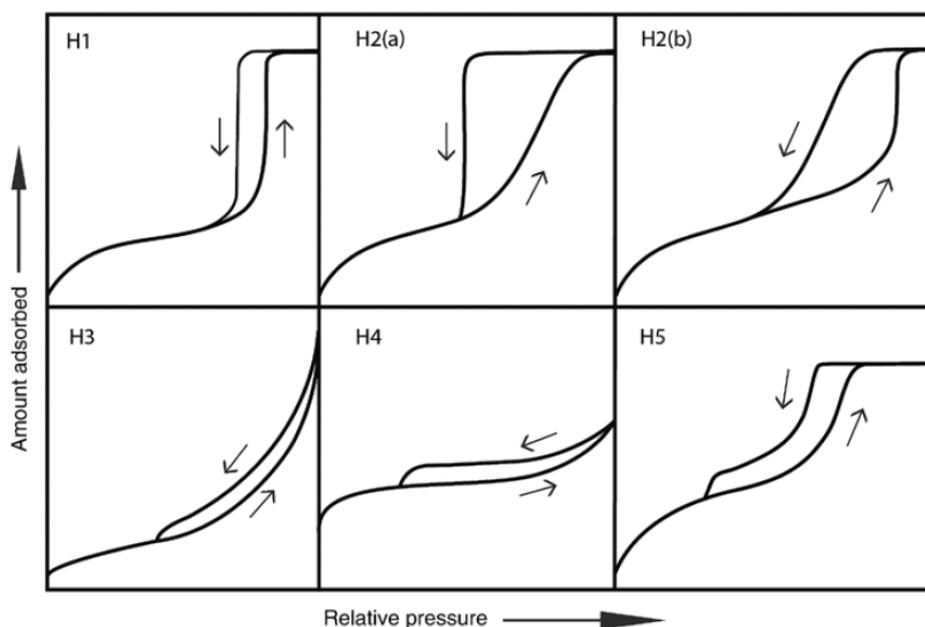


Figura 5.4: Classificazione IUPAC dei cicli di isteresi [101].

Il coppia di isteresi di tipo H1 è associato a materiali mesoporosi caratterizzati da una distribuzione stretta e regolare dei pori, come MCM-41 e SBA-15 che presentano entrambi pori cilindrici. Il tipo H2 è caratteristico di materiali disordinati aventi pori interconnessi di diversa forma. I materiali caratterizzati da un coppia di isteresi di tipo H3 presentano dei pori a forma di fessura. Il tipo H4 è associato a solidi aventi pori a forma di fessura stretta, come i carboni attivi [98]. Infine, il ciclo di isteresi di tipo H5 è più insolito ed è associato a materiali contenenti pori sia aperti sia parzialmente ostruiti, detti quest'ultimi pori a "collo di bottiglia" [101].

Le analisi di fisisorbimento delle PSSM, tal quali e impregnate, sono state condotte con lo strumento *ASAP 2020 Plus Micromeritics*, utilizzando azoto liquido. Per le varie misure sono stati utilizzati circa 100 mg di campione, sono stati inseriti in una buretta di vetro e sottoposti a degasaggio, prima dell'analisi, per quattro ore a 70°C per le particelle di silice contenenti arginina e a 150°C per il materiale non impregnato, con lo scopo di rimuovere l'acqua ed eventuali contaminanti.

Per le analisi delle MSM, tal quali e impregnate, è stato utilizzato lo strumento *Quantachrome AUTOSORB-1*. Anche in questo caso sono stati utilizzati circa 100 mg di campione che sono stati sottoposti a degasaggio per due ore a 150°C per il materiale non impregnato e a 70°C per i campioni impregnati.

Per la determinazione dell'area superficiale specifica è stato impiegato il modello BET (Brunauer – Emmet – Teller), molto utilizzato nella caratterizzazione dei materiali porosi. Per

determinare la distribuzione della dimensione dei pori è stato utilizzato il modello DFT (Density Functional Theory) per le MSM e il modello BJH (Barret – Joyner – Halenda) per le PSSM. Quest'ultimo modello sottostima di circa un 20-30% la dimensione dei pori con diametro inferiore o uguale a 10 nm [101].

5.4.3 Microscopia a Scansione Elettronica a Emissione di Campo (FESEM)

La Microscopia Elettronica a Scansione ad Emissione di Campo (FESEM) è una tecnica microscopica utilizzata per identificare la morfologia dei materiali. In questo lavoro, questa tecnica è stata utilizzata per ottenere informazioni su morfologia e dimensioni delle particelle di silice sintetizzate; inoltre, è stata utilizzata per rilevare eventuali alterazioni nella morfologia delle particelle dopo l'incorporazione dell'arginina.

Per la caratterizzazione delle PSSM è stato utilizzato il FESEM *Zeiss Merlin*. Prima dell'analisi si è proceduto con la metallizzazione dei campioni con platino. Sono state ottenute delle immagini della superficie delle particelle a diverse scale, 1 μm , 100 nm e 200 nm, grazie all'utilizzo di diversi ingrandimenti, da 10.000 K X a 20.00 K X.

Per le MSM è stato usato il FESEM *Fei Quanta 200F*. Sono state ottenute delle immagini a diverse scale, 50 μm , 10 μm , 5 μm , 2 μm , 1 μm , utilizzando ingrandimenti che vanno da 1.000 X a 50.000 X.

5.4.4 Analisi Termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica di caratterizzazione che consiste nella misurazione della variazione di massa di un campione in funzione del tempo o della temperatura. Grazie alla misura termogravimetrica è possibile stimare la quantità di principio attivo incorporata in un carrier.

Confrontando la diminuzione della massa di un campione impregnato di farmaco e dello stesso non impregnato, è possibile stimare la massa di farmaco degradata e, dunque, la quantità di principio attivo presente nel campione.

Nel presente lavoro le misure termogravimetriche sono state condotte utilizzando *STA PT 1600 LINSEIS*. I vari campioni da analizzare sono stati inseriti di volta in volta all'interno di un piccolo crogiolo di allumina, posto su una bilancia che ne monitora la perdita di peso. Le prove sono state condotte in aria con temperature che vanno da 25°C a 800°C con un incremento di temperatura di 10°C/min.

Dall'analisi si ottiene un grafico che riporta sull'asse delle ascisse la temperatura e sull'asse delle ordinate la variazione della massa del campione.

5.4.5 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa è una tecnica spettroscopica utilizzata per identificare i gruppi funzionali presenti in un campione. Questa tecnica analitica si basa sull'interazione fra radiazione elettromagnetica e materia. Più precisamente, si tratta di una spettroscopia vibrazionale; infatti, quando una molecola organica viene investita da una radiazione infrarossa, l'energia ceduta da quest'ultima viene convertita in energia vibrazionale, causando la

vibrazione della molecola. Si possono distinguere due tipi di vibrazione: la vibrazione di *stretching* (stiramento), dovuta alla variazione della distanza interatomica, e la vibrazione di *bending* (piegamento), dovuta alla deformazione dell'angolo di legame [102].

Lo spettro infrarosso, ottenuto diagrammando l'assorbanza in funzione del numero d'onda del fotone incidente, è caratterizzato da picchi che corrispondono a gruppi funzionali specifici [102].

La Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR) è una tecnica spettroscopica che registra l'assorbanza in funzione del tempo; si ricava lo spettro in funzione del numero d'onda tramite la trasformata di Fourier, un'operazione matematica effettuata dal calcolatore dello strumento. Questo tipo di spettroscopia garantisce prestazioni più elevate e, inoltre, i tempi di analisi risultano sensibilmente ridotti [103].

Per l'analisi FT-IR è stato utilizzato lo spettrofotometro *Equinox 55 Bruker* connesso al software *OPUS*.

Prima di procedere con l'analisi, è necessario preparare una pastiglia, a partire dalla polvere di silice o di silice impregnata con arginina, utilizzando una pastigliatrice ed una pressa idraulica. La pastiglia ottenuta viene inserita in una bustina d'oro forata e il tutto viene posto in una cella di vetro che presenta ad un'estremità delle finestre di KBr, un sale trasparente alle radiazioni infrarosse. Si procede con il degasaggio del campione per circa quarantacinque minuti a 0,1 Pascal in modo da rimuovere l'acqua fisisorbita ed eventuali contaminanti. Successivamente, si inserisce il campione nello strumento e si effettua l'analisi.

5.5 Rilasci

Per lo studio del rilascio di arginina dai diversi carrier, sono stati effettuati dei test di dissoluzione. Come fase ricevente è stata utilizzata acqua deionizzata in quanto l'arginina è molto solubile in essa e, inoltre, l'acqua costituisce circa il 90% dell'essudato delle ferite.

Si è proceduto inserendo 10 mg di campione impregnato e 10 ml di acqua deionizzata in diversi flaconcini di vetro che sono stati posti in seguito su un agitatore magnetico (Figura 5.5).

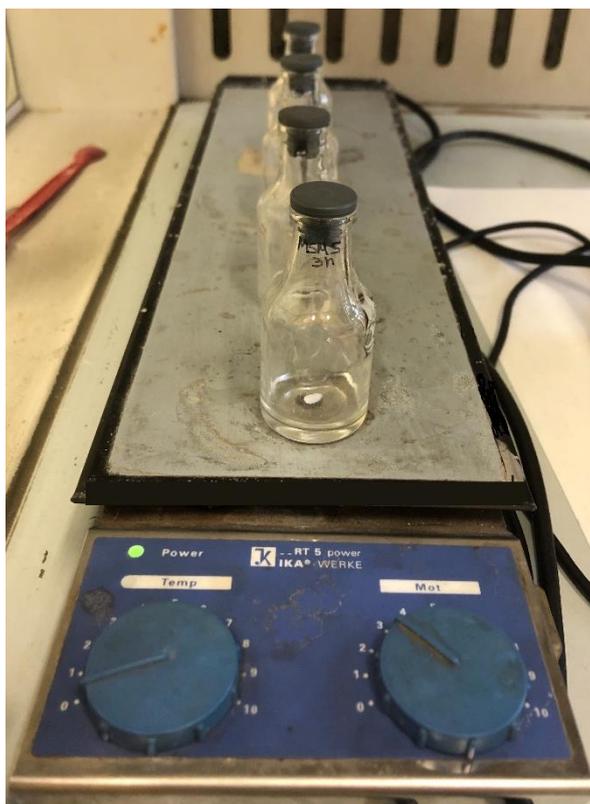


Figura 5.5: Test di dissoluzione.

A tempi prefissati, dieci minuti e un'ora, i diversi campioni sono stati recuperati per filtrazione, essiccati ed analizzati mediante FT-IR. Gli spettri ottenuti sono stati normalizzati rispetto all'intensità delle due bande (presenti a circa 2000 cm^{-1} e 1860 cm^{-1}) relative alle armoniche dei modi di reticolo dovuti ai tetraedri SiO_4 presenti nella struttura della silice. Successivamente, è stata effettuata un'analisi semiquantitativa della quantità di arginina presente nei vari campioni considerando la banda di assorbimento più intensa dell'arginina, presente a 1670 cm^{-1} , corrispondente alla vibrazione di stretching del gruppo guanidinico. Stimata la quantità di arginina ancora presente nei vari campioni ai diversi tempi di rilascio, è possibile conoscere la quantità di arginina rilasciata calcolando il complemento a 100.

6. Caratterizzazione delle silici

6.1 Caratterizzazione delle PSSM

➤ Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)

In Figura 6.1 sono riportate le immagini FESEM delle PSSM sintetizzate. È chiaramente visibile che si tratta di particelle con morfologia sferica, in accordo con quanto riportato nell'articolo di riferimento per la sintesi di questa silice [92].

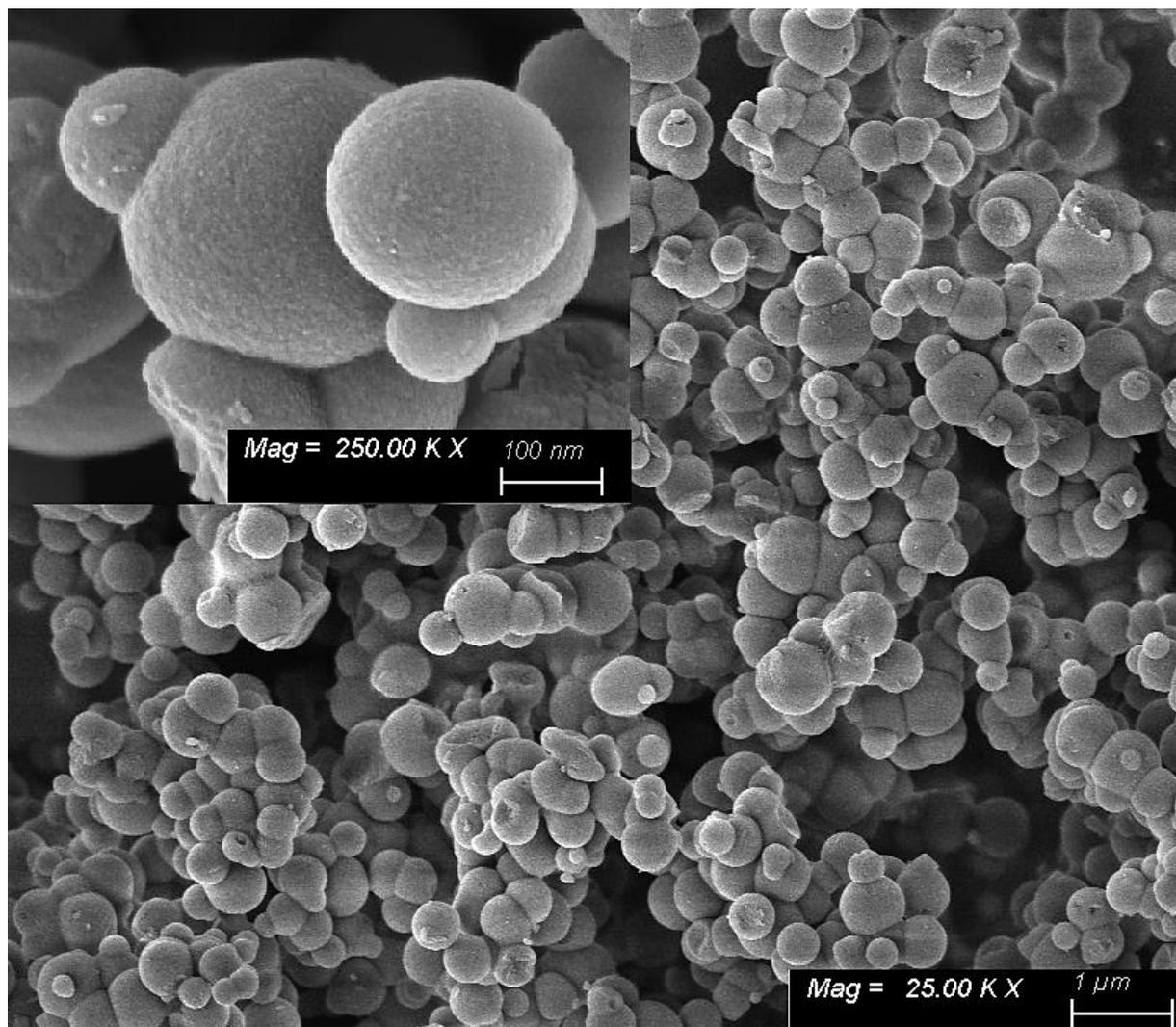


Figura 6.1: Immagini FESEM delle PSSM sintetizzate a diversi ingrandimenti e scale.

Utilizzando il programma *ImageJ* [104] si è proceduto con il calcolo della dimensione media delle particelle, dal momento che, come si evince dalle immagini sopra riportate, il diametro delle particelle non è uniforme. È stato misurato il diametro di 113 particelle da più immagini a diversi ingrandimenti ed è stata ottenuta la distribuzione della dimensione riportata in Figura 6.2. Le dimensioni delle PSSM vanno da circa 200 nm a circa 757 nm e la dimensioni media è di 466 nm.

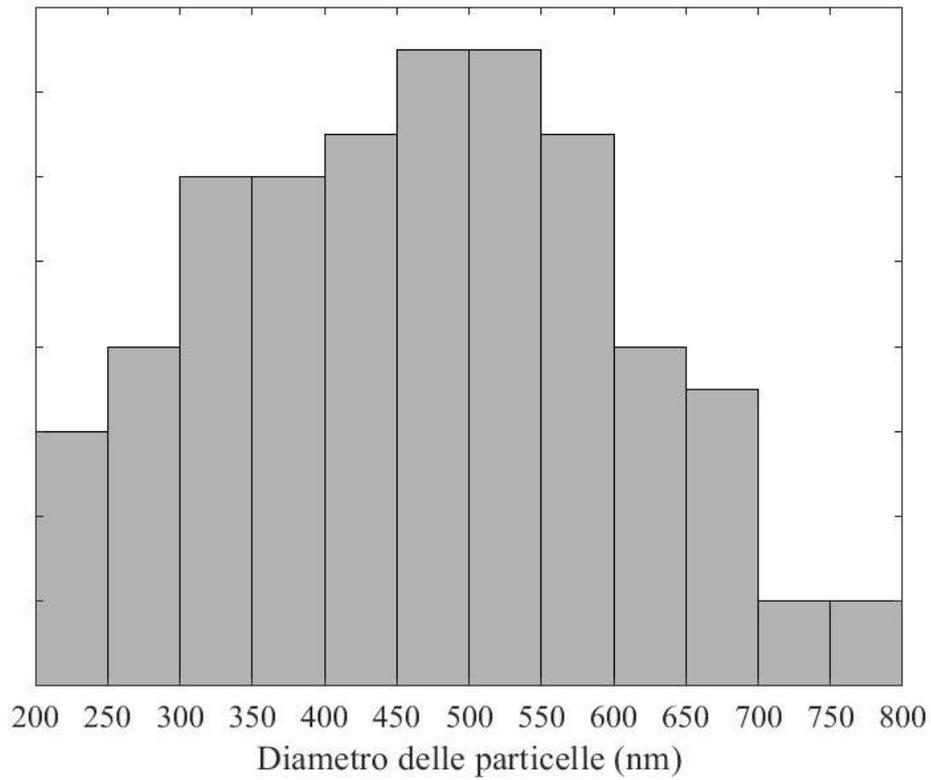


Figura 6.2: Distribuzione della dimensione delle PSSM.

➤ Diffrazione a raggi X (XRD)

In Figura 6.3 è riportato lo spettro XRD ad alti angoli delle PSSM. Non si osservano picchi ben risolti, ciò indica che il campione sintetizzato presenta una struttura amorfa.

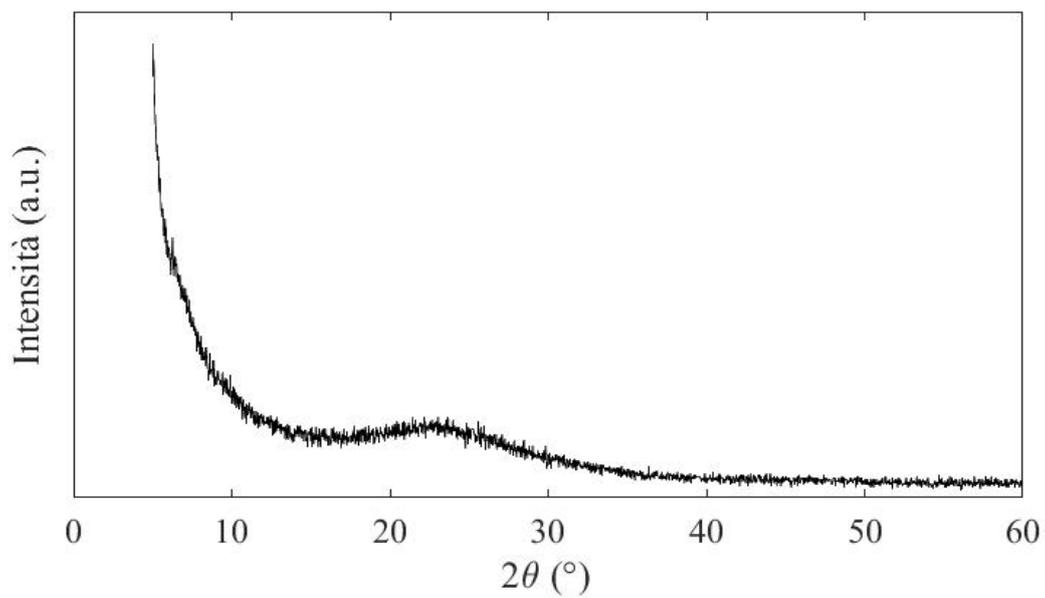


Figura 6.3: Spettro XRD ad alti angoli delle PSSM.

➤ Analisi di fisisorbimento di azoto

L'isoterma delle PSSM, ottenuta mediante l'analisi di fisisorbimento di azoto condotta a 77 K, è riportata in Figura 6.4. Si tratta di un'isoterma di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi. L'isoterma ottenuta non presenta un coppia di isteresi poiché il materiale presenta pori con un diametro inferiore a 4 nm [100].

Al fine di determinare la distribuzione della dimensione dei pori e la dimensione media degli stessi, è stato utilizzato il modello BJH. La distribuzione dei pori, mostrata in Figura 6.5, è unimodale.

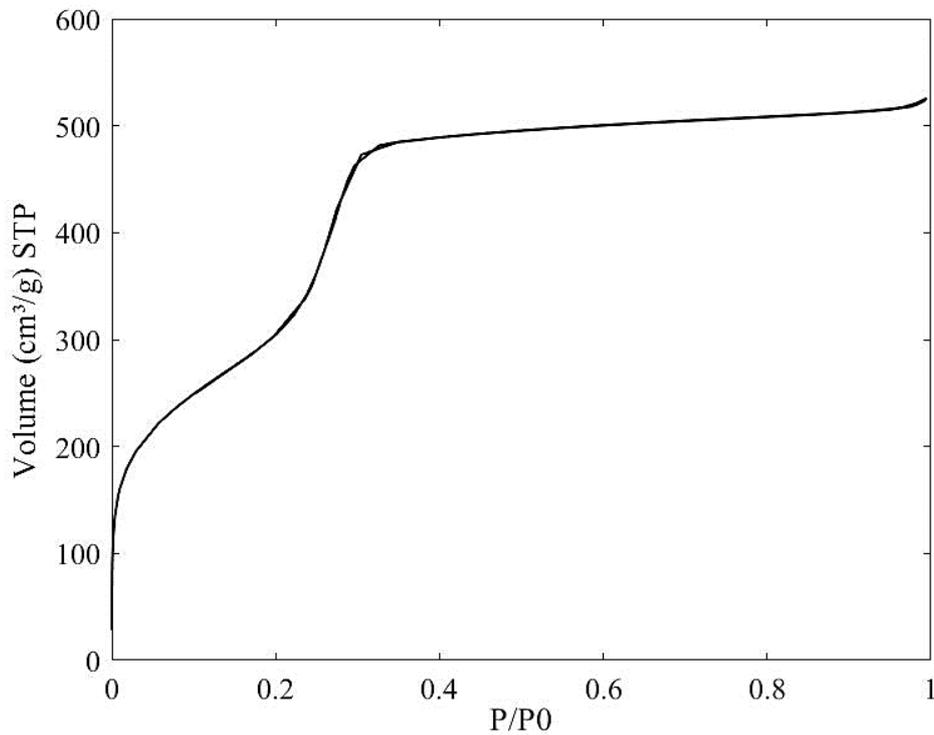


Figura 6.4: Isotherme di adsorbimento e desorbimento delle PSSM.

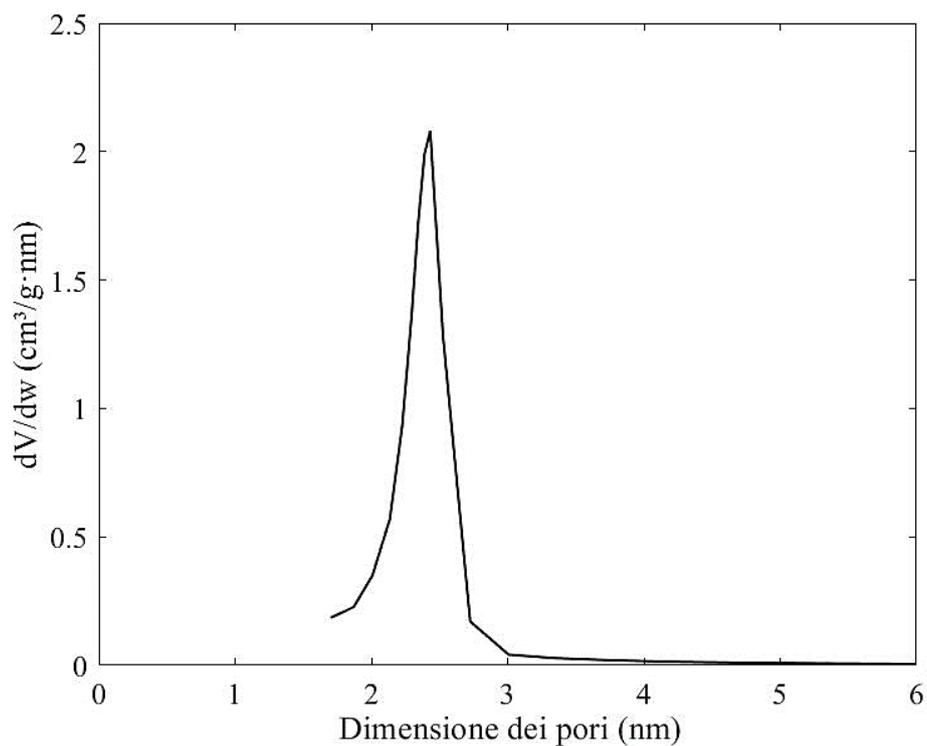


Figura 6.5: Distribuzione della dimensione dei pori delle PSSM ottenuta con il modello BJH applicato al ramo di desorbimento.

La dimensione dei pori insieme all'area superficiale specifica e al volume poroso sono riportati in Tabella 6.1.

Tabella 6.1: Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto.

Campione	Area superficiale specifica (m ² /g)	Volume poroso (cm ³ /g)	Diametro medio dei pori (nm)
PSSM	1142	0,8	2,4

➤ Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

In Figura 6.6 è riportato lo spettro FT-IR delle PSSM nell'intervallo $4000-1300\text{ cm}^{-1}$. Si osserva un picco a 3740 cm^{-1} dovuto alla vibrazione dei silanoli isolati presenti sulla superficie delle particelle di silice. Inoltre, è presente una banda larga intorno a 3500 cm^{-1} che corrisponde allo stretching dei silanoli interagenti per legame a idrogeno [105]. Infine, sono presenti delle bande a circa 2000 cm^{-1} , 1870 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} corrispondenti alle armoniche dei modi di reticolo dovuti ai tetraedri SiO_4 presenti nella struttura della silice.

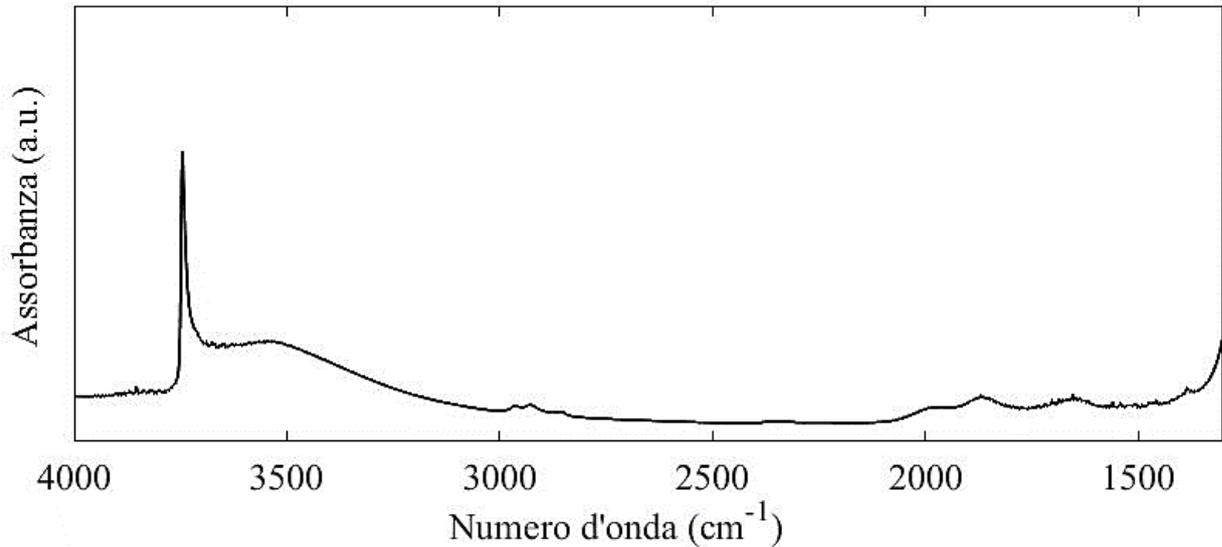


Figura 6.6: Spettro FT-IR delle PSSM.

6.2 Caratterizzazione delle MSM

➤ Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)

Le immagini FESEM delle MSM sono mostrate In Figura 6.7, dove è possibile osservare la loro morfologia sferica.

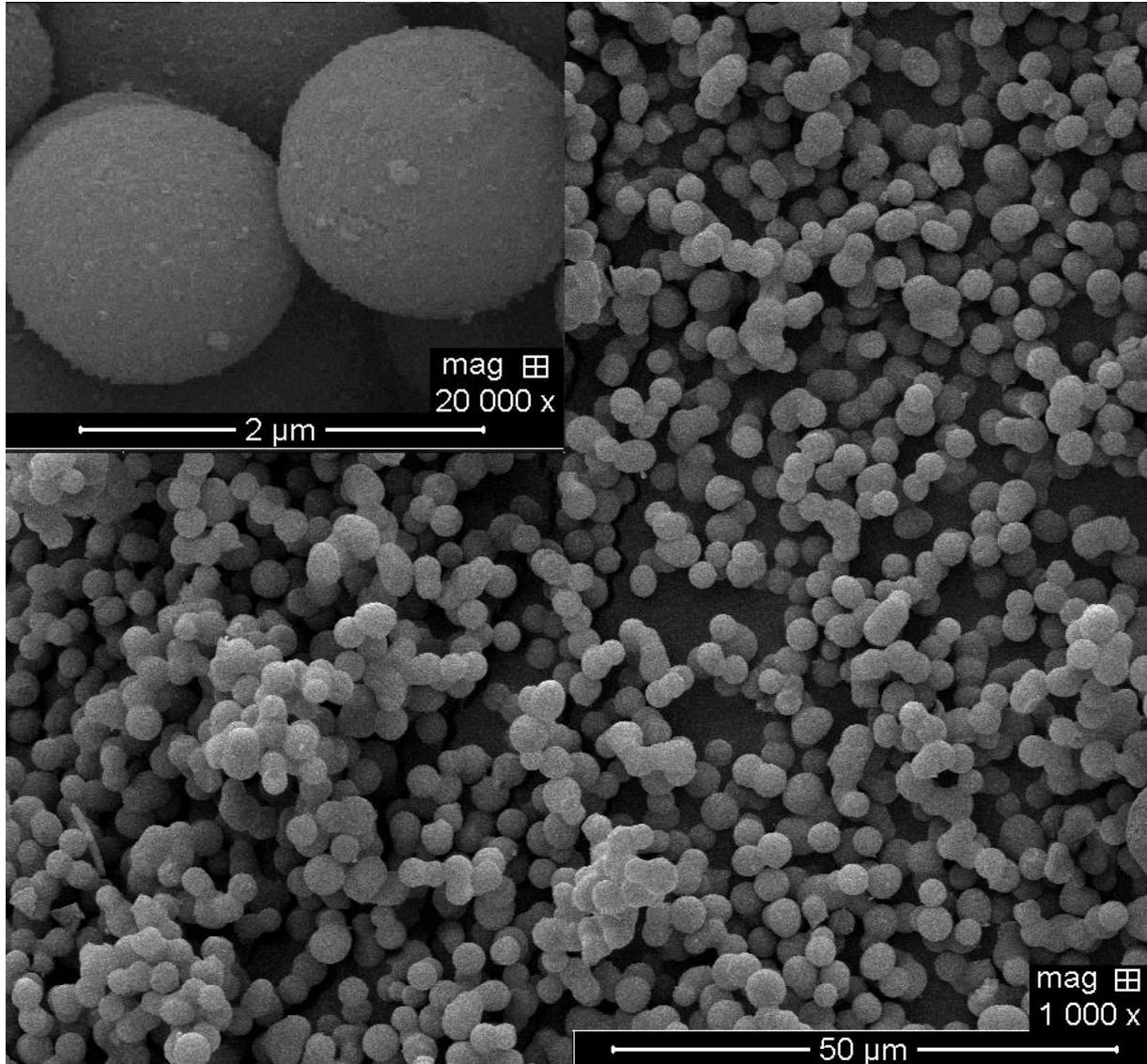


Figura 6.7: Immagini FESEM delle MSM a diversi ingrandimenti e scale.

Dalle immagini sopra riportate si osserva che la dimensione delle particelle non è uniforme; per questo motivo si è proceduto, come per le PSSM, con il calcolo della dimensione media utilizzando il software *ImageJ* [104]. È stato misurato il diametro di 78 particelle da diverse immagini e si è ottenuto un diametro medio di 3 μm. In Figura 6.8 è riportata la distribuzione della dimensione delle particelle; queste presentano un diametro minimo di circa 2 μm e un diametro massimo di circa 5 μm. A differenza delle PSSM che sono delle particelle sub-micrometriche (diametro medio di 466 nm), le MSM sono delle microsfele, in accordo con l'articolo di riferimento per la loro sintesi [94].

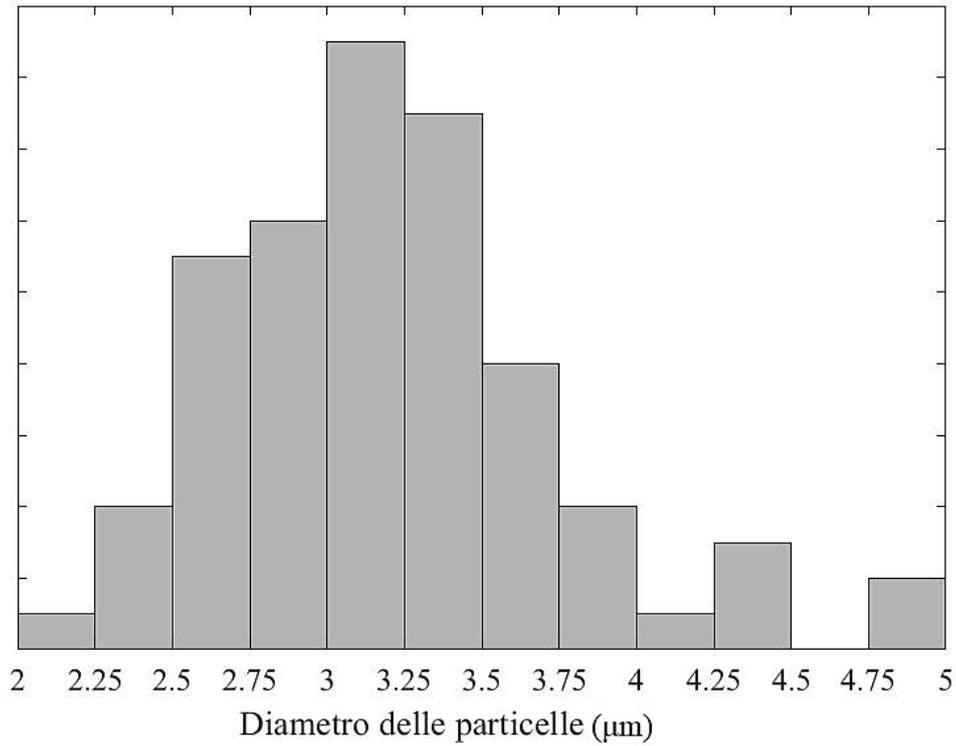


Figura 6.8: Distribuzione della dimensione delle PSSM.

➤ **Diffrazione a raggi X (XRD)**

Lo spettro XRD ad alti angoli delle MSM, riportato in Figura 6.9, non mostra i picchi caratteristici delle strutture cristalline, ciò conferma che le particelle sintetizzate sono costituite da silice amorfa. Inoltre, l'assenza di picchi indica l'assenza di impurezze, confermando che non sono presenti tracce del sale KCl, impiegato nella sintesi.

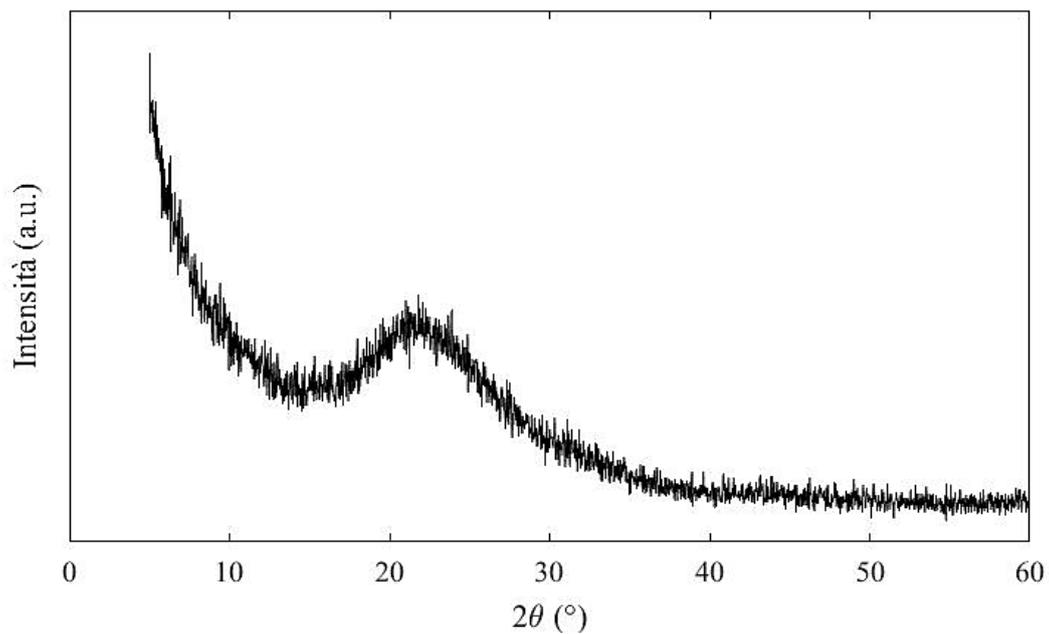


Figura 6.9: Spettro XRD ad alti angoli delle MSM.

➤ Analisi di fisisorbimento di azoto

Mediante l'analisi di fisisorbimento di azoto, condotta a 77 K, si ottiene l'isoterma delle MSM riportata in Figura 6.10. Si tratta di un'isoterma di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi. L'isoterma ottenuta presenta il ciclo di isteresi che indica la presenza di pori con diametro maggiore di 4 nm. Si tratta di un coppia di isteresi di tipo H5, caratteristico dei materiali con porosità non uniforme che presentano sia pori aperti sia pori parzialmente ostruiti [100].

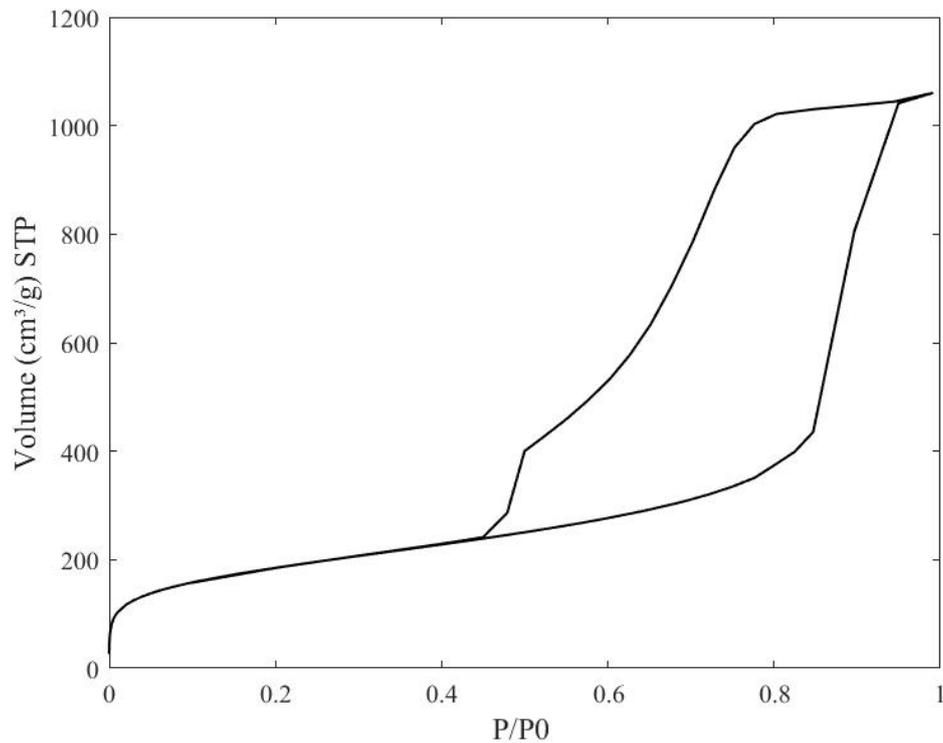


Figura 6.10: Isoterme di adsorbimento e desorbimento delle MSM.

Per la determinazione della distribuzione della dimensione dei pori, riportata in Figura 6.11, e della loro dimensione media si è utilizzato il modello DFT. Si osserva una distribuzione bimodale con un picco a 11,7 nm e uno a 14,0 nm.

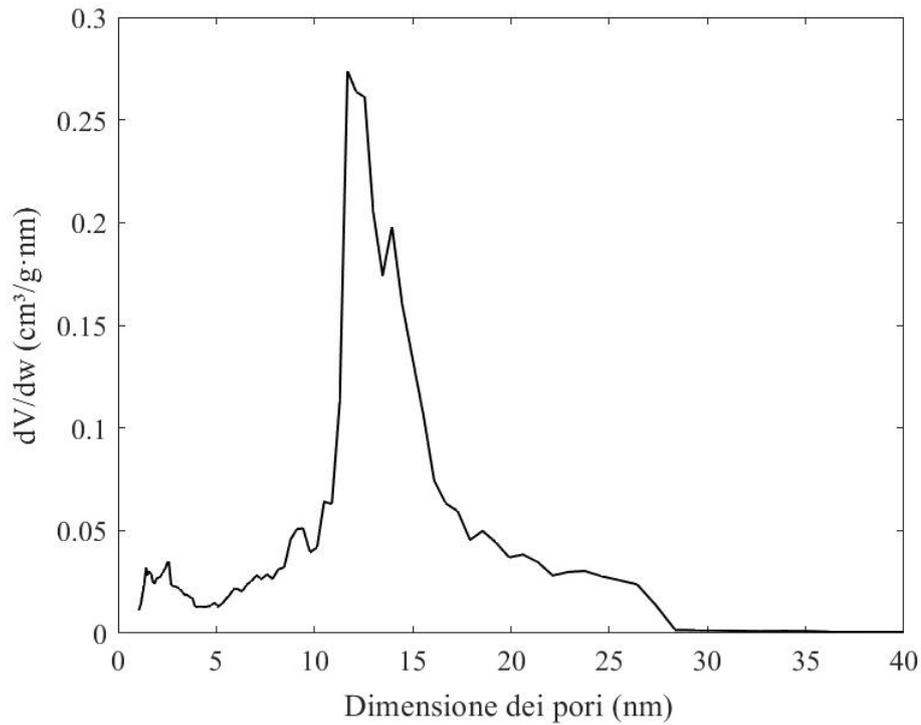


Figura 6.11: Distribuzione della dimensione dei pori ottenuta applicando il modello DFT.

La dimensione dei pori insieme all'area superficiale specifica e al volume poroso sono riportati in Tabella 6.2.

Tabella 6.2: Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto.

Campione	Area superficiale specifica (m ² /g)	Volume poroso (cm ³ /g)	Diametro medio dei pori (nm)
MSM	674	1,64	11,7

➤ Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

In Figura 6.12 è riportato lo spettro FT-IR delle MSM che risulta molto simile a quello ottenuto per le PSSM. Si osserva il picco a 3745 cm^{-1} attribuibile alla vibrazione dei silanoli isolati presenti sulla superficie della silice e la banda larga intorno ai 3500 cm^{-1} corrispondente alla vibrazione di stretching dei silanoli interagenti [105]. Infine, sotto 2100 cm^{-1} sono presenti le tre bande corrispondenti alle armoniche dei modi di reticolo dovuti ai tetraedri SiO_4 .

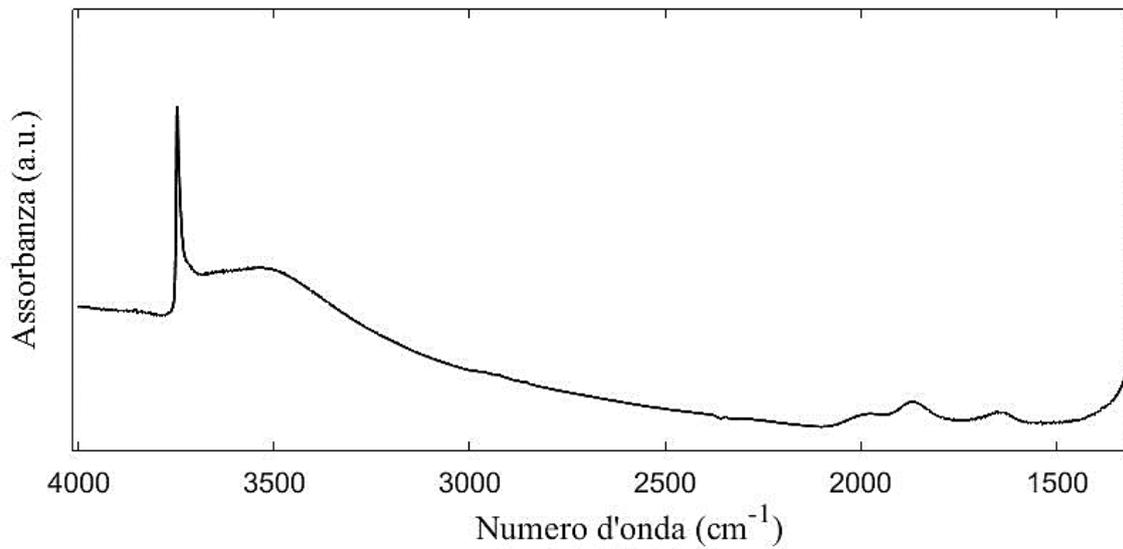


Figura 6.12: Spettro FT-IR delle MSM.

7. Caratterizzazione delle silici contenenti arginina

Le stesse tecniche impiegate per la caratterizzazione delle particelle di silice mesoporosa sono state utilizzate anche per la caratterizzazione delle stesse contenenti arginina al 9% in massa. Nella prima parte del capitolo vengono presentati i risultati ottenuti per le PSSM impregnate con arginina e successivamente quelli ottenuti per le MSM contenenti arginina.

7.1 Caratterizzazione delle PSSM impregnate con arginina (Arg@PSSM)

➤ Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)

In Figura 7.1 sono mostrate le immagini FESEM delle PSSM prima e dopo l'impregnazione a diversi pH con arginina. Dopo l'impregnazione l'aspetto delle particelle non è variato, queste, infatti, presentano ancora una morfologia sferica. Tuttavia, nelle Arg_11@PSSM (Figura 7.1 (C)) si osserva una rugosità superficiale, imputabile alla degradazione del carrier, come osservato nella tesi di laurea di Sonia Martinez ("Particelle sferiche di silice mesoporosa come carrier di arginina", 2020) e come verrà discusso in seguito. Le Arg_5@PSSM (Figura 7.1 (B)) presentano una superficie liscia, analoga alle PSSM tal quali.

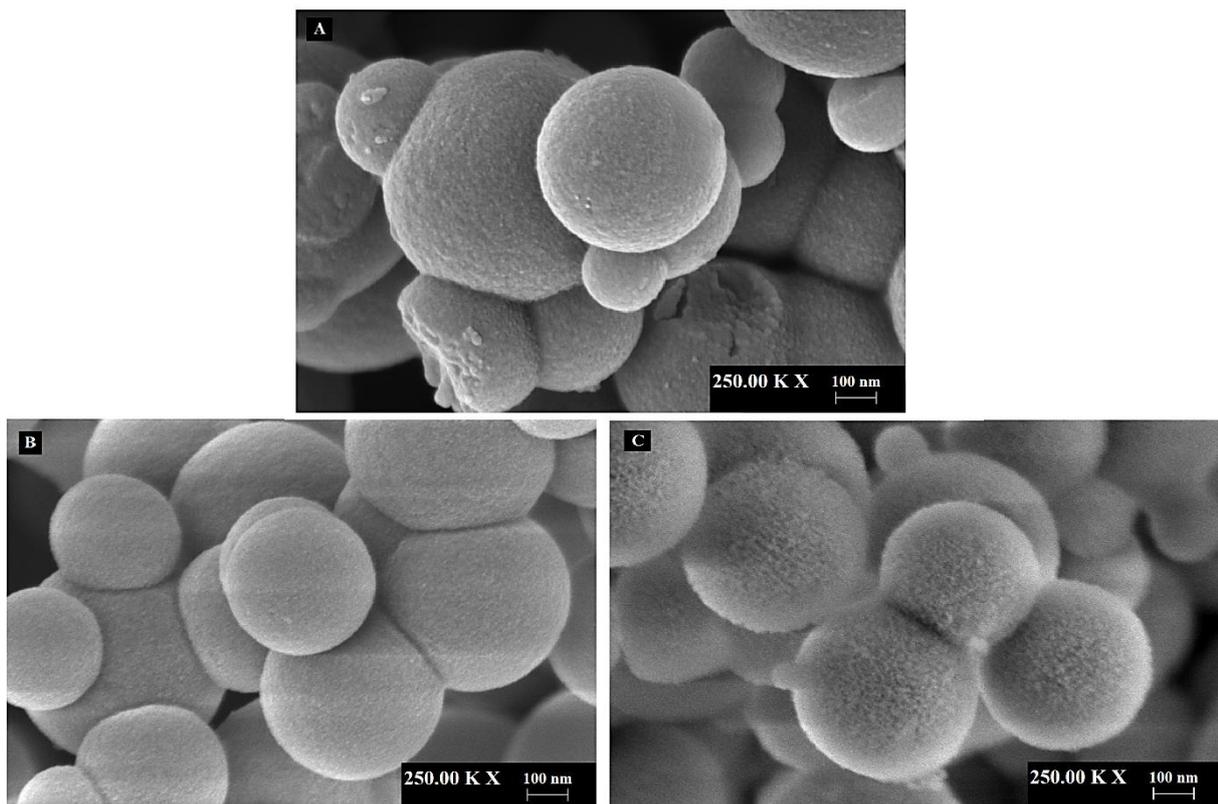


Figura 7.1: Immagini FESEM delle PSSM (A), delle Arg_5@PSSM (B) e delle Arg_11@PSSM (C).

➤ Diffrazione a raggi X (XRD)

Lo spettro di diffrazione ad alti angoli dell'arginina, riportato in Figura 7.2, è caratterizzato da una serie di picchi di diverse intensità. Questo indica che la struttura dell'arginina è cristallina.

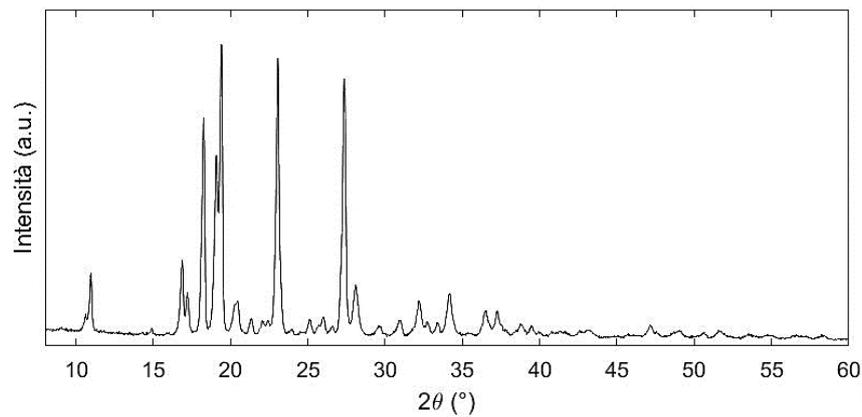


Figura 7.2: Spettri XRD ad alti angoli dell'arginina.

Nella Figura 7.3 sono riportati gli spettri XRD ad alti angoli dei campioni Arg_5@PSSM, Arg_11@PSSM e delle PSSM. Gli spettri dei due campioni impregnati a diversi pH non mostrano i picchi tipici di una struttura cristallina, indicando che l'arginina incorporata è presente in forma amorfa.

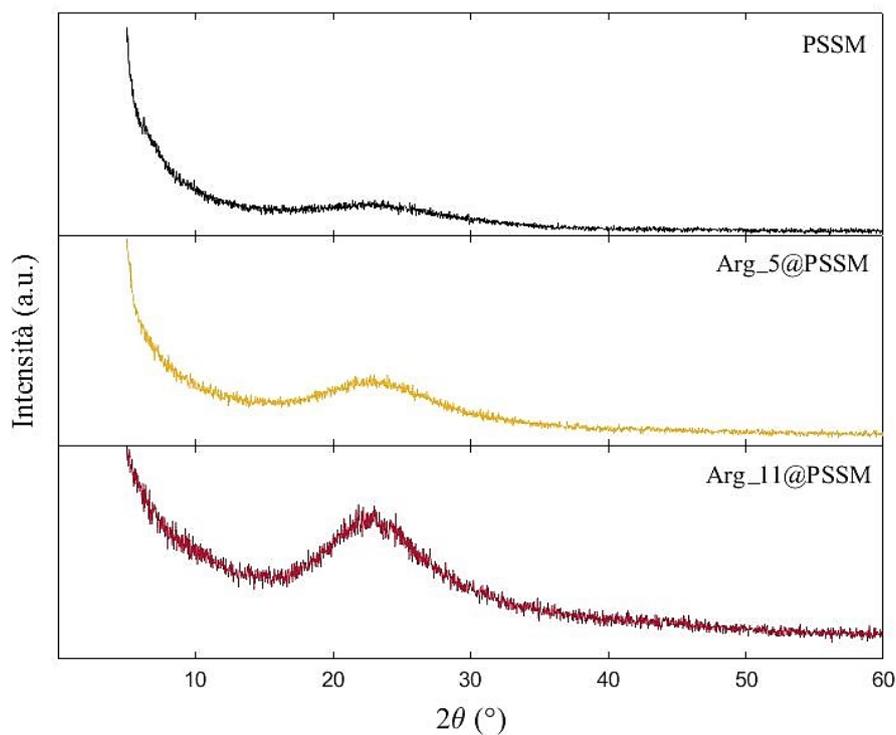


Figura 7.3: Spettri XRD ad alti angoli delle PSSM non impregnate, impregnate a pH circa 5 e impregnate a pH circa 11.

➤ Analisi di fisisorbimento di azoto

In Figura 7.4 sono mostrate le isoterme delle Arg_5@PSSM e delle Arg_11@PSSM confrontate con quella delle PSSM. Non si osservano cambiamenti significativi nell'isoterma delle Arg_5@PSSM rispetto a quella delle stesse non impregnate, dunque, si tratta sempre di un'isoterma di tipo IV priva di coppia di isteresi. Al contrario, l'isoterma delle PSSM impregnate a pH circa 11 è di tipo IV, ma presenta un coppia di isteresi di tipo H2 (b), tipico dei materiali che presentano pori interconnessi di diversa forma e pori a collo di bottiglia [100]. Questa differenza è attribuita alla parziale degradazione della silice che si verifica in ambiente basico, che causa la dissoluzione delle pareti tra pori adiacenti e la conseguente formazione di specie solubili che riprecipitano causando l'occlusione di alcuni pori [106].

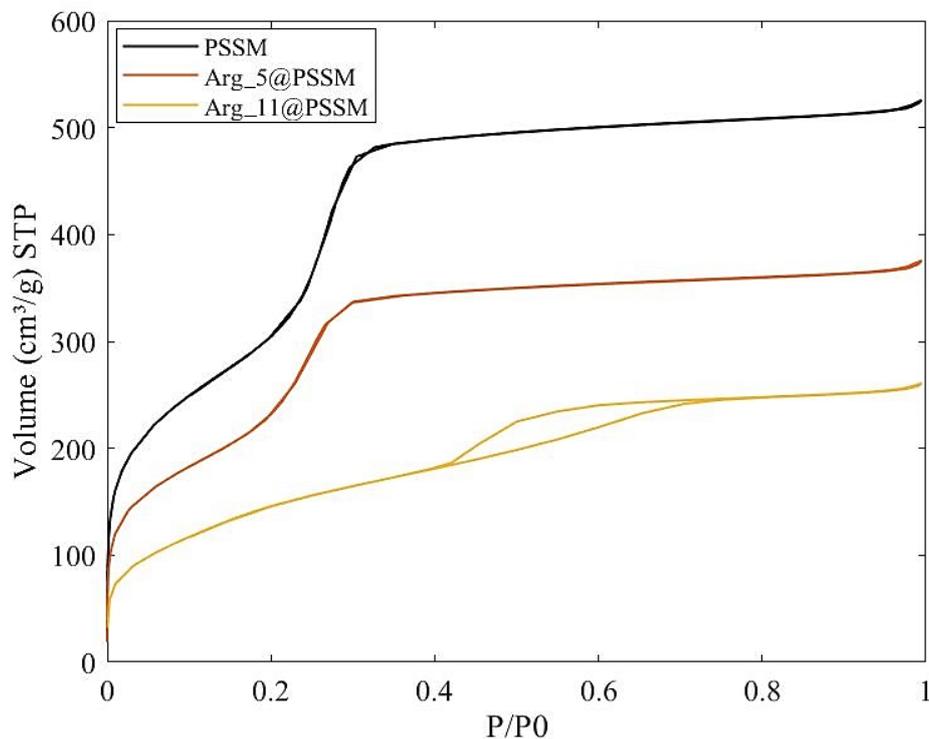


Figura 7.4: Isotherme di adsorbimento e desorbimento delle PSSM, delle Arg_5@PSSM e delle Arg_11@PSSM.

In Figura 7.5 sono riportate le distribuzioni della dimensione dei pori delle PSSM e delle stesse impregnate ottenute con il metodo BJH. Dalla distribuzione dei pori si nota la comparsa di una nuova famiglia di pori di dimensioni pari a 3,6 nm e la drastica diminuzione del volume dei pori di 2,4 nm. Questo cambiamento è attribuibile alla degradazione delle pareti tra mesopori adiacenti [106], con formazione di pori più grandi, e all'occlusione dei pori più piccoli.

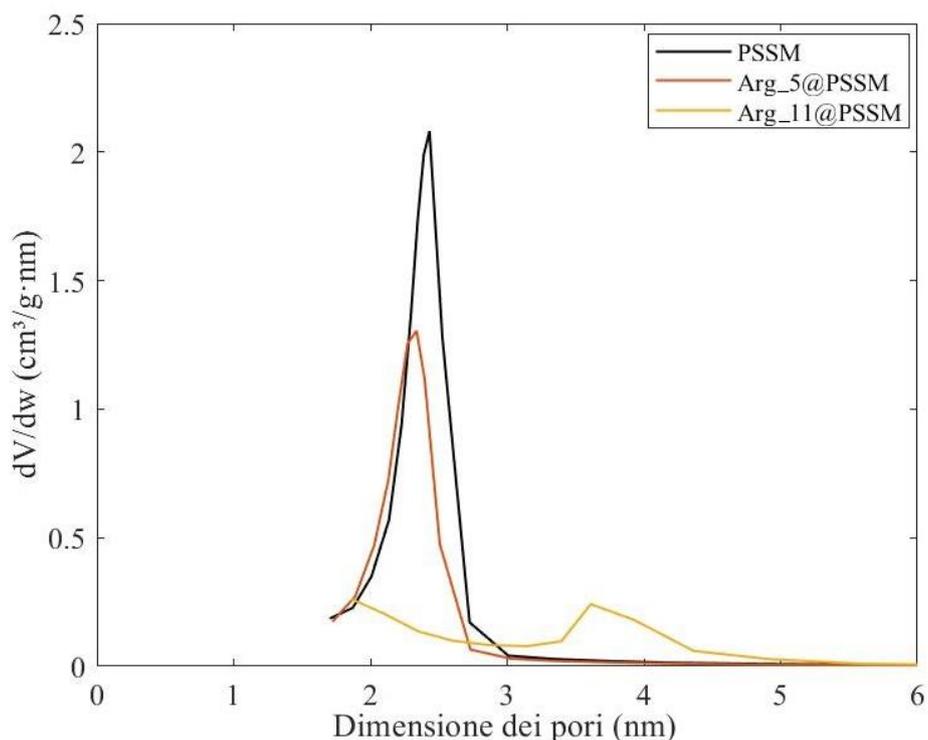


Figura 7.5: Distribuzioni della dimensione dei pori delle PSSM, delle Arg_5@PSSM e delle Arg_11@PSSM ottenute con il modello BJH applicato al ramo di desorbimento.

Nella Tabella 7.1 sono riportati i dati relativi alla dimensione dei pori, all'area superficiale e al volume poroso dei vari campioni. Confrontando i valori ottenuti per i due campioni di silice impregnati con quelli delle PSSM, si osserva una diminuzione dell'area superficiale specifica e del volume poroso anche nel caso delle Arg_5@PSSM, che conferma la deposizione del principio attivo nel carrier. La diminuzione della dimensione dei pori per le Arg_5@PSSM è di circa 1 Å. Questo basso valore sembra incompatibile con una riduzione della dimensione dei pori dovuta alla presenza dell'arginina all'interno dei pori stessi. Questo sembra suggerire che le molecole di arginina siano collocate all'imbocco dei canali e sulla superficie esterna delle particelle.

Tabella 7.1: Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto.

Campione	Area superficiale specifica (m ² /g)	Volume poroso (cm ³ /g)	Diametro medio dei pori (nm)
PSSM	1142	0,8	2,4
Arg_5@PSSM	895	0,56	2,3
Arg_11@PSSM	558	0,39	3,6

Dunque, dalle immagini FESEM e dall'analisi di fisisorbimento di azoto, è chiaro che l'impregnazione a pH basico causa la degradazione del supporto. In particolare, si verifica la dissoluzione della silice e la conseguente formazione di specie solubili in acqua che precipitano

nei pori durante l'evaporazione dell'acqua; ciò causa l'occlusione totale di alcuni pori e parziale di altri, infatti, nella distribuzione della dimensione dei pori delle Arg_11@PSSM (Figura 7.5), si osserva anche la presenza di una popolazione di pori a 2 nm. A questo fenomeno è imputato il fatto che le Arg_11@PSSM sono caratterizzate da un'area superficiale specifica e da un volume poroso più bassi [106], [107].

➤ Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

Confrontando lo spettro FT-IR delle PSSM con gli spettri delle stesse impregnate, mostrati in Figura 7.6, è possibile valutare la presenza di arginina nei due campioni. Gli spettri delle Arg_5@PSSM e delle Arg_11@PSSM mostrano nuove bande rispetto allo spettro delle PSSM che confermano la presenza di arginina nei due campioni.

Negli spettri dei due campioni impregnati il picco a 3740 cm^{-1} , corrispondente ai silanoli isolati, risulta meno intenso rispetto a quello presente nello spettro delle PSSM; ciò indica l'interazione tra l'arginina e i silanoli, presenti sulla superficie delle particelle, mediante legami idrogeno. Nei due spettri si osserva un'ampia banda intorno a 3300 cm^{-1} imputabile ai legami a idrogeno tra silanoli e arginina e/o molecole d'acqua all'interfaccia arginina-silice. Inoltre, sono presenti una banda intensa a 1670 cm^{-1} e una a 1630 cm^{-1} corrispondenti allo stretching asimmetrico e simmetrico del gruppo guanidinico [108], [109].

Nello spettro delle Arg_11@PSSM è presente una banda a 1560 cm^{-1} dovuta allo stretching dello ione carbossilato (COO^-), assente nelle Arg_5@PSSM poiché l'arginina presenta un diverso stato di ionizzazione dovuto al differente pH di impregnazione [110], [108].

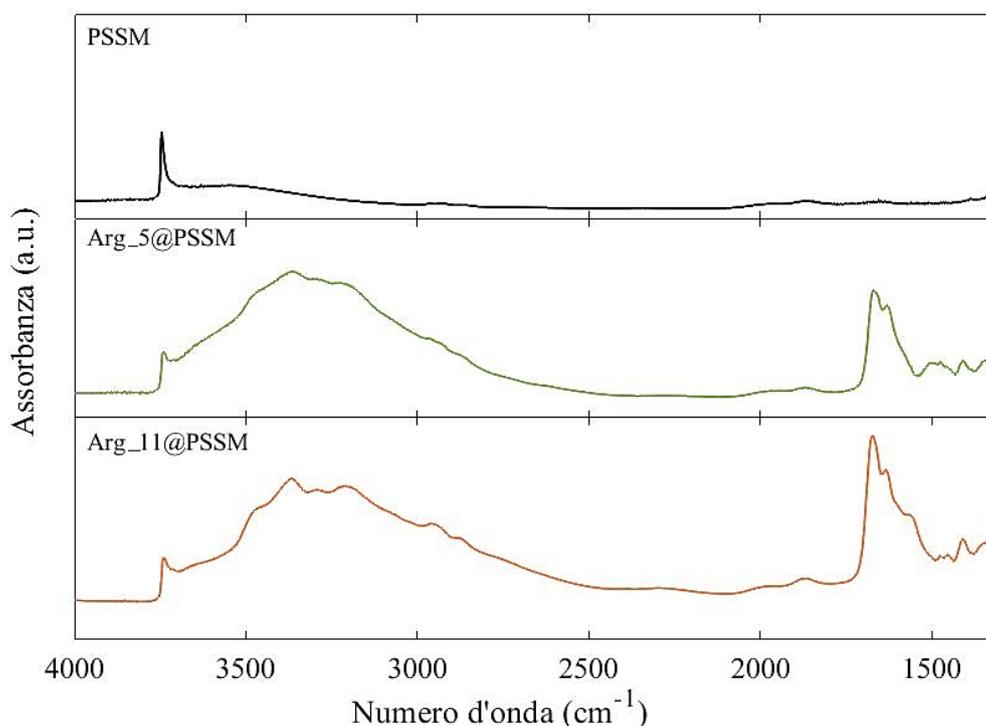


Figura 7.6: Spettri FT-IR delle PSSM non impregnate, impregnate a pH circa 5 e impregnate a pH circa 11.

7.2 Caratterizzazione delle MSM impregnate con arginina (*Arg@MSM*)

➤ Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)

In Figura 7.7 sono riportate le immagini FESEM delle MSM prima e dopo l'incorporazione di arginina. Dopo l'impregnazione, non si notano variazioni nell'aspetto delle particelle le quali mostrano ancora una morfologia sferica. Non si osservano particolari variazioni nella superficie delle particelle né in quelle impregnate a pH acido né in quelle impregnate a pH basico.

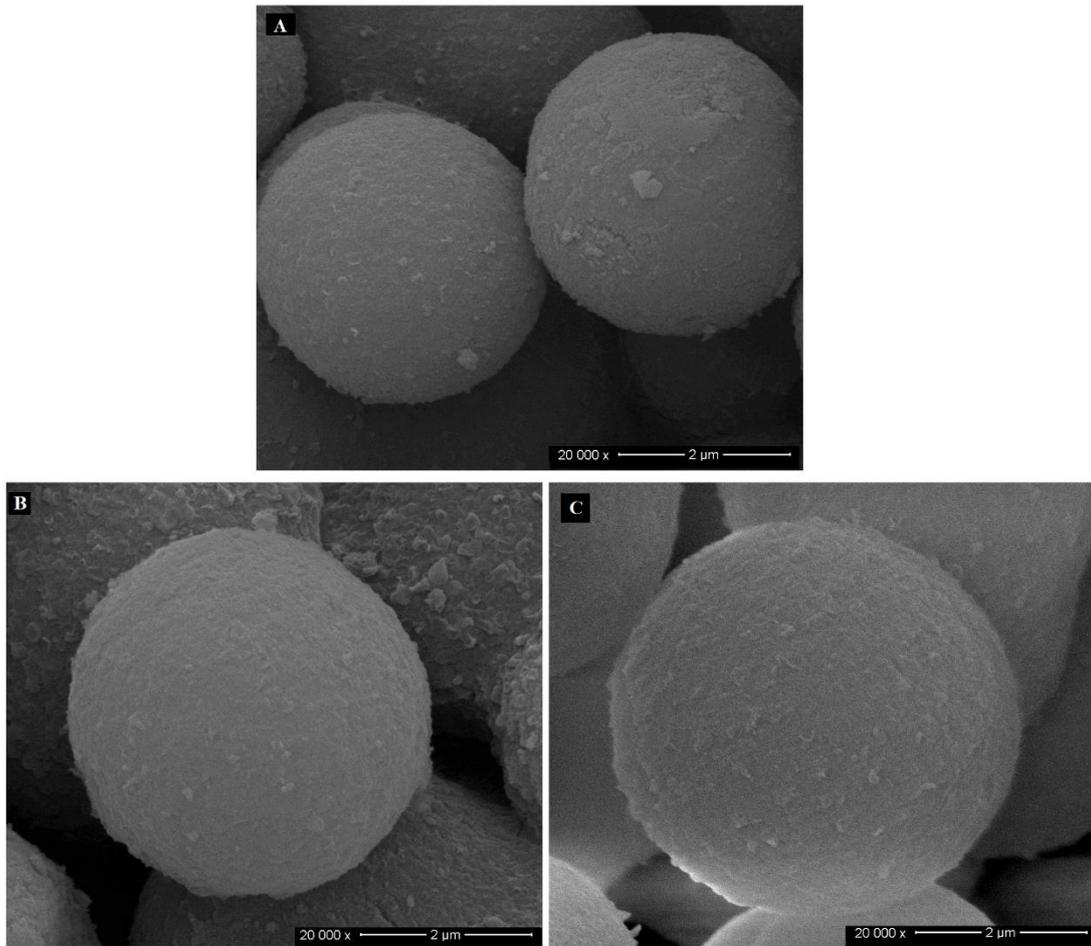


Figura 7.7: Immagini FESEM delle MSM (A), delle *Arg_5@MSM* (B) e delle *Arg_11@MSM* (C).

➤ Analisi Termogravimetrica (TGA)

I due campioni di silice sintetizzati sono stati impregnati nelle stesse condizioni con una quantità di arginina corrispondente al 9% in massa del materiale finale. A titolo di esempio, le curve termogravimetriche delle MSM e delle stesse impregnate a diversi pH sono mostrate in Figura 7.8.

Si osserva una diminuzione della massa tra 30 e 100 °C in tutte e tre le curve dovuta all'evaporazione dell'acqua fisisorbita sulla superficie dei materiali.

Tra 200 e 800°C si verifica una perdita di massa di 0,73 mg per le Arg_5@MSM e di 0,52 mg per le Arg_11@MSM dovuta alla degradazione dell'arginina e alla perdita dei silanoli superficiali. Considerando il peso iniziale dei due campioni, 5,8 mg di Arg_5@MSM e 4,6 mg di Arg_11@MSM, si registra una perdita percentuale di massa di circa 13% e 12%, rispettivamente. Nel suddetto intervallo di temperatura, la curva delle MSM mostra una perdita di massa di circa 0,17 mg dovuta alla perdita dei silanoli presenti sulla superficie delle particelle di silice. Considerando il peso iniziale del campione di 4,2 mg la perdita dei silanoli superficiali ammonta a circa 4%.

Sottraendo il 4% alla perdita di massa delle MSM impregnate si rimuove il contributo relativo ai silanoli e, dunque, si ottiene una diminuzione di circa il 9% della massa delle Arg_5@MSM e di circa l'8% della massa delle Arg_11@MSM. Quest'ultimi valori, che corrispondono alla quantità di arginina presente nei due campioni di MSM impregnati, sono in accordo con il contenuto atteso di arginina.

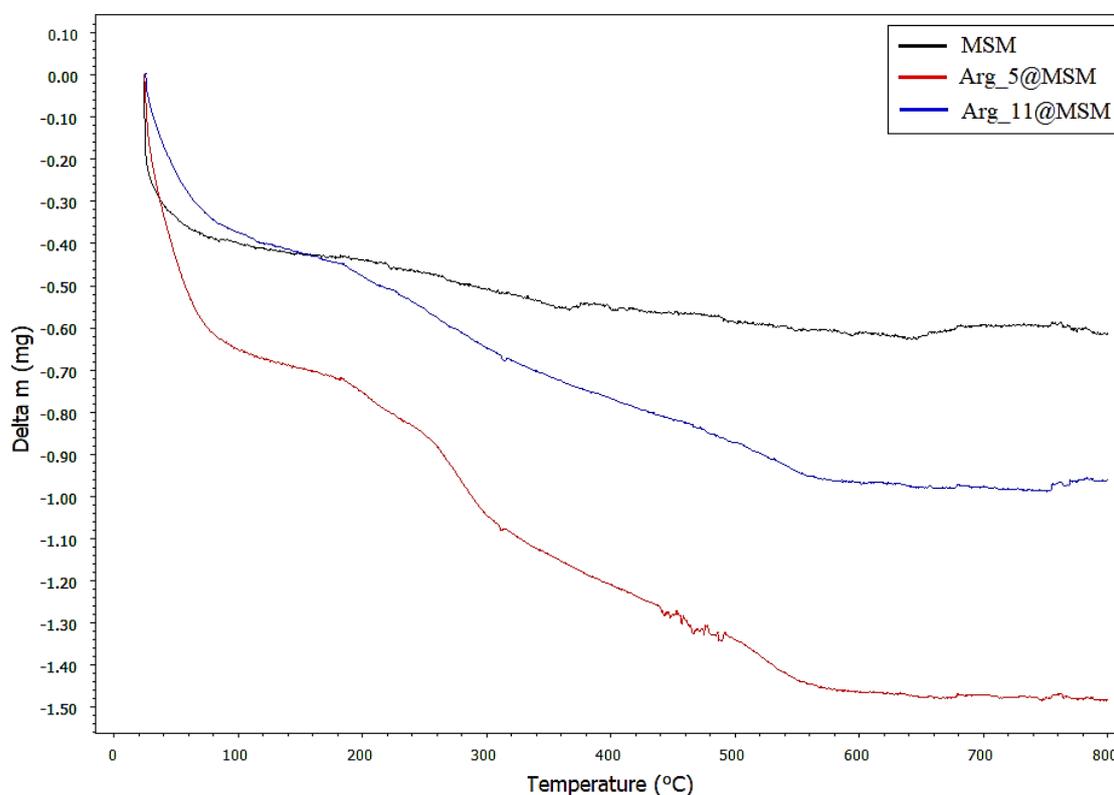


Figura 7.8: Curve termogravimetriche delle MSM, delle Arg_5@MSM e delle Arg_11@MSM.

➤ Diffrazione a raggi X (XRD)

Gli spettri XRD ad alti angoli dei campioni Arg_5@MSM e Arg_11@MSM non presentano nuovi picchi e sono simili a quello delle particelle di silice non impregnate, come è possibile vedere in Figura 7.9. Ciò indica che l'arginina è presente in forma amorfa nei due campioni impregnati a pH diverso.

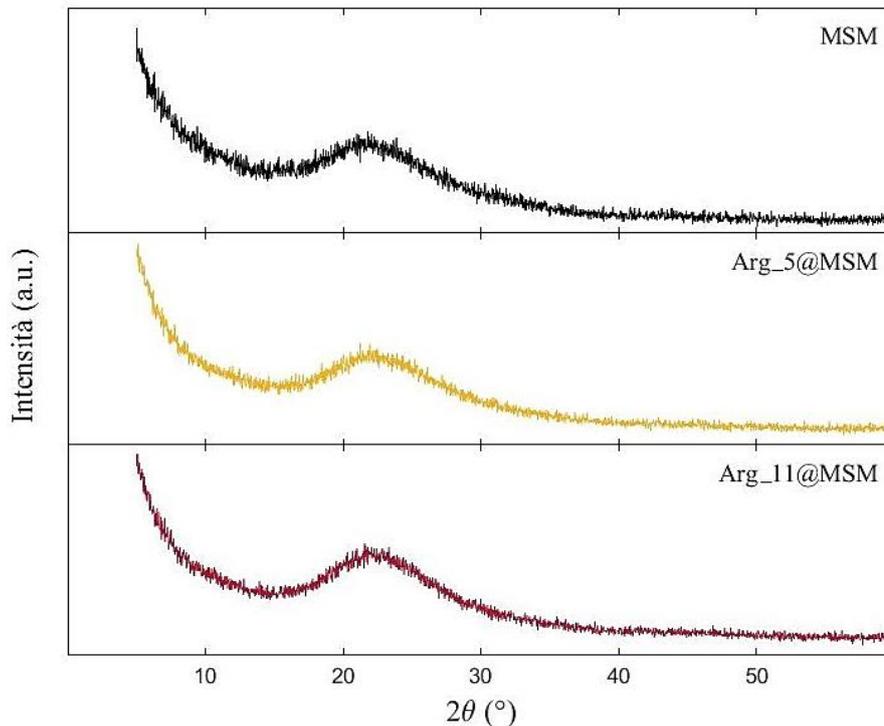


Figura 7.9: Spettri XRD ad alti angoli delle MSM non impregnate, impregnate a pH circa 5 e impregnate a pH circa 11.

➤ Analisi di fisisorbimento di azoto

In Figura 7.10 sono mostrate le isoterme delle MSM prima e dopo le impregnazioni. Le isoterme dei campioni impregnati sono molto simili a quella delle MSM e, dunque, di tipo IV con coppia di isteresi di tipo H5.

In Figura 7.11 sono riportate le distribuzioni della dimensione dei pori delle MSM e delle stesse impregnate ottenute con il modello DFT. Non si osservano differenze significative tra le distribuzioni dei tre campioni.

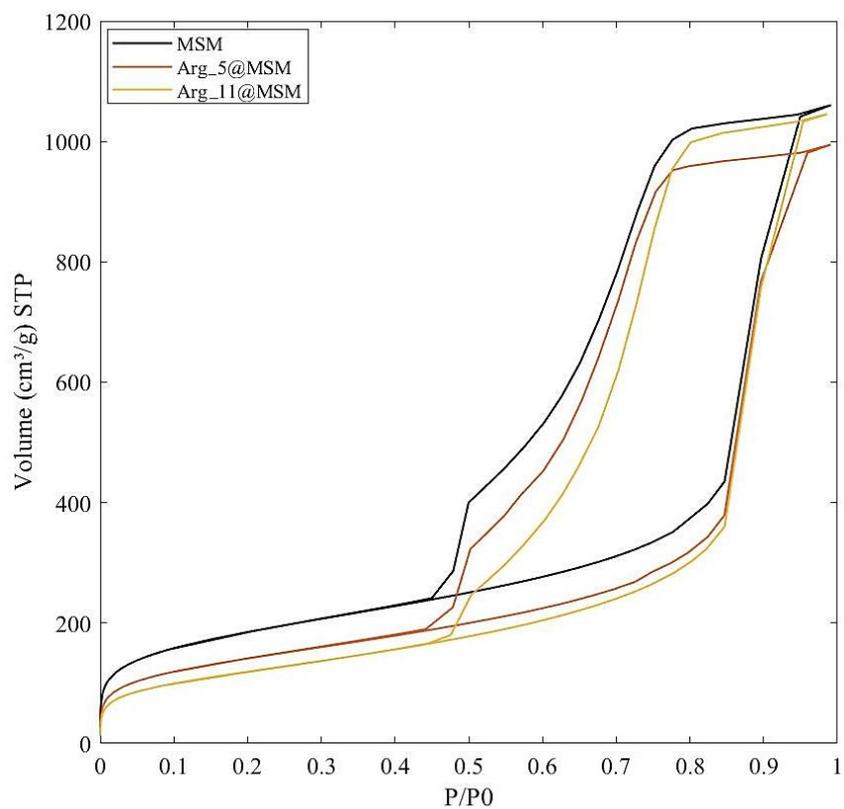


Figura 7.10: Isotherme di adsorbimento e desorbimento delle MSM, delle Arg_5@MSM e delle Arg_11@MSM.

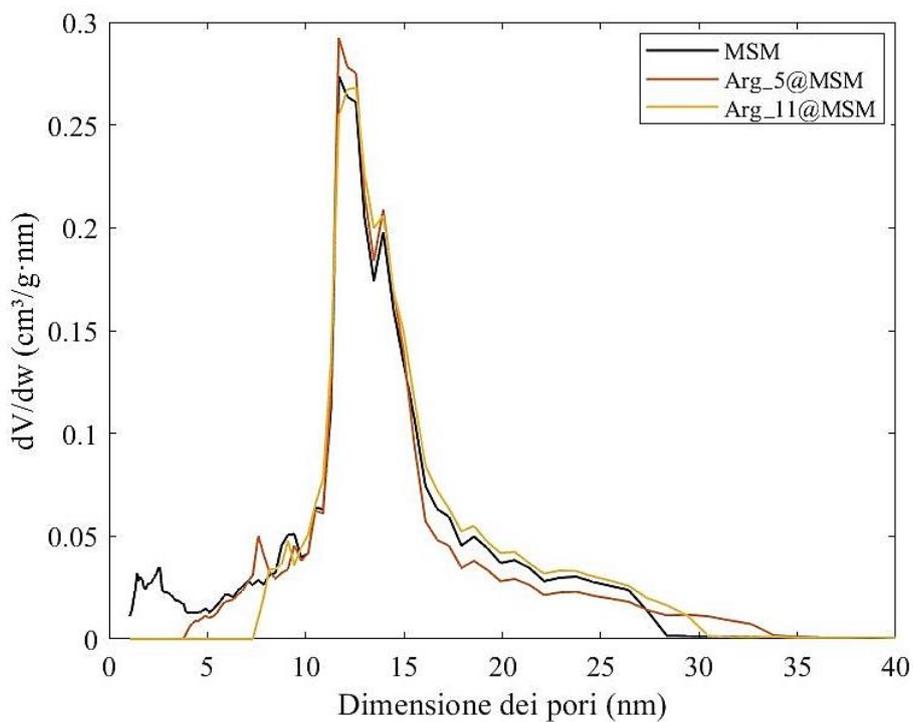


Figura 7.11: Distribuzioni della dimensione dei pori delle MSM, delle Arg_5@MSM e delle Arg_11@MSM ottenute con il modello DFT applicato al ramo di adsorbimento.

Nella Tabella 7.2 sono riportati i dati relativi alla dimensione dei pori, all'area superficiale e al volume poroso dei vari campioni. Rispetto alle MSM non impregnate, nelle Arg_5@PSSM si osserva una diminuzione dell'area superficiale e del volume poroso che conferma la deposizione dell'arginina all'interno del supporto; invece, il diametro medio dei pori, essendo molto più grande rispetto alla dimensione dell'arginina, rimane invariato. Nelle Arg_11@PSSM, rispetto alle Arg_5@PSSM, si osserva una maggiore diminuzione dell'area superficiale ma una minore diminuzione del volume poroso e, inoltre, si verifica l'aumento del diametro medio dei pori. Questi cambiamenti potrebbero essere dovuti a un fenomeno di dissoluzione parziale della silice a pH 11.

Tabella 7.2: Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto.

Campione	Area superficiale specificata (m²/g)	Volume poroso (cm³/g)	Diametro medio dei pori (nm)
MSM	674	1,64	11,7
Arg_5@MSM	515	1,54	11,7
Arg_11@MSM	433	1,62	12,6

Per confermare la possibile degradazione delle MSM in ambiente basico, si è proceduto con un trattamento delle stesse con idrossido di ammonio. In particolare, 100 mg di MSM sono stati impregnati con 1 ml di una soluzione di idrossido di ammonio. Successivamente, il campione (NH₄OH@MSM) è stato essiccato ed è stata effettuata l'analisi di fisisorbimento di azoto.

In Figura 7.12 sono riportate le distribuzioni della dimensione dei pori delle MSM e delle Arg_11@MSM e delle NH₄OH@MSM. La distribuzione delle NH₄OH@MSM risulta molto simile a quella delle Arg_11@MSM.

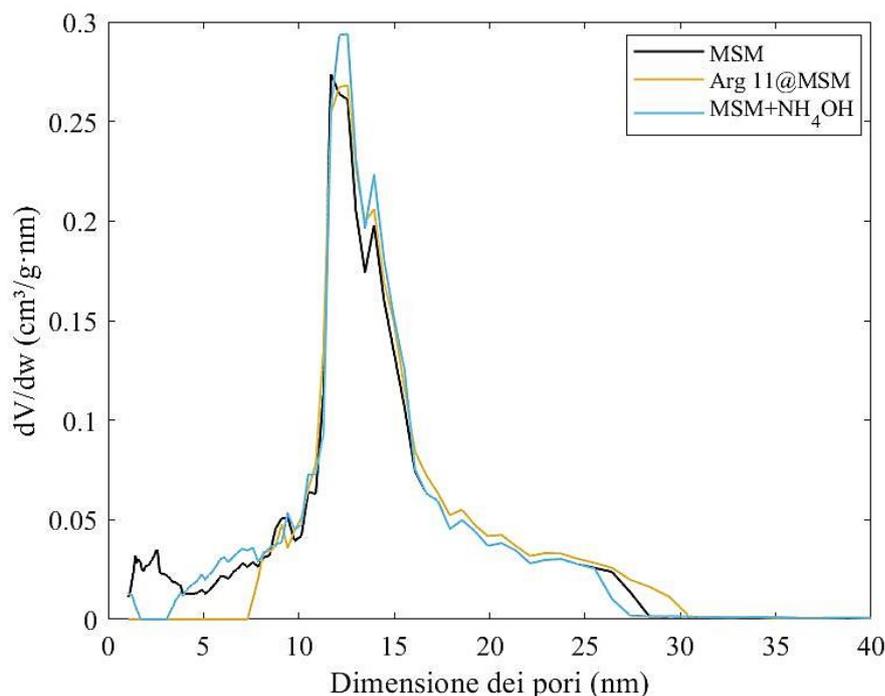


Figura 7.12: Distribuzioni della dimensione dei pori delle MSM, delle Arg_11@MSM e delle NH₄OH@MSM ottenute con il modello DFT applicato al ramo di adsorbimento.

Nella Tabella 7.3 sono riportati i dati relativi alla dimensione dei pori, all'area superficiale e al volume poroso delle NH₄OH@MSM, insieme ai dati relativi alle MSM e alle Arg_11@MSM. I dati presenti in tabella confermano la presenza di una minima degradazione. Si osserva, infatti, un aumento della dimensione dei pori nelle particelle trattate con soluzione di idrossido di ammonio rispetto alle MSM tal quali. Quest'ultime presentano un diametro medio dei pori di 11,7 nm, invece le NH₄OH@MSM di 12,6 nm, questo valore coincide proprio con il diametro medio dei pori delle Arg_11@MSM.

Inoltre, un'altra prova della possibile degradazione in ambiente basico è la diminuzione dell'area superficiale e l'aumento del volume poroso nelle NH₄OH@MSM rispetto alla silice tal quale.

Tabella 7.3: Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto.

Campione	Area superficiale specifica (m ² /g)	Volume poroso (cm ³ /g)	Diametro medio dei pori (nm)
MSM	674	1,64	11,7
Arg_11@MSM	433	1,62	12,6
NH ₄ OH@MSM	599	1,68	12,6

Per le MSM, a differenza delle PSSM, dalle immagini FESEM non si è notata la degradazione del supporto in ambiente basico. Tuttavia, dal trattamento delle MSM con idrossido di ammonio e dalla successiva analisi di fisisorbimento di azoto, è possibile concludere che anche per le MSM si verifica una minima degradazione in ambiente basico e, di conseguenza, la dissoluzione e la riprecipitazione della silice. In questo caso la degradazione

è meno evidente rispetto alle PSSM, e questo è imputabile al fatto che si tratta di una silice con pori più grandi e probabilmente pareti più spesse.

➤ Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

Confrontando gli spettri FT-IR delle Arg_5@MSM e delle Arg_11@MSM con quello delle MSM, riportati in Figura 7.12, si nota la presenza di nuove bande che confermano la presenza di arginina.

È possibile osservare le stesse bande descritte precedentemente per le PSSM impregnate con arginina. Negli spettri FT-IR delle MSM impregnate, il picco a 3744 cm^{-1} , corrispondente ai silanoli isolati, è meno intenso rispetto a quello presente nello spettro delle MSM non impregnate in seguito all'interazione tra l'arginina e i silanoli.

Nei due spettri si osserva una banda intorno a 3300 cm^{-1} dovuta ai legami a idrogeno tra silanoli e arginina e/o molecole d'acqua, una banda intensa a 1670 cm^{-1} e una a 1632 cm^{-1} dovute allo stretching del gruppo guanidinico [108], [109]. Infine, nello spettro delle Arg_11@MSM è presente una banda a 1559 cm^{-1} dovuta allo stretching dello ione carbossilato (COO^-) [110], [108], analogamente a quanto osservato per Arg_11@PSSM.

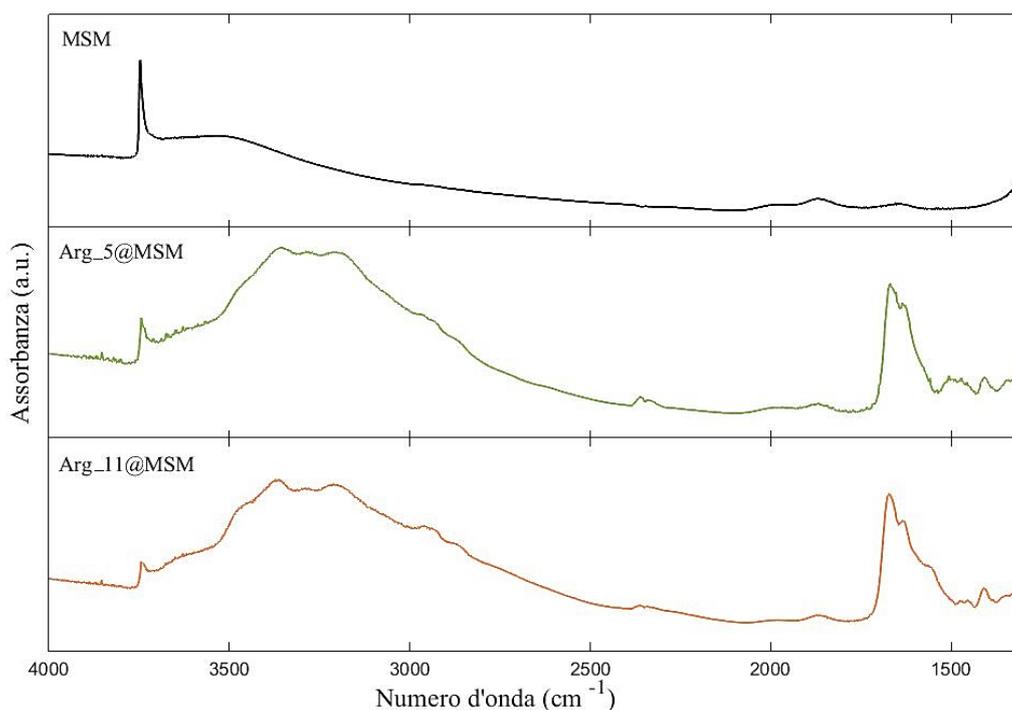


Figura 7.12: Spettri FT-IR delle MSM non impregnate, impregnate a pH circa 5 e impregnate a pH circa 11.

8. Test di rilascio di arginina

Sono stati effettuati dei test di rilascio dei due campioni di silice impregnati a diversi pH, utilizzando il metodo descritto nel paragrafo 5.5, al termine dei quali i campioni sono stati recuperati e sottoposti ad analisi FT-IR. Una volta ottenuti gli spettri, per la stima semiquantitativa della percentuale di arginina presente nei due carrier dopo un rilascio di 10 minuti e di 1 ora, è stata considerata la banda più intensa dell'arginina, presente a 1670 cm^{-1} .

In Figura 8.1 sono mostrati gli spettri delle PSSM impregnate a pH 5 e a pH 11 nell'intervallo $2100\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ prima del rilascio (tempo 0) e dopo un rilascio di 10 e 60 minuti.

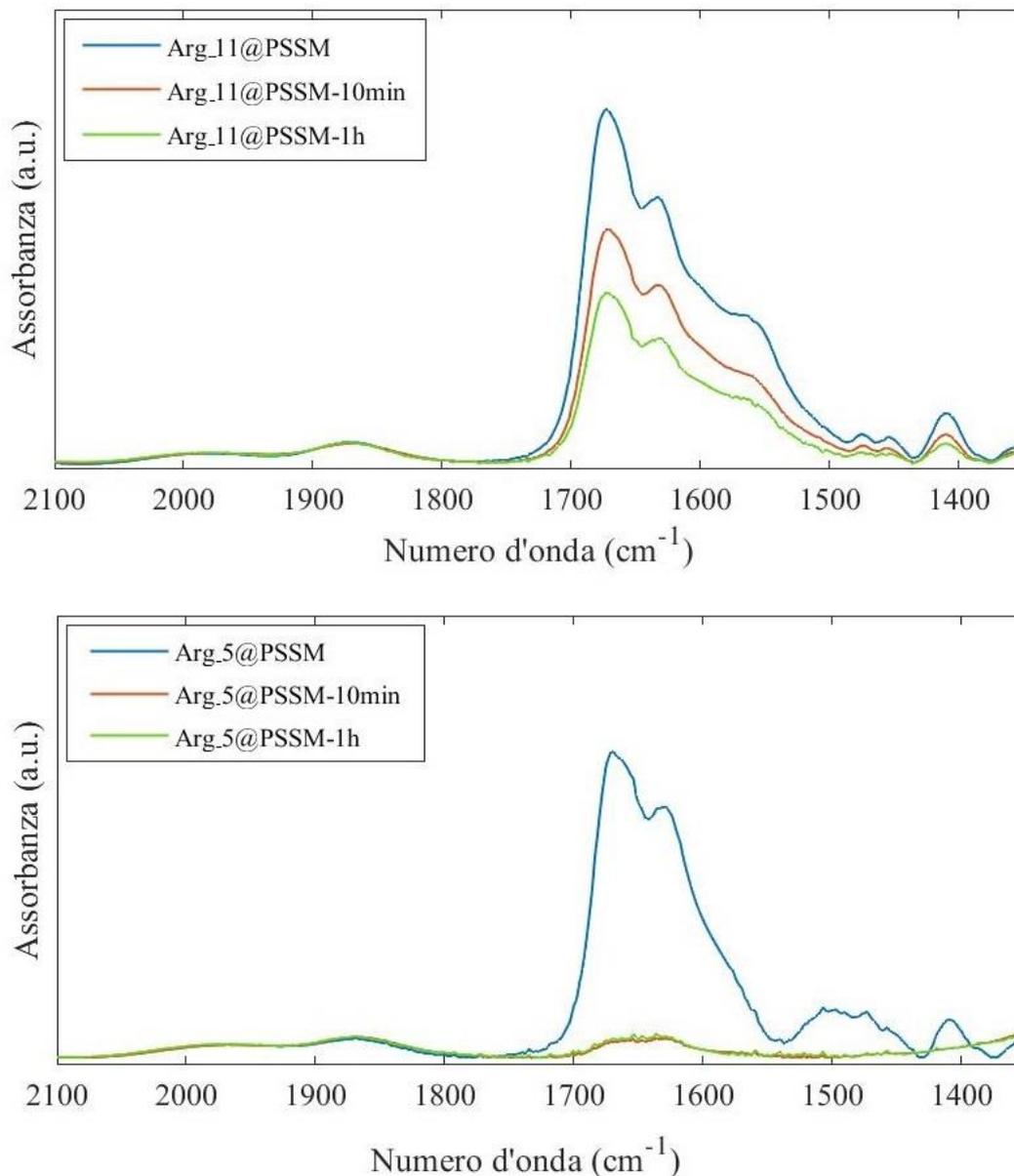


Figura 8.1: Spettri FT-IR delle PSSM impregnate a pH 11 (in alto) e a pH 5 (in basso) ai diversi tempi di rilascio.

Negli spettri delle PSSM impregnate a pH 11, dopo un rilascio di 10 e 60 minuti, si osservano i modi relativi all'arginina indicando che questa è ancora presente nei campioni. Per stimare la quantità di arginina all'interno dei campioni si è proceduto con la misura dell'altezza della banda presente a 1670 cm^{-1} prima del rilascio (tempo 0) e dopo 10 minuti e 1 ora dal rilascio. Note queste altezze e considerando che, prima del rilascio, all'interno del carrier è presente il 100% di arginina, tramite una proporzione è stata stimata la percentuale di arginina presente nel carrier ai diversi tempi di rilascio. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 8.1, dove è presente anche la quantità di arginina rilasciata, stimata calcolando il complemento a 100 della quantità di arginina presente nella silice.

Tabella 8.1: Risultati del test di rilascio delle Arg_11@PSSM.

<i>Campione</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Quantità presente nella silice (%)</i>	<i>Quantità rilasciata (%)</i>
<i>Arg_11@PSSM</i>	0	100	0
	10	66	34
	60	48	52

Diagrammando i diversi tempi di rilascio e la rispettiva quantità di arginina rilasciata riportati in Tabella 8.1 è stata ottenuta la curva di rilascio riportata in Figura 8.2.

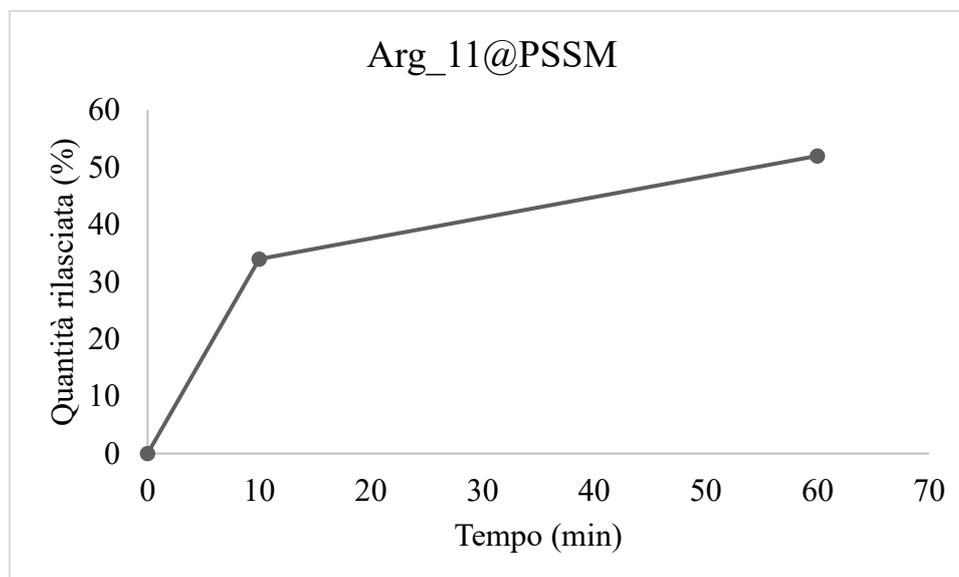


Figura 8.2: Curva di rilascio delle Arg_5@PSSM.

Invece, per le PSSM impregnate a pH 5, già dopo un rilascio di 10 minuti, non si osservano picchi relativi all'arginina. Questo indica che l'arginina viene rilasciata completamente. Infatti, come si evince dall'analisi di fisisorbimento di azoto delle Arg_5@PSSM (paragrafo 7.1), l'arginina si trova principalmente all'imbocco dei pori e, di conseguenza, l'arginina viene rilasciata subito. In Tabella 8.2 sono riportati i risultati ottenuti dal test di rilascio delle Arg_5@PSSM.

Tabella 8.2: Risultati del test di rilascio delle Arg_5@PSSM.

<i>Campione</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Quantità presente nella silice (%)</i>	<i>Quantità rilasciata (%)</i>
<i>Arg_5@PSSM</i>	0	100	0
	10	0	100
	60	0	100

Diagrammando i tempi di rilascio e la corrispondente quantità di arginina rilasciata riportati in Tabella 8.2 è stata ottenuta la curva di rilascio riportata in Figura 8.3.

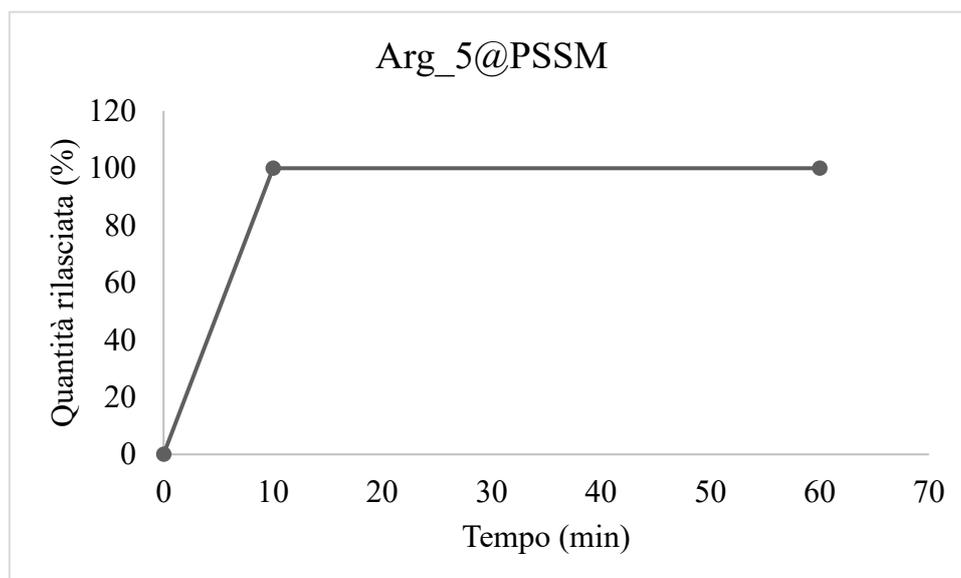


Figura 8.3: Curva di rilascio delle Arg_5@PSSM.

Per completezza, in Figura 8.4 sono riportate le zone ossidriliche (intervallo 3800-2400 cm^{-1}) degli spettri FT-IR delle PSSM impregnate, prima e dopo un'ora dal rilascio.

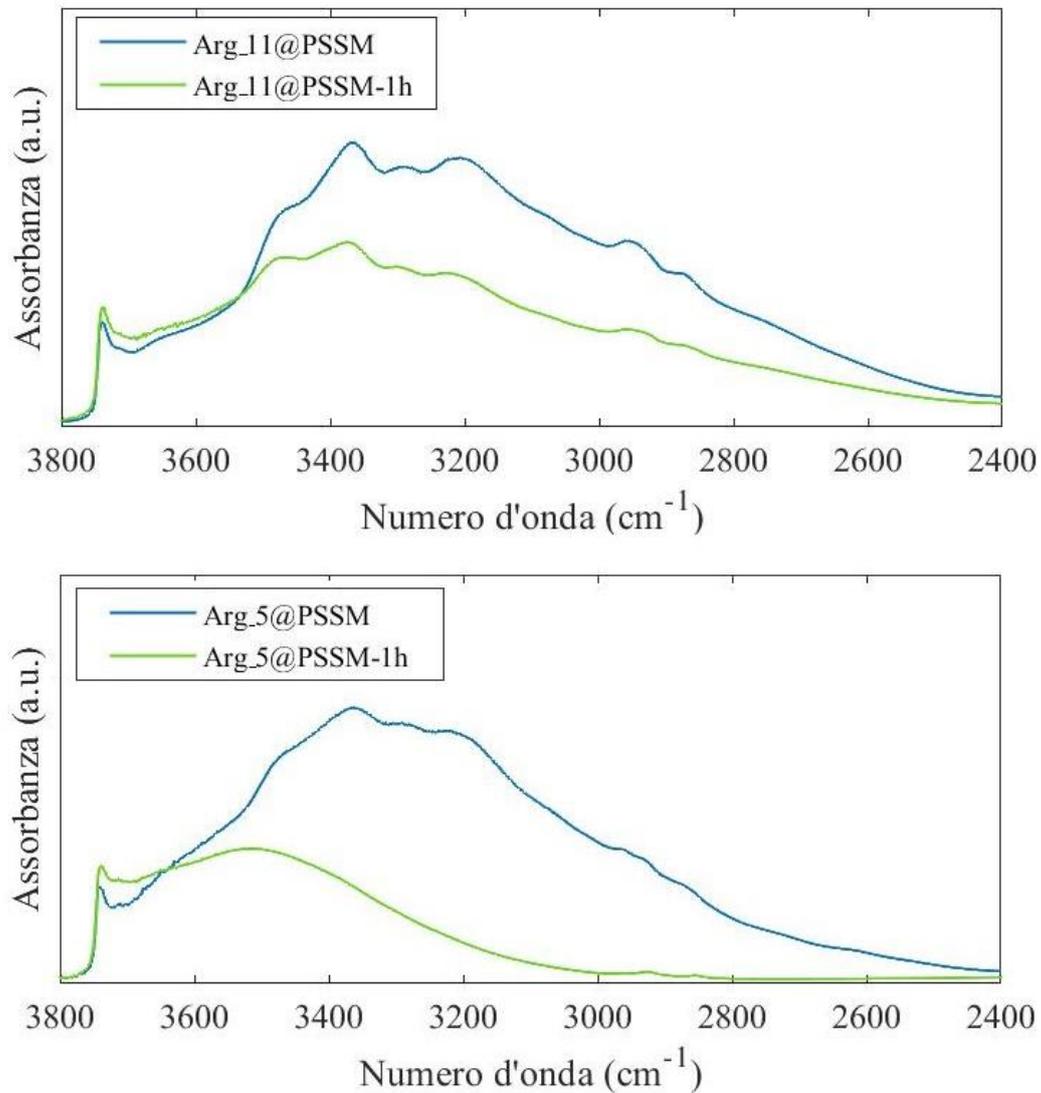


Figura 8.4: Zona ossidrilica degli spettri FT-IR delle PSSM impregnate a pH 11 (in alto) e a pH 5 (in basso) prima e dopo un'ora dal rilascio.

Nella zona ossidrilica degli spettri dei campioni Arg_11@PSSM e Arg_5@PSSM si osservano i modi dovuti alla presenza dell'arginina nella silice. In particolare, in questa zona si ha la vibrazione di stretching dei silanoli, presenti sulla superficie della silice, impegnati in legami idrogeno con l'arginina. Dopo un rilascio di un ora nelle Arg_11@PSSM è ancora presente arginina, poiché nella zona ossidrilica si osservano chiaramente i modi relativi ad essa; invece, nelle Arg_5@PSSM l'arginina è stata tutta rilasciata, infatti, nella zona ossidrilica si osservano solo i modi della silice.

Successivamente, si è proceduto con i test di rilascio e l'analisi FT-IR delle MSM impregnate. In Figura 8.5 sono mostrati gli spettri delle MSM impregnate a pH 5 e a pH 11 nell'intervallo $2100-1350\text{ cm}^{-1}$ prima del rilascio e dopo un rilascio di 10 e 60 minuti.

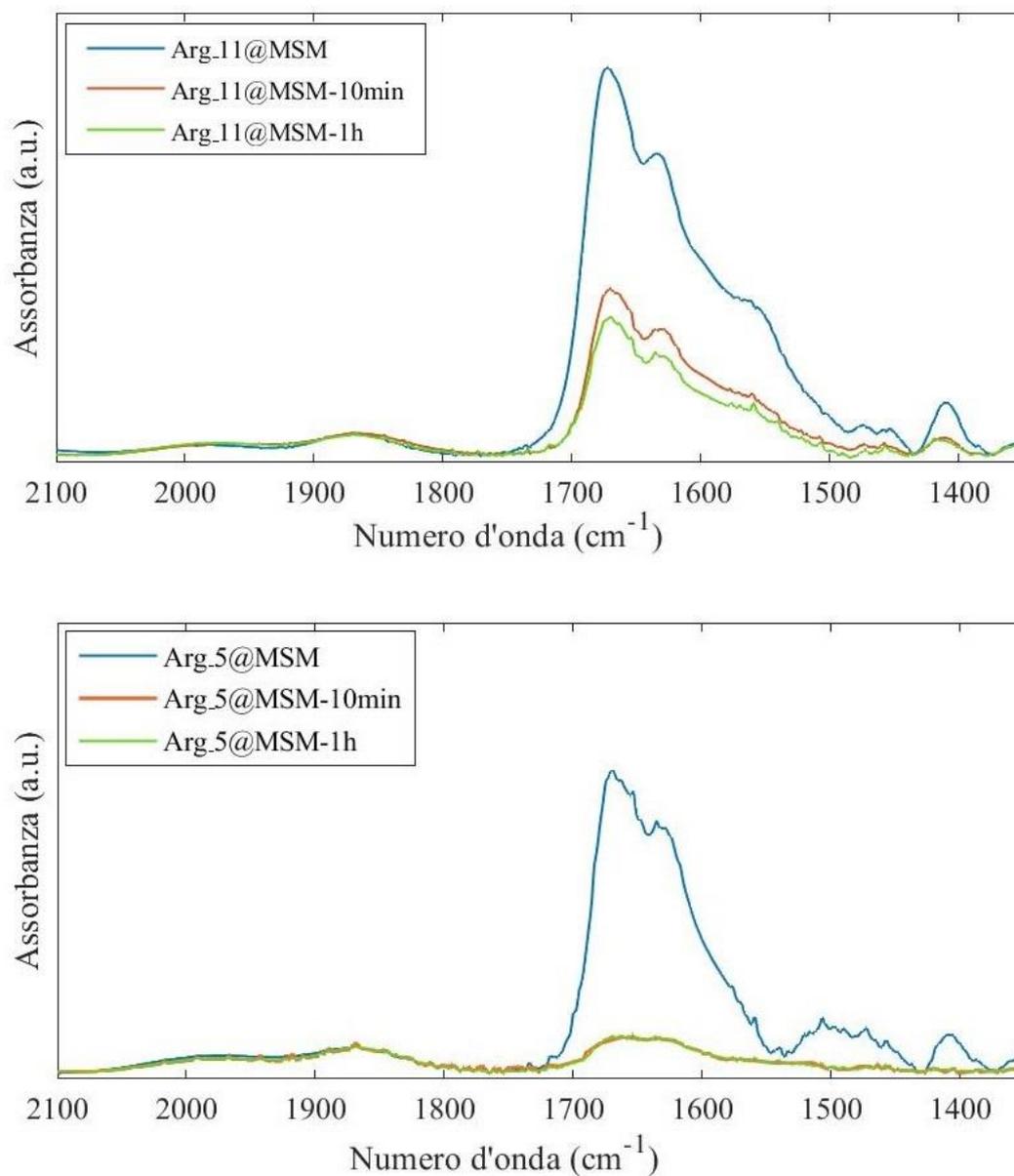


Figura 8.5: Spettri FT-IR delle MSM impregnate a pH 11 (in alto) e a pH 5 (in basso) ai diversi tempi di rilascio.

Dopo il test di rilascio, negli spettri delle MSM impregnate a pH 11 si osservano i modi relativi all'arginina che indicano la sua presenza all'interno dei campioni. Una volta misurata l'altezza della banda presente a 1670 cm^{-1} prima del rilascio (tempo 0) e dopo il test di dissoluzione, è stata stimata la percentuale di arginina presente nella silice ai diversi tempi di rilascio. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 8.3, dove è presente anche la quantità di arginina rilasciata

Tabella 8.3: Risultati del test di rilascio delle Arg_11@MSM.

<i>Campione</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Quantità presente nella silice (%)</i>	<i>Quantità rilasciata (%)</i>
<i>Arg_11@MSM</i>	0	100	0
	10	42	59
	60	35	65

Diagrammando i dati relativi ai tempi di rilascio e alla corrispondente quantità di arginina rilasciata riportati in Tabella 8.3 è stata ottenuta la curva di rilascio riportata in Figura 8.6.

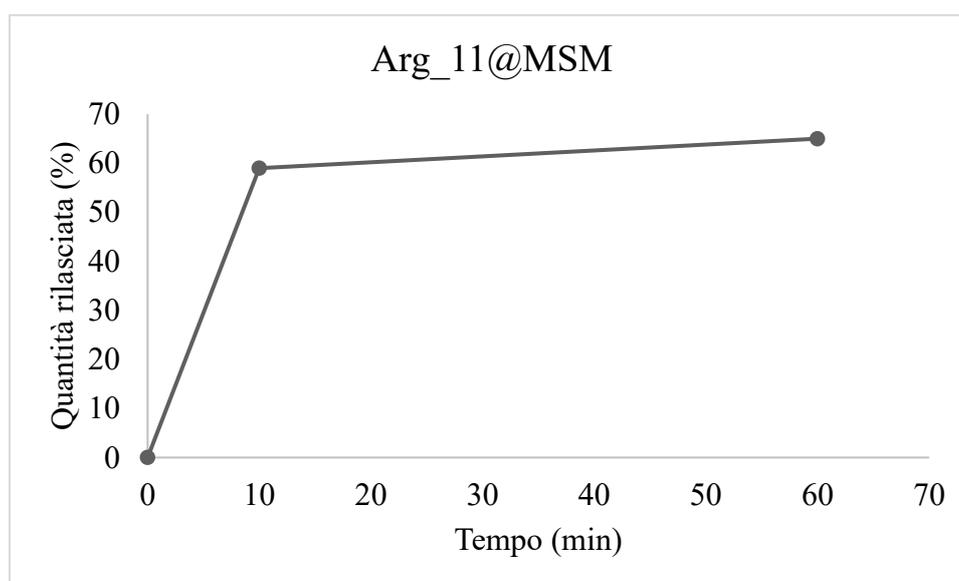


Figura 8.6: Curva di rilascio delle Arg_11@MSM.

Per le Arg_5@MSM si osserva una situazione analoga alle Arg_5@PSSM. Infatti, dopo un rilascio di 10 minuti, nello spettro non si osservano picchi relativi all'arginina indicando che questa è stata rilasciata completamente entro questo intervallo di tempo. In Tabella 8.2 sono riportati i risultati ottenuti dal test di rilascio delle Arg_5@PSSM.

Tabella 8.4: Risultati del test di rilascio delle Arg_5@PSSM.

<i>Campione</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Quantità presente nella silice (%)</i>	<i>Quantità rilasciata (%)</i>
<i>Arg_5@MSM</i>	0	100	0
	10	0	100
	60	0	100

Diagrammando i tempi di rilascio e la quantità di arginina rilasciata riportati in Tabella 8.4 è stata ottenuta la curva di rilascio riportata in Figura 8.7.

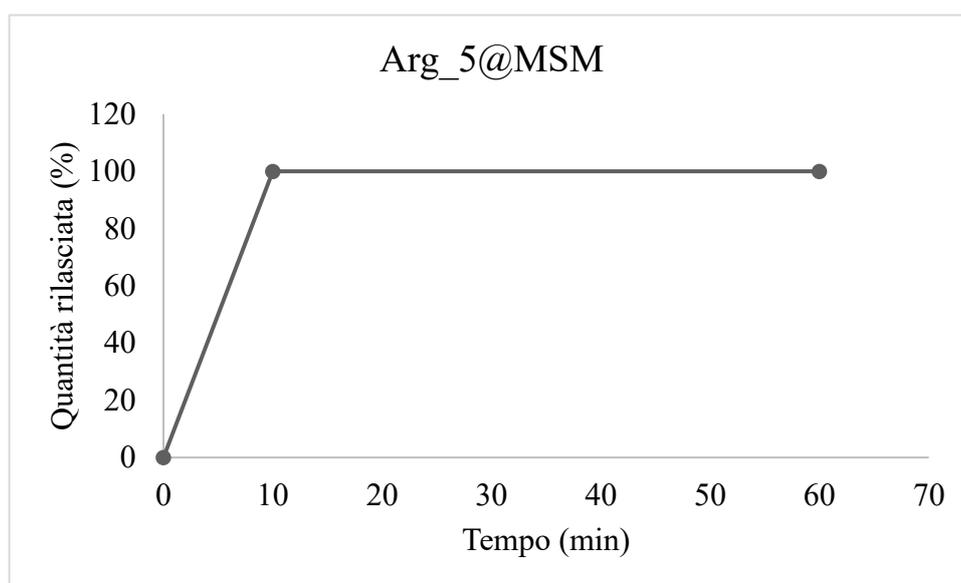


Figura 8.7: Curva di rilascio delle Arg_5@MSM.

In Figura 8.8 sono riportate le zone ossidriliche (intervallo 3800-2400 cm^{-1}) degli spettri FT-IR delle MSM impregnate a diversi pH, prima e dopo un'ora dal rilascio.

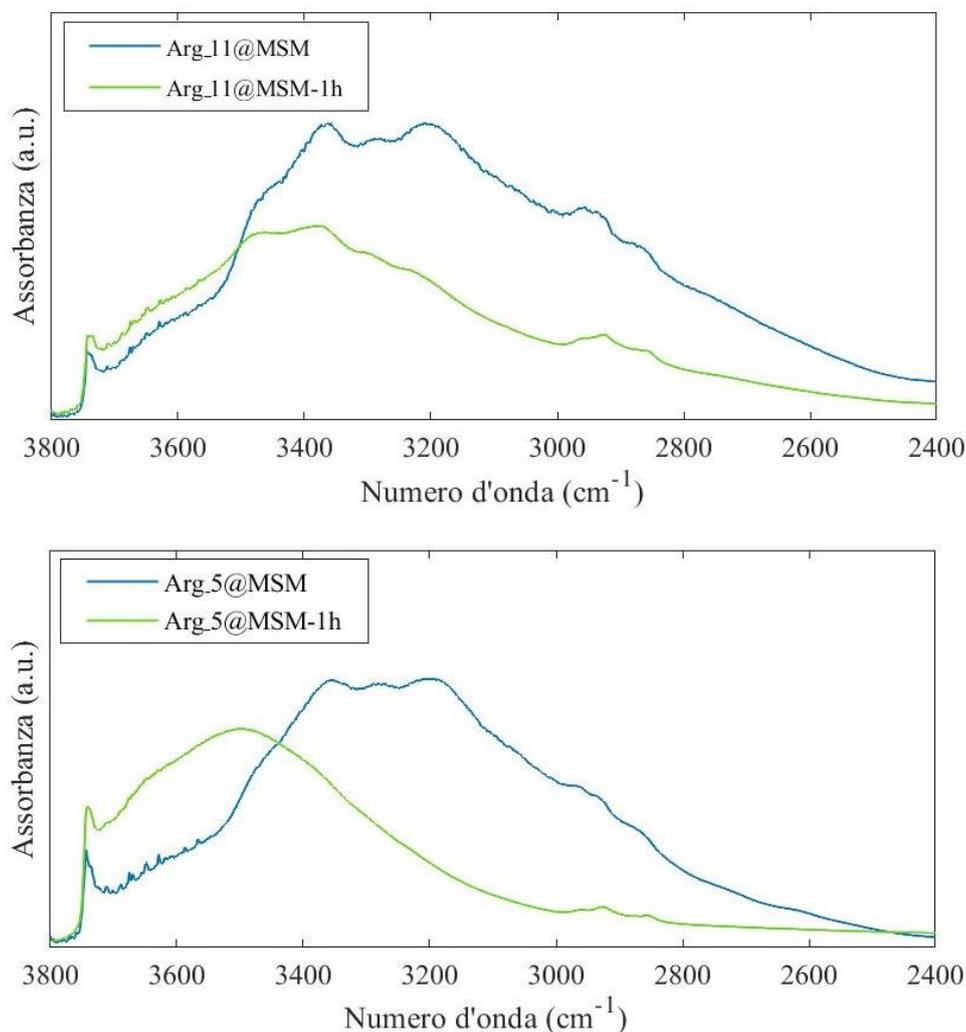


Figura 8.8: Zona ossidrilica degli spettri FT-IR delle MSM impregnate a pH 11 (in alto) e a pH 5 (in basso) prima e dopo un'ora dal rilascio.

Si osserva una situazione analoga alla PSSM, infatti, dopo un rilascio di un ora, nella zona ossidrilica dello spettro delle Arg_11@MSM si osservano i modi relativi all'arginina che indicano la sua presenza all'interno della silice; invece, nella zona ossidrilica delle Arg_5@PSSM sono presenti solo i modi della silice che confermano l'assenza dell'arginina nei campioni.

Dall'analisi dei dati ottenuti dai test di rilascio è stata riscontrata una correlazione tra il diverso pH di impregnazione e la quantità di arginina rilasciata: i campioni di silice impregnati a pH 5 rilasciano tutta l'arginina incorporata entro 10 minuti; invece, quelli impregnati a pH 11 dopo 1 ora dal rilascio presentano ancora arginina. Questa differenza potrebbe essere attribuita alla diversa interazione elettrostatica tra arginina e superficie della silice [111].

L'arginina è un amminoacido basico che a seconda del pH assume diversi stati di ionizzazione, mostrati in Figura 8.9.

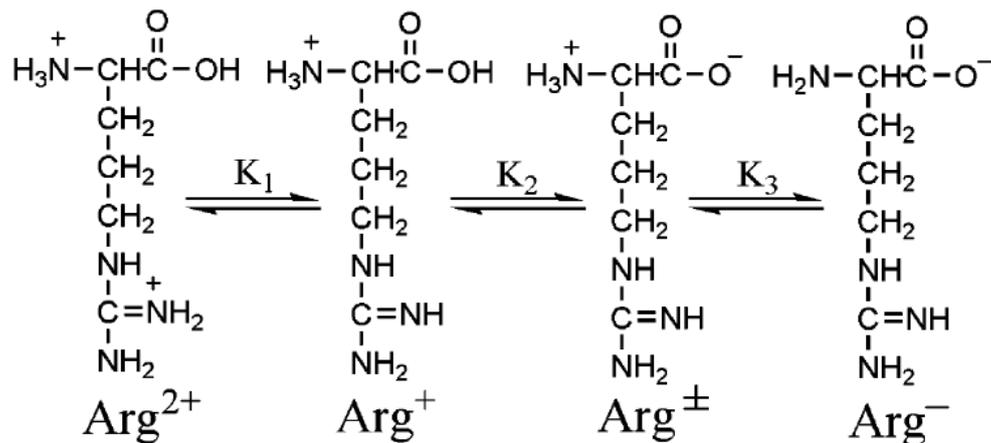


Figura 8.9: Stati di ionizzazione dell'arginina [112].

La superficie della silice può essere costituita da gruppi carichi ($\equiv \text{SiOH}_2^+$ e $\equiv \text{SiO}^-$), gruppi neutri ($\equiv \text{SiOH}$) e gruppi non polari ($\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv$). La sua carica superficiale varia in base al pH. In particolare, la silice presenta un punto isoelettrico intorno a 2. Pertanto, al di sotto di 2 la superficie della silice è carica positivamente; al di sopra di 2 la superficie è carica negativamente [111].

In generale, tra un amminoacido e la superficie della silice si possono instaurare tre tipi di forze: l'interazione di van der Waals, l'interazione elettrostatica e il legame a idrogeno. In particolare, se l'amminoacido è in forma ionica oltre ai legami a idrogeno e alle interazioni di van der Waals si instaurano le interazioni elettrostatiche tra cariche. Invece, se l'amminoacido è neutro si instaurano solamente le interazioni di van der Waals e i legami a idrogeno [111], [112].

Essendo l'arginina un amminoacido basico, la forza dominante tra questa e la silice può essere considerata l'interazione elettrostatica [112]. L'intensità di questa forza dipende dalla carica della superficie della silice e dallo stato di ionizzazione dell'arginina che variano in base al pH.

A pH 5 l'arginina è in forma protonata in quanto la parte carbossilata non è dissociata, mentre la superficie della silice presenta una carica negativa che, probabilmente, non la ricopre del tutto. Dunque, l'interazione elettrostatica tra arginina e silice è debole e, di conseguenza, l'arginina viene rilasciata molto velocemente (entro 10 minuti).

A pH 11 la superficie della silice è carica negativamente e l'arginina è in forma zwitterionica e, dunque, presenta sia una carica positiva sia una carica negativa. Di conseguenza, si potrebbe pensare che a pH 11 l'interazione silice-arginina sia più debole rispetto a pH 5. Tuttavia, a questo valore di pH la densità di carica superficiale della silice carica negativamente è maggiore rispetto a quando la silice si trova a pH 5 [112]. Per questo motivo, a pH 11 si instaurano delle interazioni più forti tra la superficie della silice e l'arginina e, di conseguenza, dopo un rilascio di 1 ora i campioni non hanno rilasciato completamente l'arginina.

Dunque, le PSSM e le MSM, pur avendo delle strutture porose molto differenti, presentano un comportamento analogo.

Inoltre, è interessante il confronto tra i due campioni di silice impregnati a pH 11. Le curve di rilascio di quest'ultimi sono riportate in Figura 8.10. Le Arg_11@PSSM dopo 10 minuti hanno rilasciato il 34% e dopo 60 minuti il 52%; invece, le Arg_11@MSM dopo 10 minuti hanno già rilasciato il 59 e dopo 60 minuti il 65%. Questa differenza potrebbe essere associata alla presenza di un limite diffusivo nelle Arg_11@PSSM. Infatti, in quest'ultime sono presenti dei pori molto piccoli e, inoltre, la degradazione della silice, e la conseguente dissoluzione e riprecipitazione delle specie di silice, causa l'occlusione parziale di alcuni pori e totale di altri, come visto in precedenza; di conseguenza, la diffusione di arginina è ostacolata e, dunque, il rilascio rallentato. Al contrario, nelle Arg_11@MSM anche se si verifica una minima degradazione, i pori e il volume poroso sono così grandi che non è presente un limite diffusivo e, dunque, il rilascio è più veloce.

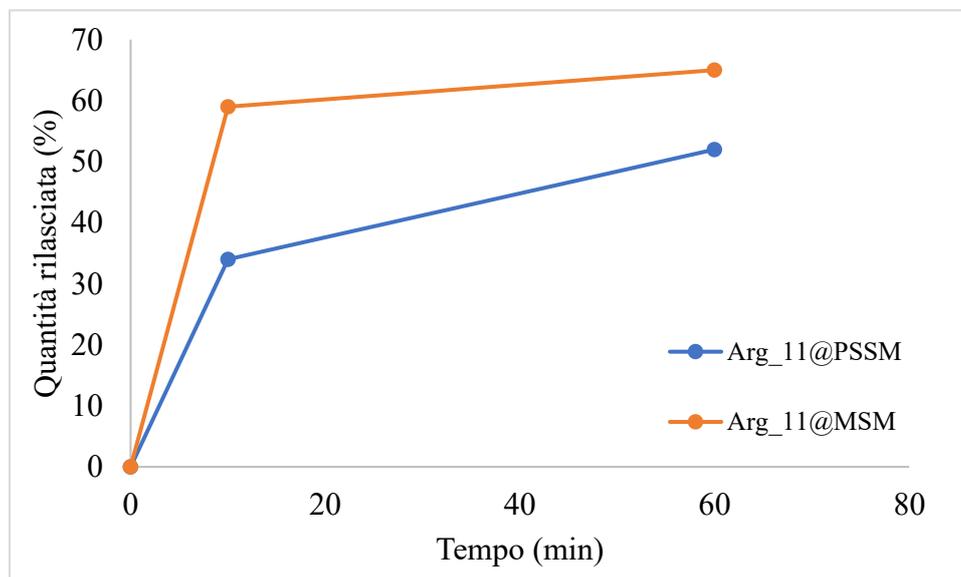


Figura 8.10: Curve di rilascio delle Arg_11@MSM e delle Arg_11@PSSM.

Infine, i risultati ottenuti indicano che il rilascio del farmaco non è influenzato dalla dimensione delle particelle, contrariamente a quanto riportato in letteratura. Infatti, in uno studio è stato mostrato che la velocità di rilascio del farmaco diminuisce all'aumentare della dimensione delle particelle [82]. Invece, in questo lavoro le MSM che presentano un diametro medio di circa 3 μm rilasciano più velocemente arginina rispetto alle PSSM che presentano una dimensione media di circa 466 nm.

9. Conclusioni

Questo lavoro di tesi si è concentrato sullo studio dell'impregnazione di silice mesoporosa con arginina, in vista dell'ottenimento di sistemi per il rilascio di arginina. In particolare, l'interesse è quello di sfruttare l'azione benefica che sia la silice che l'arginina svolgono nelle ferite al fine di realizzare in futuro un dispositivo multifunzionale per la somministrazione topica di arginina per il trattamento delle ferite croniche.

Sono stati sintetizzati due campioni di silice mesoporosa con stessa morfologia ma con dimensione dei pori e diametro delle particelle differenti. Inizialmente, sono state sintetizzate delle Particelle Sferiche di Silice Mesoporosa (PSSM) in condizioni basiche utilizzando il bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB) come agente templante e l'ortosilicato tetraetile (TEOS) come fonte di silice. Successivamente, sono state sintetizzate delle Microsfere di Silice Mesoporosa in condizioni acide impiegando il pluronic P123 come agente templante, il TEOS come precursore della silice e il mesitilene come agente rigonfiante. Per la sintesi di questi due carrier sono state seguite due procedure riportate in letteratura [92], [94].

Le PSSM sono delle particelle sub-micrometriche aventi un diametro medio di 466 nm e una morfologia sferica, come è possibile osservare dalle immagini FESEM. L'isoterma ottenuta dall'analisi di fisisorbimento di azoto è di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi. Le PSSM presentano un'area superficiale specifica di 1142 m²/g e un volume poroso di 0,8 cm³/g. Utilizzando il modello BJH si è calcolato il diametro medio che è risultato pari a 2,4 nm.

Le MSM sono delle particelle micrometriche aventi un diametro medio di 3 µm; anche queste presentano una morfologia sferica, visibile dalle immagini FESEM. Dal fisisorbimento di azoto si è ottenuta un'isoterma di tipo IV con coppia di isteresi di tipo H5, caratteristico dei materiali con porosità disordinata che presentano sia pori aperti che parzialmente ostruiti. Presentano un'area superficiale di 674 m²/g, un volume poroso di 1,64 cm³/g e un diametro medio dei pori di 11,7 nm, calcolato quest'ultimo con il modello DFT.

Gli spettri XRD di entrambi i campioni sintetizzati confermano che questi sono costituiti da silice amorfa.

Al termine della caratterizzazione dei carrier si è proceduto con l'incorporazione di arginina mediante impregnazione da soluzione acquosa. Questa tecnica di drug loading presenta una serie di vantaggi: non richiede l'uso di solvente organici, consente la conoscenza della quantità di farmaco incorporata e può essere condotta a temperatura ambiente non danneggiando il farmaco. Sono state effettuate due impregnazioni, una a pH basico e una a pH acido, al fine di valutare l'effetto del pH della soluzione di arginina sulle proprietà finali del carrier. Successivamente, si è proceduto con la caratterizzazione dei campioni impregnati (Arg_11@PSSM, Arg_5@PSSM, Arg_11@MSM e Arg_5@MSM).

Dalle immagini FESEM si osserva che le particelle, dopo l'impregnazione, presentano ancora una morfologia sferica. Gli spettri XRD dei quattro campioni indicano che l'arginina incorporata è presente in forma amorfa. Negli spettri FT-IR sono presenti i modi dovuti alla presenza dell'arginina nei campioni impregnati.

I dati ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto delle due silici impregnate a diversi pH sono riportati nella Tabella 9.1.

Tabella 9.1: Valori ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto.

Campione	Area superficiale specifica (m²/g)	Volume poroso (cm³/g)	Diametro medio dei pori (nm)
Arg_5@PSSM	895	0,56	2,3
Arg_11@PSSM	558	0,39	3,6
Arg_5@MSM	515	1,54	11,7
Arg_11@MSM	433	1,62	12,6

In tutti i campioni impregnati si osserva una diminuzione dell'area superficiale specifica e del volume poroso che conferma la deposizione del principio attivo nel carrier.

Le isoterme delle Arg_5@PSSM, delle Arg_5@MSM e delle Arg_11@MSM sono molto simili a quelle della silice tal quale. Invece, l'isoterma delle Arg_11@PSSM varia, si tratta, infatti, di un'isoterma di tipo IV con coppia di isteresi di tipo H2, tipico quest'ultimo dei materiali con porosità disordinata. Questa variazione è dovuta alla degradazione del carrier che si verifica in ambiente basico causando la dissoluzione e la riprecipitazione della silice e, di conseguenza, l'occlusione di alcuni pori. La degradazione delle Arg_11@PSSM è confermata anche dall'aumento del diametro medio dei pori e dalle immagini FESEM. Anche le Arg_11@MSM sono soggette ad una leggera degradazione; si osserva, infatti, un aumento del diametro medio dei pori. In questo caso, dalle immagini FESEM non si osservano variazioni della loro superficie. Tuttavia, la degradazione a pH basico è confermata dal trattamento delle MSM con idrossido di ammonio in quanto i dati relativi all'analisi di fisisorbimento di azoto di queste particelle sono molto simili a quelli ottenuti per le Arg_11@MSM, con la differenza che quest'ultime presentano un'area superficiale specifica e un volume poroso minori per la presenza di arginina.

Infine, questo lavoro si concentra sullo studio del rilascio di arginina in acqua deionizzata. Dai dati ottenuti tramite test di dissoluzione e dalle successive analisi mediante FT-IR è stato riscontrato che in base al pH di impregnazione e al tipo di porosità del carrier varia la quantità di arginina rilasciata nel tempo.

In particolare, in base al pH cambia lo stato di ionizzazione dell'arginina e la carica superficiale della silice, di conseguenza, variano le interazioni elettrostatiche all'interfaccia silice-arginina. I risultati ottenuti mostrano che i campioni impregnati a pH 5 rilasciato tutta l'arginina incorporata entro 10 minuti, differentemente, quelli impregnati a pH 11, in questo intervallo temporale, hanno rilasciato una minore quantità di arginina. Dunque, a pH 5 le interazioni elettrostatiche che si istaurano tra silice e arginina sono più deboli rispetto a quelle che si istaurano a pH 11.

Per quanto riguarda l'effetto della porosità del carrier, confrontando i dati di rilascio dei due campioni impregnati a pH 11, si evince che le Arg_11@PSSM rilasciano l'arginina più lentamente. Questo è imputabile alla presenza di pori più piccoli e alla degradazione del carrier. Invece, le Arg_11@MSM sono caratterizzate dalla presenza di pori così grandi che non ostacolano la diffusione dell'arginina.

La scelta del carrier più idoneo tra quelli realizzati dipende dall'applicazione finale. Considerando che l'obiettivo è il trattamento delle ferite croniche e che durante il processo di

guarigione si verifica un rapido consumo di arginina, la scelta più appropriata, in questo caso, è un carrier a rilascio prolungato di arginina e, dunque, le PSSM impregnate a pH 11. Queste anche se sono soggette ad una maggiore degradazione durante il processo di impregnazione, rilasciano più lentamente l'arginina.

Invece, per un'applicazione in cui si richiede un rilascio molto veloce, la scelta più appropriata sarà una silice impregnata a pH 5. Infine, potrebbe anche essere interessante combinare alcune particelle di silice impregnate a pH 11 e altre impregnate a pH 5 al fine di ottenere sia un rilascio immediato che un rilascio prolungato di arginina.

10. Sviluppi futuri

Al fine di sviluppare un dispositivo idoneo per il trattamento delle ferite croniche sono necessari ulteriori studi.

Innanzitutto, bisognerà condurre dei test di rilascio con condizioni più simili a quelle reali. Potrebbe essere interessante studiare il rilascio di arginina dalla silice in un mezzo di dissoluzione acquoso ricco di sali al fine di simulare la composizione dell'essudato della ferita. Degli esempi potrebbero essere la soluzione fisiologica o il tampone fosfato salino (PBS).

Saranno necessari esperimenti *in vivo* in modo da determinare la quantità di arginina necessaria per promuovere la guarigione delle ferite. In questo lavoro le particelle di silice sono state impregnate con il 9% w/w di arginina; in base alla dose di farmaco necessaria si introdurrà all'interno della medicazione un congruo quantitativo di silice e, dunque, di arginina. Nel caso in cui il dosaggio di arginina dovesse essere particolarmente elevato si potrebbe valutare un'impregnazione della silice con un maggior quantitativo di farmaco.

Le ferite croniche, contrariamente alla pelle sana e alle ferite acute, sono caratterizzate da un pH più alcalino, compreso tra 7 e 8 [113], che favorisce lo sviluppo di batteri e la conseguente formazione di biofilm che può compromettere la guarigione della ferita [114]. Per questo motivo, al fine di sviluppare una medicazione più efficace, in grado di controllare la carica batterica, si potrebbero incorporare in essa delle particelle di ossido di zinco (ZnO). Queste particelle possiedono un'eccellente proprietà antibatterica in quanto rilasciano ioni zinco (Zn^{2+}) che causano la rottura della membrana cellulare dei batteri. Balaure *et al.* [115] hanno sviluppato una medicazione per ferite costituita da una matrice di collagene contenente particelle di ZnO. La medicazione ha accelerato la chiusura della ferita e ha impedito la crescita batterica. Inoltre, queste particelle sono interessanti per la loro eccellente biocompatibilità e ridotta citotossicità. Lo zinco svolge anche altri ruoli nel processo di guarigione, infatti, oltre a svolgere un'azione antibatterica, aumenta la proliferazione dei fibroblasti e la migrazione delle cellule epiteliali [116].

Un'altra opzione promettente potrebbe essere quella di dopare la struttura silicea con Zn^{2+} oppure con altri ioni metallici che presentano proprietà benefiche per la guarigione delle ferite. Alcuni esempi sono riportati di seguito:

- Gli ioni calcio (Ca^{2+}) promuovono l'angiogenesi, stimolano la proliferazione delle cellule epidermiche e accelerano la coagulazione del sangue [114];
- Gli ioni rame (Cu^{2+}) presentano proprietà antibatteriche e promuovono l'angiogenesi [114];
- Gli ioni cerio (Ce^{3+}) favoriscono la proliferazione dei fibroblasti, presentano proprietà antiossidanti e antinfiammatorie e inibiscono la crescita batterica [117].

Dunque, le particelle di silice dopate a contatto con il mezzo di dissoluzione, in questo caso l'essudato della ferita, rilasceranno sia il farmaco incorporato sia gli ioni metallici apportando un maggior beneficio alla guarigione.

Infine, per poter applicare le particelle di silice impregnate di arginina sulla ferita bisognerà scegliere un'opportuna medicazione.

Esiste una varietà di modi in cui le particelle possono essere formulate per uso topico, ad esempio sotto forma di formulazioni liquide, secche o viscosi. Il mezzo utilizzato per

sospendere le particelle deve essere scelto accuratamente in base all'applicazione finale in quanto può alterare la cinetica di rilascio del farmaco dalle particelle [60]. In questo caso, considerando che l'arginina è molto solubile in acqua, dovranno essere escluse le formulazioni con un alto contenuto di acqua in modo da evitare un rapido rilascio di arginina e, di conseguenza, un suo eccesso sulla pelle.

Una possibile medicazione potrebbe essere una pasta, costituita da una determinata quantità di polvere di silice impregnata con arginina, applicata su una garza (Figura 10.1). La scelta di utilizzare una pasta su garza si basa sull'idea di creare una medicazione di facile applicazione. Questa medicazione a contatto con la ferita dovrà essere in grado di assorbire l'essudato (costituito da circa 90% di acqua) e rilasciare arginina. Essendo la silice dispersa in un mezzo non acquoso il rilascio di arginina sarà rallentato e, di conseguenza, la somministrazione di arginina nella ferita potrebbe avvenire in un arco temporale esteso. Ciò si traduce in una medicazione con un'azione terapeutica prolungata che presenta il vantaggio di evitare trattamenti ripetuti. In questo modo è possibile evitare dimenticanze inopportune che potrebbero verificarsi in caso di medicazioni che richiedono applicazioni frequenti.

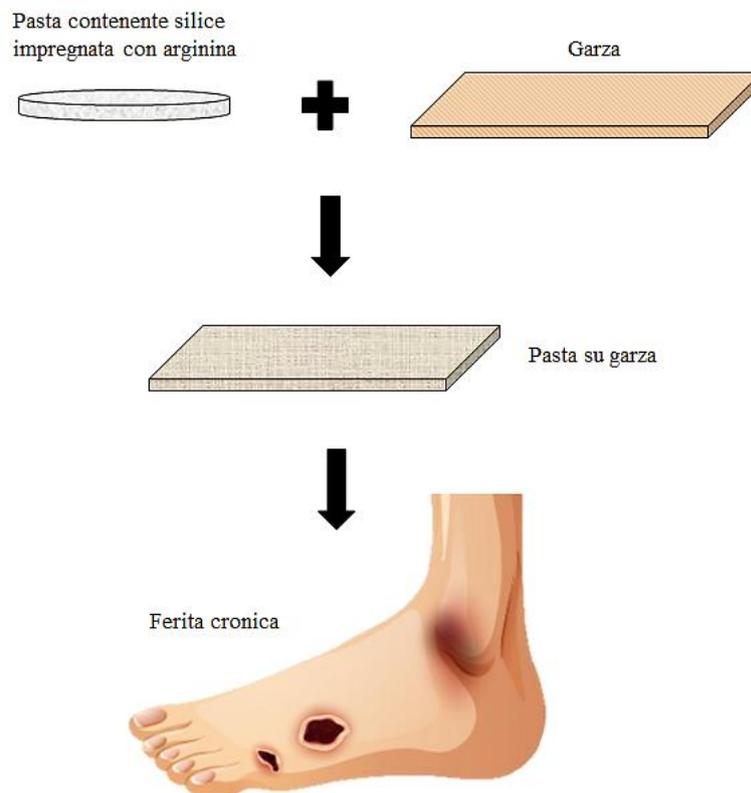


Figura 10.1: Possibile medicazione per ferite croniche a base di silice impregnata con arginina.

Bibliografia

- [1] S. Saghazadeh *et al.*, “Drug delivery systems and materials for wound healing applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 127, pp. 138–166, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.04.008.
- [2] M. E. Okur, I. D. Karantas, Z. Şenyiğit, N. Üstündağ Okur, and P. I. Siafaka, “Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers,” *Asian J. Pharm. Sci.*, 2020, doi: 10.1016/j.ajps.2019.11.008.
- [3] B. Blanco-Fernandez, O. Castaño, M. Á. Mateos-Timoneda, E. Engel, and S. Pérez-Amodio, “Nanotechnology Approaches in Chronic Wound Healing,” *Adv. Wound Care*, vol. 10, no. 5, pp. 234–256, 2021, doi: 10.1089/wound.2019.1094.
- [4] R. K. Thapa, D. B. Diep, and H. H. Tønnesen, “Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects,” *Acta Biomater.*, vol. 103, pp. 52–67, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.025.
- [5] F. Arriagada, S. Nonell, and J. Morales, “Silica-based nanosystems for therapeutic applications in the skin,” *Nanomedicine*, vol. 14, no. 16, pp. 2243–2267, 2019, doi: 10.2217/nnm-2019-0052.
- [6] S. Guo and L. A. DiPietro, “Factors affecting wound healing,” *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 219–229, 2010, doi: 10.1177/0022034509359125.
- [7] J. Gambardella, W. Khondkar, M. B. Morelli, X. Wang, G. Santulli, and V. Trimarco, “Arginine and Endothelial Function,” *Biomedinices*, vol. 8, 2020.
- [8] D. N. R. Shikida, L. F. Dalmolin, F. Fumagalli, F. da Silva Emery, and R. F. V. Lopez, “Arginine-conjugated chitosan nanoparticles for topical arginine release in wounds,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.102115.
- [9] M. S. Jerônimo *et al.*, “Oral or topical administration of L-arginine changes the expression of TGF and iNOS and results in early wounds healing,” *Acta Cir. Bras.*, vol. 31, no. 9, pp. 586–596, 2016, doi: 10.1590/S0102-8650201600900000003.
- [10] C. Charnay, S. Bégu, C. Tourné-Péteilh, L. Nicole, D. A. Lerner, and J. M. Devoisselle, “Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: Drug loading and release property,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, no. 3, pp. 533–540, 2004, doi: 10.1016/j.ejpb.2003.12.007.
- [11] M. J. K. Thomas *et al.*, “Inclusion of poorly soluble drugs in highly ordered mesoporous silica nanoparticles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 387, no. 1–2, pp. 272–277, 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.12.023.
- [12] Y. Zhang, Z. Zhi, T. Jiang, J. Zhang, Z. Wang, and S. Wang, “Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan,” *J. Control. Release*, vol. 145, no. 3, pp. 257–263, 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.04.029.
- [13] 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.

- [14] S. S. Yousef H, Alhajj M, “Anatomy, Skin (Integument), Epidermis.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/> (accessed Feb. 04, 2021).
- [15] F. Larese Filon, M. Mauro, G. Adami, M. Bovenzi, and M. Crosera, “Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 72, no. 2, pp. 310–322, 2015, doi: 10.1016/j.yrtph.2015.05.005.
- [16] R. M. Sábio, A. B. Meneguim, A. M. Dos Santos, A. S. Monteiro, and M. Chorilli, “Exploiting mesoporous silica nanoparticles as versatile drug carriers for several routes of administration,” *Microporous Mesoporous Mater.*, 2020, doi: 10.1016/j.micromeso.2020.110774.
- [17] “La struttura e la funzione della pelle.” <https://www.eucerin.it/> (accessed Feb. 04, 2021).
- [18] “The Integumentary System.” <https://courses.lumenlearning.com/wmopen-biology2/> (accessed Feb. 04, 2021).
- [19] K. K. Agarwal S, “Histology, Skin.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/> (accessed Feb. 04, 2021).
- [20] “Skin Cancer Screening.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65739/> (accessed Feb. 04, 2021).
- [21] J. M. Reinke and H. Sorg, “Wound Repair and Regeneration,” *Eur. Surg. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 35–43, 2012, doi: 10.1159/000339613.
- [22] S. Frank, H. Kämpfer, C. Wetzler, and J. Pfeilschifter, “Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator,” *Kidney Int.*, vol. 61, no. 3, pp. 882–888, 2002, doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00237.x.
- [23] E. M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta, E. Chiesa, S. Pisani, and B. Conti, “Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 8, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12080735.
- [24] T. Velnar, T. Bailey, and V. Smrkolj, “The Wound Healing Process: On overview of the Cellular and Molecular Mechanisms,” *J. Int. Med. Res.*, vol. 37, no. 5, pp. 1528–1542, 2009, doi: 10.1177/147323000903700531.
- [25] S. Bunman, N. Dumavibhat, W. Chatthanawaree, S. ntalapaporn, T. Thuwachaosuan, and C. Thongchuan, “Burn Wound Healing: Pathophysiology and Current Management of Burn Injury,” *Bangkok Med. J.*, vol. 13, no. 02, pp. 91–98, 2017, doi: 10.31524/bkkmedj.2017.09.017.
- [26] Y. Wang *et al.*, “Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, pp. 313–327, 2015, doi: 10.1016/j.nano.2014.09.014.
- [27] H. S. Kim, X. Sun, J. H. Lee, H. W. Kim, X. Fu, and K. W. Leong, “Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 146, pp. 209–239, 2019, doi: 10.1016/j.addr.2018.12.014.
- [28] R. Thakur, N. Jain, R. Pathak, and S. S. Sandhu, “Practices in wound healing studies of plants,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/438056.

- [29] Y. Wang, U. Armato, and J. Wu, “Targeting Tunable Physical Properties of Materials for Chronic Wound Care,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, no. June, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00584.
- [30] K. Hicks-Roof, “The Use of an Arginine-Enriched Oral Nutrition Supplement to Enhance Wound Healing from a Cesarean Section,” *Case Reports Clin. Nutr.*, vol. 1, no. 1–3, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1159/000494666.
- [31] J. A. Molnar, M. J. Underdown, and W. A. Clark, “Nutrition and Chronic Wounds,” *Adv. Wound Care*, vol. 3, no. 11, pp. 663–681, 2014, doi: 10.1089/wound.2014.0530.
- [32] B. Palmieri, M. Vadalà, and C. Laurino, “Nutrition in wound healing: Investigation of the molecular mechanisms, a narrative review,” *J. Wound Care*, vol. 28, no. 10, pp. 683–693, 2019, doi: 10.12968/jowc.2019.28.10.683.
- [33] M. Barchitta *et al.*, “Nutrition and Wound Healing : An Overview Focusing on the Beneficial Effects of Curcumin,” 2019, doi: 10.3390/ijms20051119.
- [34] N. ‘Izzah Ibrahim *et al.*, “Wound healing properties of selected natural products,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 11, 2018, doi: 10.3390/ijerph15112360.
- [35] N. Zampieri, V. Zuin, R. Burro, A. Ottolenghi, and F. S. Camoglio, “A prospective study in children: Pre- and post-surgery use of vitamin E in surgical incisions,” *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, vol. 63, no. 9, pp. 1474–1478, 2010, doi: 10.1016/j.bjps.2009.08.018.
- [36] K. L. Brown and T. J. Phillips, “Nutrition and wound healing,” *Clin. Dermatol.*, vol. 28, no. 4, pp. 432–439, 2010, doi: 10.1016/j.clindermatol.2010.03.028.
- [37] P. H. Lin, M. Sermersheim, H. Li, P. H. U. Lee, S. M. Steinberg, and J. Ma, “Zinc in Wound Healing Modulation,” *Nutrients*, vol. 10, no. 1, pp. 1–20, 2018, doi: 10.3390/nu10010016.
- [38] H. Mani, G. S. Sidhu, R. Kumari, J. P. Gaddipati, and P. Seth, “Curcumin differentially regulates TGF- β 1 , its receptors and nitric oxide synthase during impaired wound healing,” vol. 16, pp. 29–43, 2002.
- [39] A. Oryan, E. Alemzadeh, and A. Moshiri, “Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis,” *J. Tissue Viability*, vol. 25, no. 2, pp. 98–118, 2016, doi: 10.1016/j.jtv.2015.12.002.
- [40] A. A. Maan *et al.*, “The therapeutic properties and applications of Aloe vera: A review,” *J. Herb. Med.*, vol. 12, no. January, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1016/j.hermed.2018.01.002.
- [41] S. S. Foster M, Hunter D, “Chapter 3: Evaluation of the Nutritional and Metabolic Effects of Aloe vera,” in *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition*, 2011.
- [42] E. Sudar-Milovanovic *et al.*, “Benefits of L-Arginine on Cardiovascular System,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 16, no. 2, pp. 94–103, 2016, doi: 10.2174/1389557515666151016125826.
- [43] Z. Chen *et al.* , “Skin wound healing in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed diets supplemented with arginine,” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 104, no. March, pp. 347–358, 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.06.026.

- [44] “Arginine.” <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arginine> (accessed Nov. 05, 2020).
- [45] V. L. Albaugh and A. Barbul, “Arginine,” *Ref. Modul. Life Sci.*, 2017, doi: 10.1016/b978-0-12-809633-8.06082-9.
- [46] J. K. Stechmiller, B. Childress, and L. Cowan, “Arginine Supplementation and Wound Healing,” *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 20, no. 1, pp. 52–61, 2005, doi: 10.1177/011542650502000152.
- [47] M. Z. Gad, “Anti-aging effects of L-arginine,” *J. Adv. Res.*, vol. 1, pp. 169–177, 2010, doi: 10.1016/j.jare.2010.05.001.
- [48] I. B. J. G. Debats, T. G. A. M. Wolfs, T. Gotoh, J. P. M. Cleutjens, C. J. Peutz-Kootstra, and R. R. W. J. van der Hulst, “Role of arginine in superficial wound healing in man,” *Nitric Oxide*, vol. 21, pp. 175–183, 2009, doi: 10.1016/j.niox.2009.07.006.
- [49] “metabolic pathways.” <http://biochemical-pathways.com/#/map/1> (accessed Nov. 05, 2020).
- [50] M. P. McRae, “Therapeutic Benefits of L-Arginine: An Umbrella Review of Meta-analyses,” *J. Chiropr. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 184–189, 2016, doi: 10.1016/j.jcm.2016.06.002.
- [51] L. B. Vong and Y. Nagasaki, “Nitric Oxide Nano-Delivery Systems for Cancer Therapeutics: Advances and Challenges,” *Antioxidants*, vol. 9, 2020, doi: 10.3390/antiox9090791.
- [52] T. Naito, H. Irie, K. Tsujimoto, K. Ikea, T. Arakawa, and A. H. Koyama, “Antiviral effect of arginine against herpes simplex virus type 1,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 23, pp. 495–499, 2009, doi: 10.3892/ijmm.
- [53] A. Viribay, J. Burgos, J. Fernández-Landa, J. Seco-Calvo, and J. Mielgo-Ayuso, “Effects of Arginine Supplementation on Athletic Performance Based on Energy Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Nutrients*, vol. 12, 2020, doi: 10.3390/nu12051300.
- [54] L. Campbell, C. R. Saville, P. J. Murray, S. M. Cruickshank, and M. J. Hardman, “Local Arginase 1 Activity Is Required for Cutaneous Wound Healing,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, pp. 2461–2470, 2013, doi: 10.1038/jid.2013.164.
- [55] H. P. Shi, D. Most, D. T. Efron, M. B. Witte, and A. Barbul, “Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats,” *Wound Repair Regen.*, vol. 11, no. 3, pp. 198–203, 2003, doi: 10.1046/j.1524-475X.2003.11308.x.
- [56] “Drug Delivery Systems,” 2016. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/drug-delivery-systems-getting-drugs-their-targets-controlled-manner> (accessed Mar. 07, 2021).
- [57] P. B. Malafaya, G. A. Silva, E. T. Baran, and R. L. Reis, “Drug delivery therapies I: General trends and its importance on bone tissue engineering applications,” *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 283–295, 2002, doi: 10.1016/S1359-0286(02)00075-X.

- [58] J. K. Patra *et al.*, “Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 1–33, 2018, doi: 10.1186/s12951-018-0392-8.
- [59] I. Garcia-Orue, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, and M. Igartua, “Nanotechnology-based delivery systems to release growth factors and other endogenous molecules for chronic wound healing,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 42, pp. 2–17, 2017, doi: 10.1016/j.jddst.2017.03.002.
- [60] R. Goyal, L. K. Macri, H. M. Kaplan, and J. Kohn, “Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 240, pp. 77–92, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.049.
- [61] S. Hamdan *et al.*, “Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications,” *ACS Cent. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 163–175, 2017, doi: 10.1021/acscentsci.6b00371.
- [62] A. Shah, S. Aftab, J. Nisar, M. N. Ashiq, and F. J. Iftikhar, “Nanocarriers for targeted drug delivery,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 62, no. December 2020, p. 102426, 2021, doi: 10.1016/j.jddst.2021.102426.
- [63] W. Wang, K. J. Lu, C. H. Yu, Q. L. Huang, and Y. Z. Du, “Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1186/s12951-019-0514-y.
- [64] A. Naskar and K. S. Kim, “Recent Advances in Nanomaterial-Based Wound-Healing Therapeutics,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 6, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12060499.
- [65] M. Berthet, Y. Gauthier, C. Lacroix, B. Verrier, and C. Monge, “Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?,” *Trends Biotechnol.*, vol. 35, no. 8, pp. 770–784, 2017, doi: 10.1016/j.tibtech.2017.05.005.
- [66] H. Ezhilarasu, D. Vishalli, S. T. Dheen, B. H. Bay, and D. Kumar Srinivasan, “Nanoparticle-based therapeutic approach for diabetic wound healing,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 6, pp. 1–29, 2020, doi: 10.3390/nano10061234.
- [67] G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, and M. Igartua, “Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 1551–1573, 2015, doi: 10.1016/j.nano.2015.03.002.
- [68] P. S. Korrapati, K. Karthikeyan, A. Satish, V. R. Krishnaswamy, J. R. Venugopal, and S. Ramakrishna, “Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 747–765, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.05.074.
- [69] G. C. Carvalho *et al.*, “Highlights in Mesoporous Silica Nanoparticles as a Multifunctional Controlled Drug Delivery NanoplatforM for Infectious Diseases Treatment,” *Pharm. Res.*, vol. 37, no. 10, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1007/s11095-020-02917-6.
- [70] 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.

- [71] K. B. Seljak, P. Kocbek, and M. Gašperlin, “Mesoporous silica nanoparticles as delivery carriers: An overview of drug loading techniques,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 59, no. April, 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101906.
- [72] E. D. M. Isa, H. Ahmad, M. B. A. Rahman, and M. R. Gill, “Progress in mesoporous silica nanoparticles as drug delivery agents for cancer treatment,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 2, pp. 1–33, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13020152.
- [73] C. Chircov *et al.*, “Mesoporous Silica Platforms with Potential Applications in Release and Adsorption of Active Agents,” *Molecules*, vol. 25, no. 3814, pp. 1–35, 2020.
- [74] R. Huang *et al.*, “Mesoporous silica nanoparticles: facile surface functionalization and versatile biomedical applications in oncology,” *Acta Biomater.*, vol. 116, pp. 1–15, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.09.009.
- [75] Z. A. ALothman, “A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials,” vol. 5, pp. 2874–2902, 2012, doi: 10.3390/ma5122874.
- [76] M. A. Downing and P. K. Jain, *Mesoporous silica nanoparticles : synthesis , properties , and biomedical applications*. Elsevier Inc., 2020.
- [77] F. Farjadian, A. Roointan, S. Mohammadi-Samani, and M. Hosseini, “Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment,” *Chem. Eng. J.*, vol. 359, no. November 2018, pp. 684–705, 2019, doi: 10.1016/j.cej.2018.11.156.
- [78] 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.
- [79] M. Vallet-Regí, F. Balas, and D. Arcos, “Mesoporous Materials for Drug Delivery,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 40, pp. 7548–7558, 2007, doi: 10.1002/anie.200604488.
- [80] R. M. Sábio, A. B. Meneguim, T. C. Ribeiro, R. R. Silva, and M. Chorilli, “New insights towards mesoporous silica nanoparticles as a technological platform for chemotherapeutic drugs delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 564, no. February, pp. 379–409, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.067.
- [81] T. Heikkilä *et al.*, “Mesoporous silica material TUD-1 as a drug delivery system,” *Int. J. Pharm.*, vol. 331, no. 1, pp. 133–138, 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.09.019.
- [82] F. Qu *et al.*, “A controlled release of ibuprofen by systematically tailoring the morphology of mesoporous silica materials,” *J. Solid State Chem.*, vol. 179, no. 7, pp. 2027–2035, 2006, doi: 10.1016/j.jssc.2006.04.002.
- [83] 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.
- [84] M. R. Nasca, G. Puglisi, and C. Carbone, “Farmacologia della cute,” *Le basi della dermatologia*, pp. 197–213, 2011, doi: 10.1007/978-88-470-5283-3_13.
- [85] S. Sapino, S. Oliaro-Bosso, D. Zonari, A. Zattoni, and E. Ugazio, “Mesoporous silica nanoparticles as a promising skin delivery system for methotrexate,” *Int. J. Pharm.*, vol. 530, no. 1–2, pp. 239–248, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.058.

- [86] S. Sapino *et al.*, “Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: Characterization and in vitro studies,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 89, pp. 116–125, 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2014.11.022.
- [87] S. Nafisi, N. Samadi, M. Houshiar, and H. I. Maibach, “Mesoporous silica nanoparticles for enhanced lidocaine skin delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 550, pp. 325–332, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.004.
- [88] 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.
- [89] “Silice colloidale.” https://it.wikipedia.org/wiki/Silice_colloidale (accessed Mar. 26, 2021).
- [90] J. Zhang *et al.*, “In Situ Loading of Basic Fibroblast Growth Factor Within Porous Silica Nanoparticles for a Prolonged Release,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, no. 11, pp. 1297–1302, 2009, doi: 10.1007/s11671-009-9395-6.
- [91] E. M. Hetrick, J. H. Shin, H. S. Paul, and M. H. Schoenfisch, “Anti-Biofilm Efficacy of Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 14, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.052.Anti-Biofilm.
- [92] J. Ambati *et al.*, “Engineered silica nanocarriers as a high-payload delivery vehicle for antioxidant enzymes,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 6, pp. 2096–2103, 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.02.012.
- [93] S. Liu *et al.*, “The Influence of the Alcohol Concentration on the Structural Ordering of Mesoporous Silica: Cosurfactant versus Cosolvent,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 38, pp. 10405–10411, 2003, doi: 10.1021/jp034410w.
- [94] L. Wang, T. Qi, Y. Zhang, and J. Chu, “Morphosynthesis route to large-pore SBA-15 microspheres,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 156–160, 2006, doi: 10.1016/j.micromeso.2005.11.042.
- [95] V. P. Lehto and J. Riikonen, *Drug loading and characterization of porous silicon materials*. Woodhead Publishing Limited, 2014.
- [96] P. Solanki and A. Patel, “In vitro release of l-arginine and cysteine from MCM-48: a study on effect of size of active biomolecules on release rate,” *J. Porous Mater.*, vol. 25, no. 5, pp. 1489–1498, 2018, doi: 10.1007/s10934-018-0561-z.
- [97] E. B. Manaia, M. P. Abuçafy, B. G. Chiari-Andréo, B. L. Silva, J. A. Oshiro Junior, and L. A. Chiavacci, “Physicochemical characterization of drug nanocarriers,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 4991–5011, 2017, doi: 10.2147/IJN.S133832.
- [98] T. Horikawa, D. D. Do, and D. Nicholson, “Capillary condensation of adsorbates in porous materials,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 169, no. 1, pp. 40–58, 2011, doi: 10.1016/j.cis.2011.08.003.
- [99] “Fisisorbimento.” <https://www.alfatest.it/tecniche/fisisorbimento> (accessed Apr. 23, 2021).
- [100] M. M. Rahman, M. Muttakin, A. Pal, A. Z. Shafiullah, and B. B. Saha, “A statistical approach to determine optimal models for IUPAC-classified adsorption isotherms,” *Energies*, vol. 12, no. 23, 2019, doi: 10.3390/en12234565.

- [101] 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.
- [102] “Spettroscopia infrarossa,” [Online]. Available: https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/MA2/deposito/spettroscopia_infrarossa.pdf.
- [103] Uniroma, “Spettroscopia FT-IR,” pp. 1–2.
- [104] “ImageJ.” <https://imagej.net/> (accessed May 30, 2021).
- [105] A. S. Khan *et al.*, “Vibrational spectroscopy of selective dental restorative materials,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 52, no. 6, pp. 507–540, 2017, doi: 10.1080/05704928.2016.1244069.
- [106] A. Khushalani, Deepa, Kuperman, G. Ozin, K. Tanaka, J. Gads, and M. Olken, “Metamorphic Materials: Restructuring Siliceous Mesoporous Materials,” *Adv. Mater.*, vol. 7, no. 10, pp. 38–39, 1995, doi: <https://doi.org/10.1002/adma.19950071005>.
- [107] M. V. Ladau, S. P. Varkey, M. Herskowitz, and O. Regev, “Wetting stability of Si-MCM-41 mesoporous material in neutral, acidic and basic aqueous solutions,” *Microporous and Mesoporous Materials*. pp. 149–163, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(99\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(99)00133-X).
- [108] M. Wolpert and P. Hellwig, “Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500 cm⁻¹,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 64, no. 4, pp. 987–1001, 2006, doi: 10.1016/j.saa.2005.08.025.
- [109] S. Y. Venyaminov and N. N. Kalnin, “Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands,” *Biopolymers*, vol. 30, no. 13–14, pp. 1243–1257, 1990, doi: 10.1002/bip.360301309.
- [110] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. 2001.
- [111] S. S. Hate, S. M. Reutzel-Edens, and L. S. Taylor, “Influence of Drug-Silica Electrostatic Interactions on Drug Release from Mesoporous Silica-Based Oral Delivery Systems,” *Mol. Pharm.*, vol. 17, no. 9, pp. 3435–3446, 2020, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00488.
- [112] Q. Gao *et al.*, “Amino Acid Adsorption on Mesoporous Materials: Influence of Types of Amino Acids, Modification of Mesoporous Materials, and Solution Conditions,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 7, pp. 2261–2267, 2008, doi: 10.1021/jp0763580.
- [113] L. A. Wallace, L. Gwynne, and T. Jenkins, “Challenges and opportunities of pH in chronic wounds,” *Ther. Deliv.*, vol. 10, no. 11, pp. 719–735, 2019, doi: 10.4155/tde-2019-0066.
- [114] O. Castaño, S. Pérez-Amodio, C. Navarro-Requena, M. Á. Mateos-Timoneda, and E. Engel, “Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 129, pp. 95–117, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.03.012.

- [115] P. C. Balaure *et al.*, “In vitro and in vivo studies of novel fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D scaffolds,” *Int. J. Pharm.*, vol. 557, no. December 2018, pp. 199–207, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.063.
- [116] Z. Neščáková *et al.*, “Multifunctional zinc ion doped sol – gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications,” *Bioact. Mater.*, vol. 4, no. October 2019, pp. 312–321, 2019, doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.002.
- [117] S. Kargozar, M. Mozafari, S. Hamzehlou, and F. Baino, “Using bioactive glasses in the management of burns,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. MAR, pp. 1–12, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00062.