

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

Silice mesoporosa contenete acido tranexamico come agente emostatico



Relatori

prof.ssa Barbara Onida
prof.ssa Silvia Maria Ronchetti

Candidato

Alberto Gambino

Marzo 2021

Indice

Acronimi	III
Introduzione	V
1. Agenti emostatici	1
<i>1.1 Coagulazione (Overview)</i>	1
1.1.1 Emostasi primaria	2
1.1.2 Emostasi secondaria.....	2
1.1.3 Regolazione della coagulazione.....	5
<i>1.2 Farmaci procoagulanti e antifibrinolitici</i>	6
1.2.1 Farmaci procoagulanti	6
1.2.2 Farmaci antifibrinolitici	8
1.2.2.1 Iperfibrinolisi.....	8
<i>1.3 Acido tranexamico</i>	9
1.3.1 Proprietà chimico-fisiche	11
<i>1.4 Emostatici topici</i>	11
2. Particelle di silice mesoporosa	15
<i>2.1 Sintesi e morfologie</i>	16
2.1.1 Tipologie di silici mesoporose	18
<i>2.2 Applicazioni bio</i>	19
2.2.1 Drug Delivery Systems	19
2.2.2 Biocompatibilità.....	20
2.2.3 Coagulazione.....	21
3. Materiali e metodi	23
<i>3.1 Materiali</i>	23
<i>3.2 Metodi</i>	23
3.2.1 Sintesi.....	23
3.2.2 Impregnazione.....	24
3.2.3 Rilasci	25
<i>3.3 Caratterizzazione</i>	26
3.3.1 Fisisorbimento di azoto	26
3.3.2 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR).....	28
3.3.3 Diffrattometria a Raggi X (XRD)	28
3.3.4 Analisi Termogravimetrica (TGA)	28
3.3.5 Spettroscopia UV-Visibile	29
3.3.6 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)	32

4. Risultati	33
4.1 <i>Caratterizzazione della Silice non impregnata (MSM)</i>	33
4.1.1 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM)	33
4.1.2 Diffrazione a raggi X (XRD)	34
4.1.3 Fisisorbimento di azoto	35
4.1.4 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR).....	37
4.2 <i>Caratterizzazione della silice impregnata (TXA@MSM)</i>	38
4.2.1 Analisi Termogravimetrica (TGA)	38
4.2.2 Diffrazione a raggi X (XRD)	38
4.2.3 Fisisorbimento di azoto	39
4.2.4 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR).....	41
4.3 <i>Rilasci</i>	43
4.3.1 Test di dissoluzione.....	43
4.3.2 Cella di Franz.....	48
5. Conclusioni	51
6. Sviluppi futuri	55
BIBLIOGRAFIA	59

Acronimi

ALG	Spugna composta da alginato;
ALG/HA₁₀	Spugna composta da alginato e 10% w/w di acido ialuronico;
ALG/HA₂₀	Spugna composta da alginato e 20% w/w di acido ialuronico;
AT III	Antitrombina;
BET	Modello di Brauner-Emmet-Teller
BJH	Modello di Barret-Joyner-Helenda
CBT	Capillarity Bleeding Time;
CH 1 – CS + TA	Medicazione composta da chitosano e condroitin sodio solfato bovino 100 EP impregnata con acido tranexamico;
CH 1 – HA + TA	Medicazione composta da chitosano e acido ialuronico impregnata con acido tranexamico;
CH 1 + TA	Medicazione composta da chitosano impregnata con acido tranexamico;
CRASH-2	Clinical Randomization of an Antifibrinolytic in Significant Hemorrhage-2;
CTAB	Bromuro di cetiltrimetilammonio;
DFT	Density Functional Theory;
DNA	DeoxyriboNucleic Acid, acido desossiribonucleico;
EACA	Acido aminocaproico;
F^x	Fattore della coagulazione dove “x” è il numero romano che ne identifica uno specifico;
F^xa	Fattore della coagulazione dove “x” è il numero romano che ne identifica uno specifico, “a” indica che il fattore è attivato;
FDA	Food and Drug Administration;
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy, microscopia a scansione elettronica ed emissione di campo;
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier;
GRAS	Generally Recognized As Safe;
HF	Iperfibrinolisi;
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry;
IWI	Incipient wetness impregnation;
LD₅₀	Dosaggio che comporta la morte del 50% dei soggetti;
MCM	Mobil Composition of Matter;
MSM PD	Microsfere di silice mesoporosa dopo dissoluzione per quattro ore in acqua deionizzata a 35°C sotto costante agitazione;

MSM	Mesoporous Silica Microspheres, microsfere di silice mesoporosa;
MSP	Mesoporous Silica Particles, particelle di silice mesoporosa;
NaOH	Idrossido di sodio;
P123	Pluronic;
PBS	Tampone fosfato salino;
PEG	Polietilen glicole;
PT	Prothrombin Time;
PTFE	Politetrafluoroetilene;
PTT o aPTT	(activated) Partial Thromboplastin Time, tempo di tromboplastina parziale (attivata);
RNA	RiboNucleic Acid, acido ribonucleico;
SBA	Santa Barbara Amorphous;
SSA_{BET}	Area superficiale specifica;
TAFI	Inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina;
TEG	Tromboelastografia;
TEOS	Ortosilicato tetraetile;
TF	Tissue Factor, fattore tissutale;
TGA	Analisi termogravimetrica;
TMB	Mesitilene;
TMOS	Ortosilicato tetrametile;
tPA	tissue Plasminogen Activator, attivatore tissutale del plasminogeno;
TXA	TraneXamic Acid, acido tranexamico;
TXA@MSM PD	Microsfere di silice mesoporosa impregnate con acido tranexamico 5% w/w dopo test di dissoluzione;
TXA@MSM	Microsfere di silice mesoporosa impregnate con acido tranexamico 5% w/w;
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator, urochinasi;
XRD	Diffrattometria a Raggi X;

Introduzione

Nel corso degli ultimi venti anni diversi emostatici topici sono stati studiati e commercializzati per essere usati in situazioni di primo soccorso [1–3]. Si possono dividere in: adesivi, emostatici meccanici, sigillanti e medicazioni emostatiche. Nell'ultima categoria possiamo trovare le zeoliti che hanno avuto diversi impieghi in zone di guerra dimostrandosi estremamente efficaci, ma presentando un gravissimo effetto collaterale: il sensibile aumento della temperatura in prossimità della ferita in grado di causare ustioni e morte dei tessuti [2] (incremento locale fino a 95°C [4]).

Le silici mesoporose favoriscono la coagulazione allo stesso modo delle zeoliti [1], [3], [5], [6] con la differenza di causare un aumento di temperatura trascurabile [7]. Le particelle di silice sono quindi in grado di favorire l'emostasi sia concentrando gli emocomponenti del sangue adsorbendo l'acqua presente [8], sia attivando il fattore XII della coagulazione grazie alla superficie caricata negativamente [9].

Le particelle di silice mesoporosa (MSP), nell'ultimo ventennio, sono state oggetto di un grande interesse da parte della comunità scientifica e moltissimi studi sono stati compiuti per valutarne l'utilizzo come Drug Delivery System (DDS) [10–12]. La struttura porosa e la biocompatibilità sono le principali caratteristiche che rendono le MSP così promettenti come sistemi di rilascio controllato dei farmaci e sono anche alcune delle principali caratteristiche a favore del loro uso come agenti emostatici [8].

La combinazione delle proprietà emostatiche della silice con la sua predisposizione ad essere impiegata come DDS, impregnandola con un farmaco che favorisca anch'esso la coagulazione, è un'innovativa evoluzione verso l'ottenimento di un dispositivo procoagulante potenzialmente in grado di operare in condizioni di primo soccorso.

Come farmaco si è scelto di impiegare l'acido tranexamico (TXA). Questo principio attivo è un antifibrinolitico, ovvero inibisce l'azione della plasmina impedendo che essa distrugga i reticoli di fibrina [13]. Svolge quindi un'azione emostatica indiretta, non favorisce la coagulazione, ma evita che il coagulo venga distrutto dopo essersi formato [14].

Per quanto riguarda la scelta della silice, prendendo come riferimento il lavoro di Chen et al. [8] si è deciso di dare priorità alla dimensione dei pori. Maggiore è il loro diametro, maggiore sarà la coagulazione e i tempi necessari alla formazione del coagulo si ridurranno. La dimensione delle particelle mesoporose ha un impatto quasi trascurabile sull'azione procoagulante.

Per rispettare le specifiche sopracitate si è deciso di seguire la sintesi di una SBA-15 modificata, proposta da Wang et al. [15]. Il processo utilizzato segue quasi fedelmente le istruzioni proposte da Wang et al. [15] con lo scopo di ottenere pori grandi e particelle sferiche.

In questa tesi per la prima volta si è voluto inserire acido tranexamico all'interno di silici mesoporose al fine di realizzare un agente emostatico. Gli obiettivi del progetto sono: la sintesi di una silice mesoporosa con pori che presentino una dimensione maggiore di 10 nm (in grado di favorire la coagulazione), l'impregnazione del materiale con acido tranexamico e il rilascio dello stesso in meno di un'ora (come raccomandato dal test CRASH-2 [16]).

In letteratura non sono stati trovati articoli riguardanti l'impregnazione di silici mesoporose con acido tranexamico, fatto a riprova dell'originalità del progetto. Sono invece disponibili lavori dedicati allo sviluppo di agenti emostatici che comprendano TXA o le silici: nel lavoro di Li et al. [17] l'acido tranexamico è inserito in microparticelle di chitosano e alginato, mentre

Su et al. [18] hanno scelto microsfele di amido e Wang et al. [19] studiano particelle di silice impregnate con acido tannico.

La tesi è composta da sei capitoli:

- Primo capitolo, Agenti emostatici: viene descritto il fenomeno della coagulazione in termini generali, sia per quanto riguarda la sua definizione più classica sia quella più moderna. Vengono anche indicati i principali farmaci procoagulanti e antifibrinolitici e gli emostatici topici. Particolare attenzione è rivolta all'acido tranexamico, il farmaco selezionato per questo progetto, e la sua azione nei confronti dell'iperfibrinolisi.
- Secondo capitolo, Particelle di silice mesoporosa: vengono elencate le principali proprietà delle particelle di silice mesoporosa, i processi di sintesi e le tipologie più utilizzate. Viene anche descritto il loro impiego come drug delivery systems, la loro biocompatibilità e in particolare la loro efficacia in quanto agenti emostatici.
- Terzo capitolo, Materiali e metodi: è presente un elenco dei materiali utilizzati. In seguito, vengono descritte in dettaglio le metodologie impiegate per la sintesi delle particelle di silice, la loro impregnazione con il farmaco utilizzando la tecnica chiamata Incident Wetness Impregnation (IWI) e i test di rilascio del principio attivo in cella di Franz e tramite dissoluzione della polvere in un becher agitato contenente acqua deionizzata. Sono anche descritte le varie tecniche di caratterizzazione: analisi di fisisorbimento di azoto, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR), diffrattometria a Raggi X (XRD), analisi termogravimetrica (TGA), spettroscopia UV-Visibile (impiegando ninidrina come cromoforo) e microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM).
- Quarto capitolo, Risultati: per prima cosa vengono descritti i risultati della caratterizzazione del materiale sintetizzato tramite immagini FESEM, spettri XRD, i risultati del fisisorbimento di azoto e lo spettro FT-IR. Successivamente si parla dei risultati della caratterizzazione del materiale impregnato, una volta confermato il successo del processo mediante la TGA, ottenuti tramite XRD, fisisorbimento di azoto e FT-IR. Infine vengono studiati i risultati dei due rilasci mediante dissoluzione in becher contenente acqua deionizzata e di quello in cella di Franz, vengono anche riportati alcuni spettri FT-IR e XRD.
- Quinto capitolo, Conclusioni: qui viene ripercorso il lavoro svolto e vengono tratte le conclusioni su quanto ottenuto durante il progetto.
- Sesto capitolo, Sviluppi futuri: vengono riportati quelli che si auspicano siano i prossimi passi da compiere per portare a termine il progetto e si propongono alcune migliorie per l'agente emostatico.

1. Agenti emostatici

Il dissanguamento è una delle maggiori cause di morte sia in ambito civile sia militare dove raggiunge anche il 50% in ambiti di primo soccorso [8]. Diventa quindi estremamente importante la ricerca di sempre più efficaci agenti in grado di arrestare o quanto meno contenere le emorragie. Anche in ambito chirurgico un'adeguata gestione dei fenomeni emorragici permette di ridurre i rischi per i pazienti e i costi delle degenze, riducendo ad esempio il numero di trasfusioni necessarie [5].

Gli strumenti che possiamo utilizzare sono i farmaci procoagulanti, antifibrinolitici e gli emostatici topici.

1.1 Coagulazione (Overview)

In medicina si definisce coagulazione il *“fenomeno basato su complessi sistemi enzimatici attraverso i quali dal sangue liquido si costituisce il reticolo di fibrina e il coagulo solido”* [20]. In tale processo, chiamato anche emostasi, le pareti dei vasi, le piastrine presenti nel circolo sanguigno e le proteine plasmatiche interagiscono tra di loro in una serie di processi finemente regolati [21].

Il sangue fluisce all'interno dei vasi fintanto non sia necessario che esso coaguli in seguito ad una lesione. Il mantenimento dello stato liquido nonostante la presenza di diversi fattori di coagulazione è garantito da diversi meccanismi [22]:

- a) Il flusso stesso del sangue fa sì che i diversi fattori di coagulazione risultino troppo diluiti per operare;
- b) Il flusso laminare del sangue non permette l'aggregazione delle piastrine e il loro contatto con l'endotelio;
- c) Senza l'avvio della cascata del complemento i fattori anticoagulanti sono presenti in concentrazione sensibilmente maggiore rispetto a quelli necessari per la coagulazione;
- d) In assenza di una ferita non vi sono gli stimoli necessari all'attivazione delle piastrine;
- e) Nel flusso sanguigno sono presenti diverse proteasi attive che degenerano i fattori attivi indesiderati.

L'emostasi viene divisa in primaria e secondaria; in particolare: l'emostasi primaria riguarda le piastrine che sono responsabili della prima ostruzione fisica della lesione, l'emostasi secondaria riguarda invece la cascata del complemento che porta alla formazione, tra le altre cose, del reticolo di fibrina [21].

Il processo di coagulazione non può essere lasciato proseguire in maniera incontrollata altrimenti si potrebbe arrivare all'insorgenza di attacchi cardiaci o ictus in seguito alla completa ostruzione dei vasi sanguigni o alla circolazione di coaguli non adesi; diversi anticoagulanti si sono già attivati mentre si forma il coagulo rigido [23].

1.1.1 Emostasi primaria

Nell'emostasi primaria le piastrine intervengono, a seguito di una serie di interazioni molto complesse con la superficie del vaso sanguigno danneggiato e con diverse proteine adesive, al fine di formare un tappo che ostruisca la lesione interrompendo la perdita di sangue [24]. Le suddette piastrine derivano dai megacariociti che maturano nel midollo osseo dopo esservi stati prodotti tramite l'intervento di molteplici citochine e fattori della crescita. Le piastrine risultano essere piccoli pezzi, privi di nucleo, che si separano dai megacariociti ed entrano nel flusso sanguigno [2].

Esse sono dotate di diversi recettori glicoproteici che permettono loro di interagire con il collagene presente nell'endotelio divenuto esposto in seguito alla lesione. Avviene quindi l'adesione alle pareti del vaso in prossimità della ferita [23]. Una volta adese, le piastrine andranno incontro ad alcune modifiche strutturali dovute ad un riarrangiamento del citoscheletro, contemporaneamente rilasceranno contenuti granulari [2] e calcio [24]. Sono quindi ora in forma attiva, in grado di attrarre e attivare altre piastrine presenti nel flusso sanguigno; legheranno il fibrinogeno, anch'esso in circolo, che aderirà a due piastrine diverse collegandole [23]. Il fibrinogeno verrà attivato in fibrina dall'emostasi secondaria rendendo così il coagulo compatto [2].

1.1.2 Emostasi secondaria

L'emostasi secondaria, chiamata anche cascata del complemento, è una cascata regolatoria in cui diversi zimogeni si attiveranno in sequenza, aumentando esponenzialmente la risposta dell'organismo che risulterà anche estremamente sensibile [23]. Alcuni fattori sono ridondanti e convergenti, così l'assenza di uno di essi non compromette la risposta dell'organismo; sono anche presenti cicli di feedback positivi in cui un fattore attiva quello successivo che sarà a sua volta in grado di attivare il precedente [25].

Tradizionalmente la cascata regolatrice si divide, come indicato in Figura 1.1, in via intrinseca, chiamata così perché tutti i suoi componenti si trovano nel flusso sanguigno, e in via estrinseca che prende il nome dall'origine dell'importante fattore tissutale (TF) il quale non è presente all'interno del circolo sanguigno [4]. Originariamente la cascata presentava una forma ad "Y": nel modello le due vie convergono alla protrombinasi, complesso formato da FXa/FVa, diventando una sola (via intrinseca ed estrinseca convergono in quella che viene chiamata via "comune") [26].

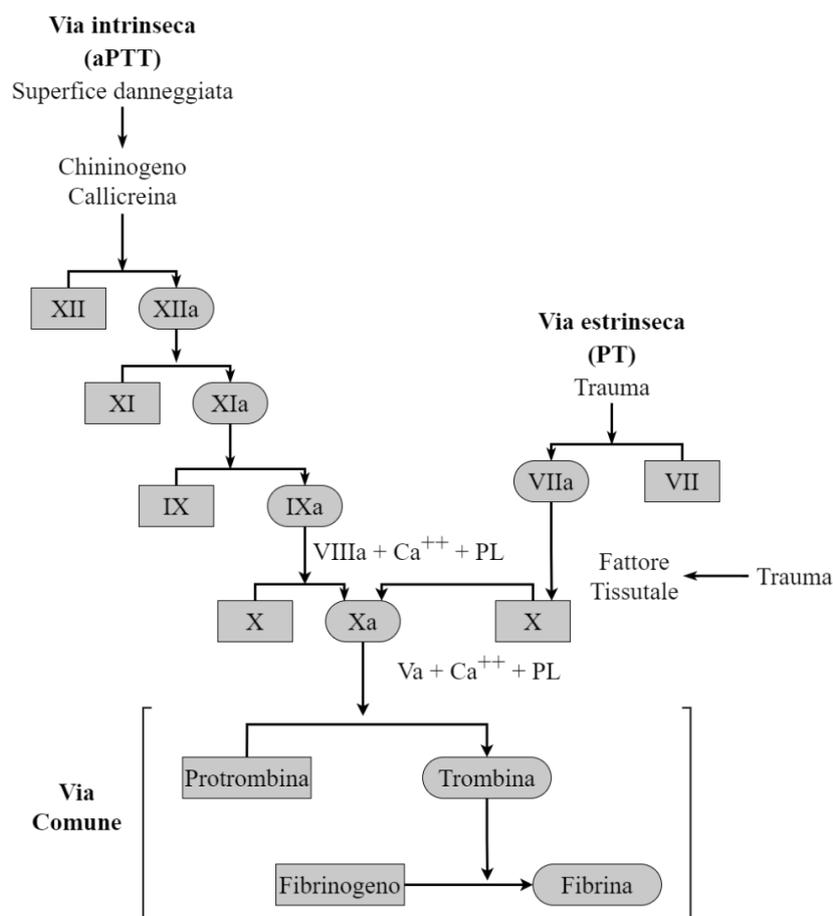


Figura 1.1: Schema rappresentante la cascata regolatrice divisa in via intrinseca ed estrinseca convergenti nella via comune.

Recenti studi hanno messo in dubbio questa divisione oppure hanno ipotizzato diverse interazioni tra i cofattori in seguito ad una maggiore attenzione nei confronti del processo in vivo [27].

In particolare viene discussa la funzione di iniziatore della via intrinseca che il fattore XII svolge insieme al fattore XI, alla prekallicreina e al kininogeno ad alto peso molecolare [24]. L'adozione del modello classico è ancora presente sia per praticità sia per la natura del test di screening in vitro chiamato "tempo di tromboplastina parziale" (PTT o aPTT) che osserva il contributo del suddetto fattore [26].

Negli ultimi anni è stato proposto quindi di adottare per maggiore chiarezza una divisione in fasi, rispetto a quella riportata precedentemente delle due vie convergenti. Abbiamo quindi quattro fasi: iniziazione, amplificazione, propagazione e stabilizzazione [20], [21], [25].

Nell'iniziazione si ha l'esposizione del Tissue Factor (TF), presente nelle membrane sia dei fibroblasti sia delle cellule della muscolatura liscia, al flusso sanguigno in seguito alla lesione e conseguente rottura dei vasi sanguigni [23]. Il TF formerà un complesso con il fattore VII attivato (TF:VIIa), a sua volta attiverà i fattori IX e X responsabili a loro volta dell'attivazione della protrombina in trombina, seppur in quantità limitata [24].

Interviene quindi la fase di amplificazione in cui FIXa si complessa con FVIIIa (FIXa:FVIIIa, tenasi) in presenza di calcio sulla superficie delle piastrine o di altre microparticelle. FIXa:FVIIIa è responsabile di un'attivazione del fattore FX (che si complessa

con FVa formando FXa:FVa, protrombinasi) circa un centinaio di volte maggiore di quella operata da TF:VIIa, aumentando così la trombina disponibile. Il calcio svolge un ruolo rilevante poiché aumenta enormemente l'efficienza dei due complessi che danno anche origine ad un ciclo feedback positivo, dato che la fibrina formatasi aumenta il numero di FVIIIa presente [22].

Nella fase di propagazione il ciclo feedback positivo sopracitato porta ad un accumulo di tenasi e protrombinasi, con conseguente notevole generazione di trombina e attivazione delle piastrine [24].

A questo punto inizia la stabilizzazione in cui la trombina attiva il fattore XIII, esso collega la fibrina tramite legami covalenti, rafforzando e stabilizzando il coagulo tramite l'unione delle catene polimeriche. Contemporaneamente viene attivato "l'inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina" (TAFI) che come dice il nome inibisce la fibrinolisi [24].

I principali dubbi relativi all'importanza e all'utilità del fattore di FXII derivano dall'assenza di problemi alla coagulazione in caso esso non sia presente, i soggetti rimangono perfettamente in grado di arginare efficacemente la perdita di sangue [9], [27], [28]. Comunque si suppone che esso contribuisca alla stabilizzazione del coagulo e la sua propagazione [27]. Lo si può vedere partecipare alla fase di stabilizzazione all'interno dello schema riportato nella Figura 1.2.

Juang et al. [9] hanno ipotizzato che il fattore XII sia un vantaggio evolutivo per i mammiferi terrestri: la sua capacità di attivarsi a contatto con superfici cariche negativamente (fornite ad esempio da DNA, RNA, polifosfati, piastrine attivate, silice e solfato di destrano [25]) ha fatto sì che i ricercatori ipotizzassero che l'esposizione della ferita al terreno, composto da silicati, aiutasse la coagulazione.

I test da loro eseguiti, utilizzando sia topi FXII-knock out sia normali, hanno dimostrato che in presenza del fattore XII la coagulazione avviene più velocemente e con una consistente riduzione della perdita di sangue in seguito all'applicazione di terra sulla ferita, mentre in assenza di FXII non si notano cambiamenti rilevanti. Hanno anche osservato che mammiferi marini come i delfini e uccelli come le galline non presentano il fattore XII, fatto che sostiene la loro ipotesi del legame tra il fattore e il suolo [9]. Perciò pur avendo perso il suo ruolo all'interno della cascata esso rimane un fattore importante nella scelta di utilizzare emostatici inorganici.

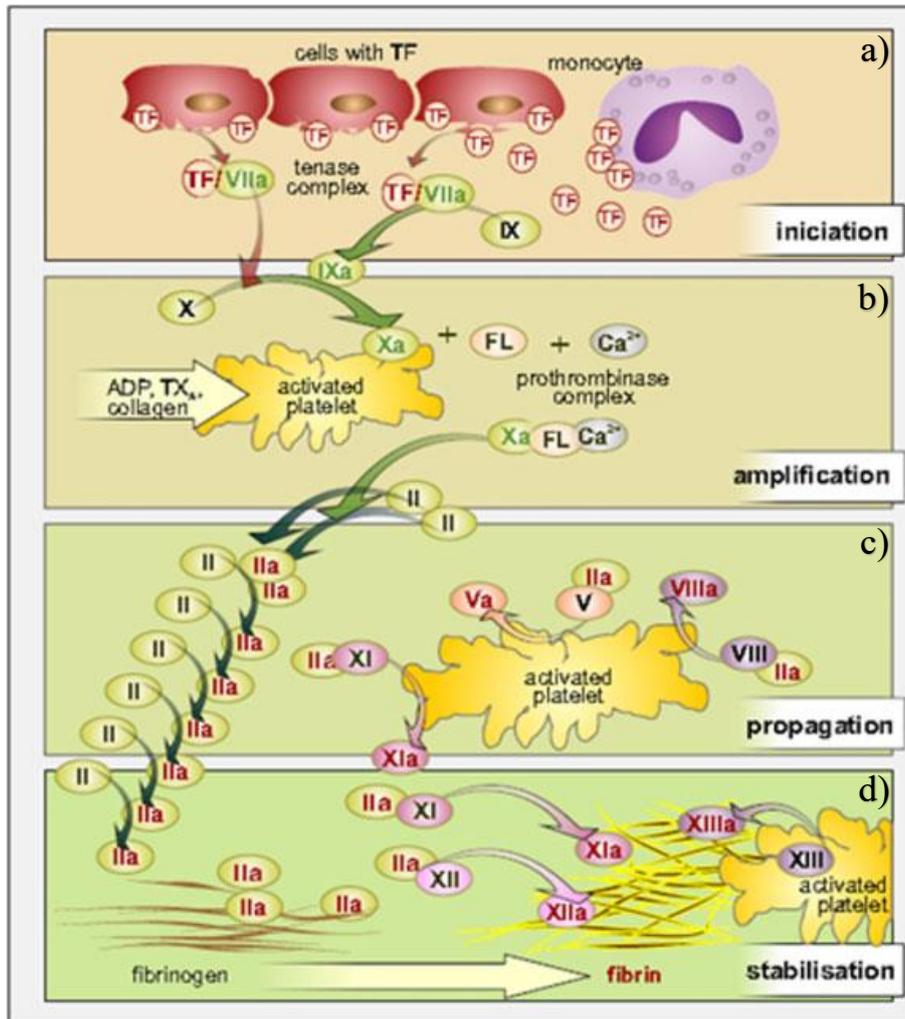


Figura 1.2: Le quattro fasi della coagulazione Iniziazione (a), Amplificazione (b) e Propagazione (c), Stabilizzazione (d) con indicati i relativi fattori [27].

1.1.3 Regolazione della coagulazione.

Diversi meccanismi volti a contrastare la coagulazione si attivano per evitare che essa finisca per arrecare problemi all'organismo. Tra questi elenchiamo alcuni dei più importanti:

- Via della “proteina C”: trombina e trombomodulina formano un complesso in grado di scindere la proteina C, lo zimogeno della serina proteasi. La proteina S e la “proteina C attivata” formano anch'esse un complesso in grado di inattivare i fattori VII e V rompendoli; così facendo si causa un'interruzione di tutta la catena [23].
- Fibrinolisi: lo scopo della fibrinolisi è la rottura della fibrina reticolata, l'agente responsabile è la plasmina. La plasmina deriva da un precursore, il plasminogeno, che viene attivato “dall'attivatore tissutale del plasminogeno” (tPA) e dall'urochinasi (uPA). Esistono diversi inibitori in grado di ostacolare la formazione di plasmina [26].
- Antitrombina: nota anche come AT III, forma un complesso con la serina e agisce come suo inibitore [23]. È anche in grado di inattivare i fattori XIIa, XIa, Xa, IXa [24]. Altri inibitori della trombina sono cofattore di eparina II, α 1-antitripsina e α 2 macroglobulina [24].

1.2 Farmaci procoagulanti e antifibrinolitici

Gran parte dell'attenzione è riservata ai farmaci anticoagulanti che appunto cercano di impedire la formazione di trombi o il loro eccessivo accrescimento al fine di evitare l'insorgenza di trombosi. Si parla molto meno di farmaci procoagulanti e antifibrinolitici, questi ultimi vengono spesso confusi con i primi.

1.2.1 Farmaci procoagulanti

Sono farmaci che intervengono sui diversi fattori della coagulazione sopperendo ad eventuali loro deficit oppure stimolano specifiche fasi del processo coagulativo. Nella Tabella 1.1 sono riassunti i principali farmaci coagulanti da noi analizzati e le ragioni che ci hanno portato o meno alla loro inclusione nel progetto.

Tabella 1.1: Farmaci procoagulanti analizzati

Principio attivo	Descrizione	Azione	Applicabilità
Desmopressina	Analogo dell'ormone vasopressina [29], [30]. Usato inizialmente per trattare pazienti che presentassero la malattia di von Willebrand o forme leggere di anemia [31], è stato successivamente utilizzato per trattare pazienti sottoposti a operazioni chirurgiche di grande entità [30].	Stimola la coagulazione favorendo il rilascio da parte delle cellule endoteliali del fattore di von Willebrand (vWF) e l'incremento della concentrazione del fattore VIII [30]. Contemporaneamente incentiva la fibrinolisi favorendo il rilascio dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), compromettendo la stabilità dei coaguli [29].	Non favorevole ai nostri interessi vista la stimolazione della fibrinolisi in aggiunta all'iperfibrinolisi. Viene ipotizzata l'applicazione in combinazione con l'acido tranexamico [29].

Principio attivo	Descrizione	Azione	Applicabilità
Stimolatori del sangue umano Epoetina alfa (Epoetin-α)	<p>Analogo dell'eritropoietina viene utilizzato per il trattamento di cancro, anemia, insufficienza renale cronica [32], HIV e per ridurre la necessità di trasfusioni di sangue [31].</p>	<p>Accresce la concentrazione di globuli rossi nel sangue operando nel midollo osseo la stimolazione sia dei precursori sia delle cellule progenitrici [31].</p>	<p>Non applicabile poiché richiede somministrazione anticipata in quanto aumenta la concentrazione dei globuli rossi solo nel lungo periodo. Valido solo per limitare trasfusioni post-operatorie [31], [32].</p> <p>-</p> <p>Tutti gli appartenenti alla categoria richiedono la somministrazione diversi giorni prima quindi non sono utilizzabili in situazioni di emergenza.</p>
Vitamina K	<p>Gruppo di vitamine liposolubili non prodotte dall'uomo che presentano struttura simile. Sono assunte tramite l'alimentazione. Sono somministrate per evitare perdita di sangue in seguito alla carenza di vitamina K non dovuta a cattiva alimentazione [29].</p>	<p>Diversi fattori della coagulazione dipendono da esse: protrombina, FVII, FIX e FX. Anche le proteine C, S e Z sono dipendenti dal gruppo di vitamine K, però esse svolgono la funzione di inibitori della coagulazione. [29]</p>	<p>Studi non hanno dato esiti promettenti per quanto riguarda l'uso come farmaco procoagulante in assenza di carenza di vitamina K [33]. Il contributo verso i diversi inibitori della coagulazione non incoraggia il loro uso.</p>
Fattori umani concentrati (Protrombina, FVII, FIX, FX e vWF) Prothrombin complex concentrate (PCC)	<p>Ottenuti mediante sintesi con la tecnologia del DNA ricombinante oppure da plasma di sangue umano prelevato da donatori [31]. L'ottenimento dei fattori della coagulazione risulta molto costoso [34].</p>	<p>Sopperiscono alla mancanza dei fattori della coagulazione in caso di emofilia [31] e contrastano gli effetti degli antagonisti della vitamina K [30]. La loro somministrazione potrebbe favorire la coagulazione in seguito all'aumento della concentrazione.</p>	<p>Non promettenti per l'alto costo e per la mancanza di dati rilevanti alla somministrazione nei casi di nostro interesse sia per quanto riguarda l'efficacia sia la sicurezza [30].</p>

Principio attivo	Descrizione	Azione	Applicabilità
Fattore VII attivato ricombinante (rFVIIa)	Utilizzato in maniera non ufficiale per trattare emorragie traumatiche è ottenuto artificialmente mediante la tecnologia del DNA ricombinante[30].	Genera trombina legandosi al Fattore Tissutale in seguito alla sua esposizione nel sito della lesione [30].	Non promettente perché non ci sono test randomizzati che dimostrino la sua efficacia nel favorire la coagulazione, ci sono anche diverse perplessità dal punto di vista della sicurezza [30].
Fibrinogeno	Somministrato nel caso in cui i suoi livelli scendano sotto concentrazioni critiche può quindi essere utile nel caso di gravi traumi quando il suo utilizzo risulta massivo [30]. Viene solitamente ottenuto dal plasma umano [35].	Si lega alle piastrine per poi essere trasformato in fibrina che polimerizzando rafforzerà il coagulo di sangue creando un reticolo con funzione strutturale [21], [23].	Non promettente per via dell'alto costo e della grande e complessa struttura atomica [35].
Etamsilato	È un farmaco di sintesi, un composto organosolforico derivato dall'acido solfonico [36]. Utilizzato per trattare casi di menorragia, per ridurre la perdita di sangue durante operazioni chirurgiche e per casi di emorragia periventricolare nei neonati con basso peso alla nascita [37].	Favorisce il meccanismo di adesione delle piastrine, favorendo quindi l'emostasi primaria. Incrementa inoltre la resistenza dei capillari e ha una funzione antinfiammatoria. [37]	Potenziabile candidato per le potenzialità di ridurre le emorragie e per la rapidità di azione successiva alla somministrazione [37].

1.2.2 Farmaci antifibrinolitici

Sono farmaci che agiscono inibendo il naturale processo di fibrinolisi e sono particolarmente importanti per contrastare l'insorgenza dell'iperfibrinolisi [29], [30]. L'acido tranexamico è il principale farmaco antifibrinolitico.

1.2.2.1 Iperfibrinolisi

L'iperfibrinolisi (HF) è una conseguenza avversa del naturale processo di regolazione della coagulazione in cui il plasminogeno, dopo essere stato attivato, scinde la fibrina in prodotti solubili [26]. La regolazione di questo fenomeno è estremamente complessa e prevede l'interazione di diverse molecole, la più rilevante è l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA). In seguito al verificarsi del trauma concorreranno sia lesioni ai tessuti che shock,

quest'ultimo causerà ipoperfusione [38], la riduzione del flusso sanguigno al di sotto della quantità necessaria. L'ipoperfusione rappresenta la principale causa scatenante dell'HF [38].

L'iperfibrinolisi causa quindi un'eccessiva distruzione dei coaguli che può portare a gravi emorragie nei pazienti e infine alla morte per dissanguamento, specialmente per quanto riguarda il primo soccorso [26].

In seguito al verificarsi di eventi traumatici di grave entità l'HF ha un'incidenza variabile ed è difficile individuarla con gli attuali metodi diagnostici, nei casi identificati la mortalità supera il 50% [38].

L'utilizzo di farmaci antifibrinolitici per contrastare l'insorgenza della fibrinolisi ha suscitato moltissimo interesse specialmente in seguito al test CRASH-2 effettuato sull'acido tranexamico [16].

1.3 Acido tranexamico

L'acido tranexamico (TXA) è il farmaco antifibrinolitico più usato dopo che l'aprotinin è stato rimosso dal mercato per problemi di sicurezza [29]. Come l'acido aminocaproico (EACA), è un prodotto di sintesi derivato dalla lisina e risulta essere 10 volte più efficace di quest'ultimo e molto più sicuro [14]. Viene anche utilizzato per trattare il melasma [39].

Entrambi agiscono legando il sito recettore della lisina presente sia sul plasminogeno che sulla plasmina, la sua forma attiva, come mostrato nella Figura 1.3; esso non sarà in grado di interagire correttamente con la fibrina che di conseguenza non verrà scomposta nei suoi prodotti di degradazione e il coagulo rimarrà stabile [13]. La sua azione emostatica è quindi indiretta, non favorisce la formazione di nuovi coaguli o la loro crescita, ma li stabilizza evitando che vengano degradati [14].

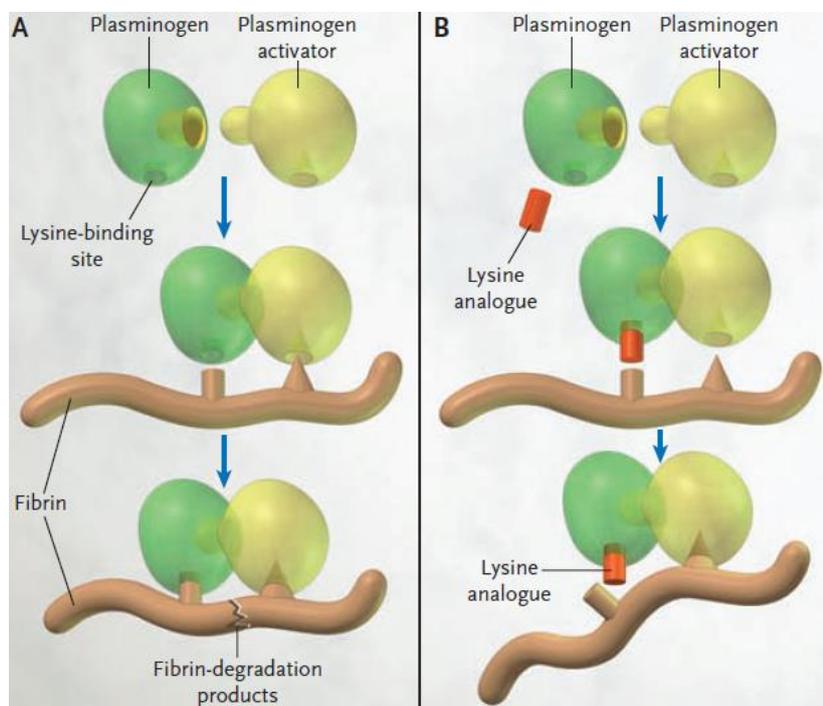


Figura 1.3: Rappresentazione dell'azione del plasminogeno (A) e dell'azione inibitoria degli analoghi della lisina (B) [40].

La plasmina contribuisce anche al processo infiammatorio legandosi sempre alla lisina e quindi l'acido tranexamico svolge indirettamente anche una funzione antinfiammatoria [14]. Cellule endoteliali, monociti, linfociti e piastrine presentano recettori per il plasminogeno [13] implicando che esso possa partecipare anche ad angiogenesi, chemiotassi, guarigione delle ferite e rimodellazione dei tessuti [14]. Di conseguenza il farmaco è in grado indirettamente di influenzare tutti questi fenomeni.

La dose raccomandata per trattare fibrinolisi locale è tra 0.5 g e 1 g di TXA somministrati tramite lenta iniezione endovenosa due o tre volte al giorno e può anche essere somministrato per via orale con dosaggio valutato caso per caso [41]. Vi sono alcuni effetti collaterali e i più comuni sono vomito, diarrea e nausea seguiti da più rare dermatiti allergiche [41]. A frequenza non nota abbiamo: trombosi, reazioni di ipersensibilità inclusa anafilassi, disturbi alla vista che includono una percezione alterata dei colori e malessere eventualmente accompagnato da svenimenti (dopo una troppo rapida iniezione o molto più raramente dopo somministrazione orale) [41]. Ha un'emivita di circa 3 ore e viene espulso per il 90% nelle urine durante le prime 24 ore dalla somministrazione [41].

Le prime pubblicazioni riguardanti l'acido tranexamico risalgono agli anni sessanta e da allora è stato ampiamente usato per trattare fenomeni emorragici in seguito a traumi e pratiche operatorie (cardiache, ortopediche, ecc.) [14]. È controindicato l'uso di TXA su pazienti con disfunzioni renali, presenza di coaguli intravascolari o che siano soggetti a convulsioni [41]. Analisi recenti hanno evidenziato che il farmaco ha un rischio di causare convulsioni al paziente pari al 2,7% [14].

Fondamentale per l'adozione dell'acido tranexamico nei trattamenti di pronto soccorso in seguito a traumi è stato lo studio CRASH-2 (Clinical Randomization of an Antifibrinolytic in Significant Hemorrhage-2): 20.211 adulti, ricoverati in 274 ospedali in 40 Paesi diversi, che presentavano copioso sanguinamento o che ne fossero a rischio, sono stati sottoposti entro 8 ore dall'infortunio a somministrazioni casuali per infusione endovenosa di acido tranexamico o placebo [16].

Lo studio ha dimostrato la capacità di TXA di ridurre enormemente l'insorgenza di morte per dissanguamento e anche successiva ad altre cause senza incrementare l'insorgenza di trombosi [13]. La maggiore efficacia si è raggiunta quando la prima somministrazione è avvenuta entro un'ora dall'evento traumatico; un effetto positivo minore è stato riscontrato se avvenuta tra 1 e 3 ore e una somministrazione dopo le 3 ore non osserva nessun beneficio [13], risultando quindi evidente che un trattamento tempestivo è fondamentale per garantire un'azione corretta.

I risultati positivi presentati dal CRASH-2 hanno spinto ad un uso massiccio dell'acido tranexamico durante il primo soccorso, ma tale pratica ha suscitato diverse perplessità riguardanti la reale utilità di questo utilizzo diffuso; specialmente per quanto riguarda la possibilità che esso causi comunque l'occlusione dei vasi sanguigni [14], [42].

Il farmaco rimane estremamente efficace nell'aumentare la sopravvivenza dei soggetti interessati da iperfibrinolisi [13], [14], [16] e ha dimostrato di essere molto conveniente a livello economico visti il costo relativamente basso e i risultati raggiunti nella riduzione della mortalità [43].

1.3.1 Proprietà chimico-fisiche

Come già detto l'acido tranexamico è un analogo di origine sintetica dell'amminoacido lisina, TXA è un acido monocarbossilico derivante dall'acido cicloesancarbossilico. Ha formula molecolare $C_8H_{15}NO_2$, peso atomico 157,21 g/mol, un gruppo carbossilico, uno amminico e una struttura ciclica centrale composta da 6 atomi di carbonio [44]; come riportato in Figura 1.4.

È possibile acquistarlo sia in compresse sia in soluzioni per iniezione. Ha un punto di fusione superiore a $300^{\circ}C$ e un'elevata solubilità di circa 167,0 mg/ml [44].

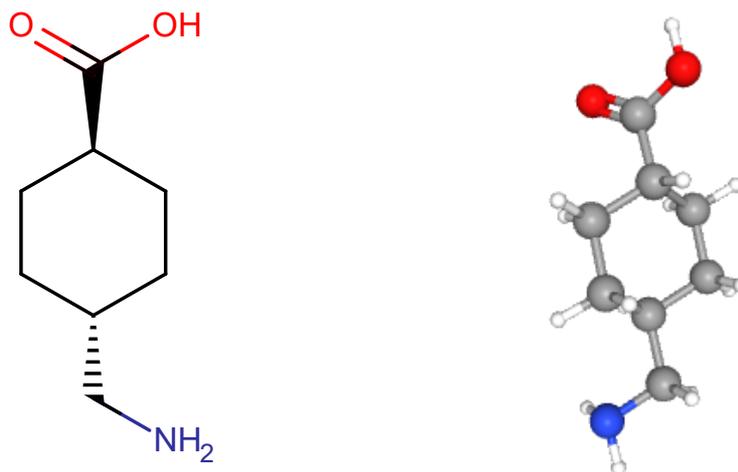


Figura 1.4: formula di struttura dell'arginina in 2D e 3D. [44]

1.4 Emostatici topici

Oltre ai diversi farmaci e al laccio emostatico vengono anche utilizzati gli emostatici topici per contrastare fenomeni emorragici di grave entità sia in situazioni di primo soccorso sia operatorie.

Sono divisi in quattro categorie: adesivi, emostatici meccanici, sigillanti e medicazioni emostatiche [1], [3], [5]; nella Tabella 1.2 sono riportate brevi descrizioni per le categorie. La scelta tra i diversi prodotti dipende dallo stato e dalla posizione della ferita, dalla situazione del paziente e dalla condizione in cui è necessario intervenire; l'utilizzo di una tipologia rispetto ad un'altra avrà gravi effetti sulla sopravvivenza del ferito [5].

Prendendo le zeoliti come riferimento negli ultimi anni si è sviluppato un discreto interesse verso le silici. Le zeoliti esercitano la propria funzione adsorbendo l'acqua e concentrando i fattori della coagulazione, tutto ciò grazie alla loro elevata superficie specifica e alla loro porosità [1], [3], [5], [6]. Hanno però il grosso difetto di rilasciare moltissimo calore durante l'adsorbimento di acqua e la loro struttura non è facilmente modificabile [2]. Le nanoparticelle di silice mesoporosa possiedono un'ancor maggiore superficie specifica e porosità, un grande volume poroso ed inoltre è possibile controllare la dimensione dei pori [19]. Queste caratteristiche le rendono particolarmente adatte al rilascio controllato dei farmaci [10-12].

Tabella 1.2: Emostatici topici analizzati

Classe	Descrizione	Azione	Uso e controindicazioni
Adesivi	Risultano efficaci anche in presenza di disturbi della coagulazione. Partecipano alla formazione del reticolo di fibrina, sono composti da una miscela di trombina, fibrinogeno ed eventualmente fattori della coagulazione come FXIII. Altre formulazioni contengono anche antifibrinolitici. [1], [3]	La trombina scinde il fibrinogeno in fibrina che reticolerà stabilizzando il coagulo. Applicato sulla ferita l'adesivo fornirà fibrinogeno e trombina esogeni. Se la soluzione è accompagnata da un cerotto o una mesh, in grado di contenere la fuoriuscita di sangue, si può anche applicare pressione sulla ferita. [1], [3]	Applicati direttamente sulle ferite. Risultano mediamente costosi, specialmente nel caso delle patch.[3] La formulazione degli adesivi è complicata, vanno preparati in anticipo e la loro durata è limitata, inoltre si degradano molto in fretta. [3] Si utilizza una siringa singola o un sistema a due siringhe, con una punta ad ago smussato o ugello spray (nel caso la superficie sia ampia). Nel caso la ferita sia profonda e irregolare è più indicato l'utilizzo di una schiuma. I cerotti sono contenuti in pacchetti sterili conservati a temperatura ambiente pronti per essere utilizzati. [1], [3]
Emostatici meccanici	Utilizzati solo su pazienti che non presentano disturbi della coagulazione. Sono composti da cellulosa rigenerata ossidata, gelatine, polisaccaridi e agenti a base di collagene. [1], [3]	Assorbono grandi quantità di fluido, favoriscono l'attivazione delle piastrine nonché la loro aggregazione ed intervengono nelle fasi della coagulazione. Per funzionare richiedono che la coagulazione proceda correttamente e che la fibrina sia presente nelle giuste quantità; in assenza di alcuni fattori, ad esempio FVIII e FXII, gli emostatici meccanici non sono in grado di operare. [1], [3]	Vengono applicati direttamente sulla ferita esercitando pressione come strumento di primo intervento. La presenza di corpi estranei può dare problemi quindi va evitato il sovradosaggio, quest'ultimo può dare anche problemi nel caso l'emostatico si espanda con il rischio di comprimere le zone circostanti causando diversi danni. Si conservano pronti all'uso a temperatura ambiente e possono essere trovati in fogli multistrato, spugne o povere in base al tipo di materiali. Sono estremamente convenienti economicamente. [1], [3]

Classe	Descrizione	Azione	Uso e controindicazioni
Sigillanti	<p>Con questo termine si indicano diverse sostanze che svolgono un'azione simile. Idealmente devono essere biocompatibili, non tossici, devono agire rapidamente, mantenere forza, flessibilità ed essere in grado di operare in ambienti con un alto contenuto di acqua.</p> <p>Gli adesivi hanno anche una funzione sigillante. I sigillanti si possono dividere in semi sintetici, glutaraldeide-albumina, e sintetici, a base di glicole, cianoacrilato e PEG-polietilene. Sono comunemente reperibili sotto forma di liquidi a bassa viscosità [1], [3]</p>	<p>Polimerizzano tra di loro e con i tessuti sigillando la ferita ed evitando così la fuoriuscita di sangue. Sono in grado di esercitare la propria funzione in assenza di fattori della coagulazione. [1], [3]</p>	<p>Possono essere spruzzati sulla ferita al fine di formare degli idrogel, o semplicemente versati.</p> <p>Possono espandere causando danni da compressione ai tessuti, in particolare al tessuto nervoso. Alcune tipologie possono dare allergie.</p> <p>Alcuni processi di polimerizzazione sono esotermici quindi si rischia di incorrere in danni, va quindi usata cautela nella scelta dei casi. [1], [3]</p>
Medicazione emostatiche (minerali e polisaccaridi)	<p>Sono polveri, granuli o bende sviluppate in campo militare come strumenti di pronto intervento quando un laccio emostatico risulta inefficace.[1], [3]</p>	<p>Agiscono in tre modi, concentrando i fattori della coagulazione (zeoliti, silici), come procoagulanti (kaolina) o come mucoadesivi (chitina).</p> <p>I primi adsorbono acqua aumentando così la concentrazione dei vari fattori e quindi la loro capacità di interagire.</p> <p>I secondi favoriscono direttamente la coagulazione interagendo con la cascata del complemento.</p> <p>I terzi esercitano un'azione sigillante aderendo i tessuti ed interagiscono elettrostaticamente con gli eritrociti. [1], [3]</p>	<p>Vengono applicati direttamente sulla ferita per arrestare l'emorragia, specialmente quando le ferite sono molte e in luoghi difficilmente maneggiabili come il torso. Le polveri sono facilmente rimosse da abbondanti flussi di sangue, ma sono più efficaci dei bendaggi nel penetrare ferite profonde.</p> <p>I prodotti a base di zeoliti durante l'adsorbimento rilasciano moltissimo calore che può arrecare danni consistenti e comportare dolore per il paziente.</p> <p>Il chitosano può suscitare reazione allergiche in soggetti già allergici ai crostacei.</p> <p>Diverse di queste medicazioni non vengono smaltite dal corpo e le particelle solide entrate nella circolazione sanguigna possono dare origine a trombi. [1], [3]</p>

2. Particelle di silice mesoporosa

Le particelle di silice (SiO_2 , diossido di silicio) mesoporosa hanno dimensione variabile da qualche micron a qualche centinaia o decina di nanometri e pori compresi tra 2 e 50 nm (definizione IUPAC) [10].

Le particelle di silice mesoporosa (nel seguito indicate con MSP) hanno ricevuto un crescente interesse negli ultimi decenni nel campo delle nanotecnologie grazie alle loro peculiari caratteristiche, che possono essere riassunte in cinque punti [12]:

- *Struttura porosa ordinata*: la struttura dei pori risulta ordinata, molto spesso non interconnessa, e si mantiene tale per grandi estensioni. Ciò rende in linea di principio prevedibile ed uniforme il comportamento delle MSP.
- *Grande area superficiale e volume dei pori*: solitamente sono rispettivamente maggiori di $700 \text{ m}^2/\text{g}$ e $1 \text{ cm}^3/\text{g}$, garantendo grandi capacità di adsorbimento.
- *Dimensione delle particelle regolabile*: è possibile realizzare nanoparticelle di varie dimensioni, spaziando da poche decine di nanometri fino ad alcuni micron. Ciò ha diversi vantaggi specialmente per quanto riguarda la biocompatibilità.
- *Due superfici funzionali*: la presenza dei pori genera una superficie interna che può essere modificata e funzionalizzata indipendentemente dalla superficie esterna che potrà essere modificata ad esempio con dei ligandi che guidino le particelle verso specifici obiettivi. La superficie interna può essere modificata per meglio interagire con i farmaci.
- *Buona biocompatibilità*: le MSP sono considerate GRAS (Generally Recognized As Safe) dall'FDA statunitense (Food and Drug Administration). Diversi studi con risultati spesso discordanti sono stati compiuti in merito, è comunque parere comune che sia possibile raggiungere elevati livelli di biocompatibilità lavorando sulla forma e dimensione delle MSP e sulla funzionalizzazione delle superfici [10], [11].

Destano un grande interesse in campo medico e biotecnologico come sistemi di rilascio controllato di farmaci, come vettori per la consegna di geni, come mezzi di contrasto nelle risonanze magnetiche e come coagulanti [8], [10]–[12], [45], [46]; hanno diverse applicazioni anche nella catalisi, nella sensoristica, nell'adsorbimento da solvente [10] e per le loro proprietà adsorbenti ad esempio di inquinanti [47].

2.1 Sintesi e morfologie

Le prime silici porose risalgono agli anni sessanta, ma i principali progressi sono stati raggiunti solo negli anni novanta dopo che la Mobil Corporation sintetizzò la MCM-41 [48].

Le MSP sono ottenute mediante diversi metodi: *microwave synthesis*, *sol-gel*, *template synthesis*, *hydrothermal synthesis*, *modified aerogel methods*, *soft and hard templating methods* [10], *evaporation induced self-assembly*.

Più comunemente viene impiegato il metodo *sol-gel* in cui un precursore in soluzione acquosa, solitamente tetraetil ortosilicato (TEOS, $\text{Si}(\text{OEt})_4$) o tetrametil ortosilicato (TMOS, $\text{Si}(\text{OMe})_4$), forma una struttura continua tramite idrolisi e successiva condensazione in presenza di un acido o una base che agiranno da catalizzatori, procedimento riportato in Figura 2.1 [45]. La scelta tra acido o base dipende dalla dimensione delle particelle che si desidera raggiungere. Un ambiente acido favorirà l'idrolisi a discapito della condensazione favorendo la formazione di numerose piccole particelle, invece in un ambiente basico sarà favorita la condensazione che porterà ad avere un minor numero di particelle più grandi [45].

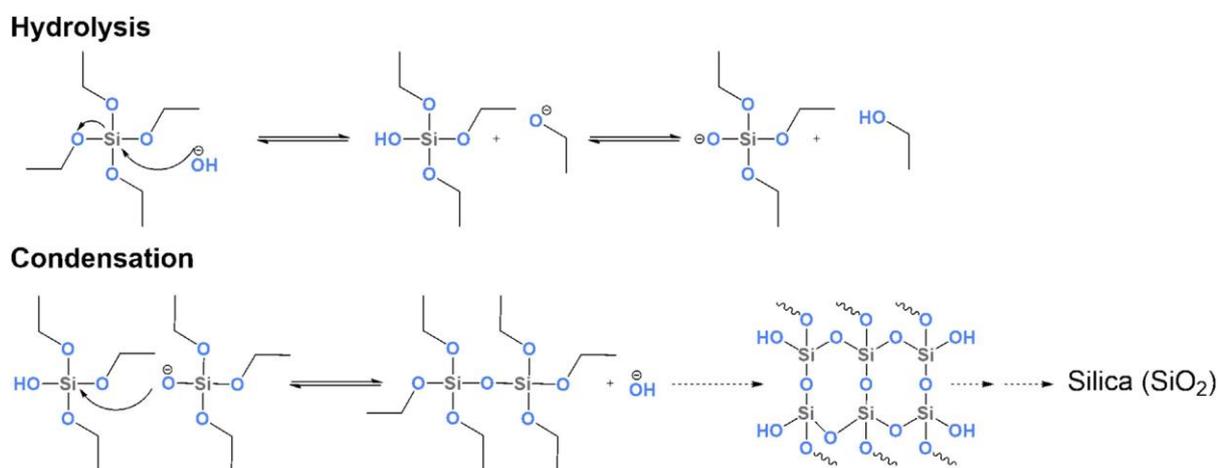


Figura 2.1: Idrolisi e condensazione dei silani [45].

La dimensione delle particelle può essere controllata modulando idrolisi e condensazione mediante l'aggiunta di specifici composti tra cui ammine, alcoli, basi inorganiche e sali inorganici, oppure modificando la concentrazione dei precursori [11].

I pori sono ottenuti mediante l'aggiunta di un tensioattivo che agirà da stampo e supporto per la formazione della struttura silicica (structure directing agent), combinando in pratica la tecnica *sol-gel* con il *soft templating*. Il tensioattivo possiede una porzione idrofoba ed una idrofila e in ambiente acquoso formerà delle micelle, organizzandosi in modo da esporre alla soluzione acquosa la sua componente idrofila; la componente idrofoba si troverà isolata all'interno [45]. Il tensioattivo più comunemente usato è il CTAB, bromuro di cetiltrimetilammonio [49].

È possibile modificare la dimensione e la forma dei pori agendo sulle micelle tramite l'impiego di tensioattivi diversi, in generale catene lunghe origineranno pori grandi mentre catene piccole pori piccoli [11]. Con il CTAB si ottengono micelle sferiche, poi cilindriche e infine cilindri assemblati in strutture esagonali incrementando la concentrazione del tensioattivo. Utilizzando agenti rigonfianti sarà possibile aumentare la dimensione delle micelle [45].

Una volta realizzata la struttura sarà necessario rimuovere i tensioattivi per lasciare liberi i pori e per raggiungere tale scopo si usano due metodi: calcinazione ed estrazione con solvente. La pratica più comune è la calcinazione che prevede di sottoporre le MSP ad alte temperature al fine di degradare il tensioattivo. Le alte temperature causano però la modifica superficiale della silice che diventa più idrofoba, i gruppi Si-OH reagiscono formando Si-O-Si. I pori e la superficie si contrarranno diminuendo di dimensioni. L'estrazione con solvente è meno dispendiosa energeticamente, ma viene evitata per l'alto costo del processo di rimozione del solvente. [45] Inoltre, i solventi sono tipicamente organici e il loro utilizzo è generalmente indesiderato per motivi legati alla loro potenziale tossicità per l'uomo e per l'ambiente.

La *hydrothermal synthesis* prevede un procedimento molto simile a quello *sol-gel* con l'intervento di un tensioattivo come agente direttivo della struttura, la differenza è l'applicazione di alte temperature e pressioni [10]. Questa tecnica è stata da noi utilizzata per modificare il processo descritto da Wang et al. [15].

Applicando un campo elettromagnetico nell'intervallo delle microonde, combinato con alte temperature alla sintesi, si ottengono in tempi ridotti risultati simili a quelli ottenuti con *hydrothermal synthesis*, questo metodo prende il nome di *microwave synthesis* [10].

Nel caso di *evaporation induced self assembly*, si sfrutta la variazione di concentrazione a seguito dell'evaporazione per indurre la formazione di uno stampo con struttura simile ai cristalli liquidi (liquid crystal template). L'evaporazione, oltre che mediante l'incremento di temperatura, può essere ottenuta nebulizzando la soluzione contenente i reagenti. [11]

Una volta ottenute le MSP sarà anche possibile modificare la loro superficie funzionalizzandole allo scopo di modificare, ad esempio, le condizioni di rilascio, il luogo in cui avviene, la quantità di farmaco veicolata e rilasciata e anche la biocompatibilità della particella stessa. Il processo prevede vere e proprie reazioni chimiche oppure il rivestimento delle superfici con diversi materiali. [45]

Usando la tecnica del *soft template* con speciali accorgimenti è possibile creare particelle di silice cave [10].

2.1.1 Tipologie di silici mesoporose

In base alla scelta del tensioattivo si ottengono pori con dimensione e struttura diversa dando origine a una grande varietà di MSP, alcuni esempi delle diverse strutture sono riportati in Figura 2.2. Qui di seguito sono elencate le più comuni [11]:

Mobil Composition of Matter (MCM), particelle sintetizzate dai ricercatori dei laboratori Mobil.

- MCM-41: sono le più studiate in campo biomedico, i pori hanno struttura esagonale e dimensione compresa tra 2 e 6 nm, più comunemente intorno ai 3 nm.
- MCM-48: la dimensione dei pori è analoga a MCM-41, ma la loro disposizione è cubica.

Santa Barbara Amorphous (SBA), materiali sviluppati per la prima volta nell'università della California, Santa Barbara.

- SBA-15: anch'essa studiata in ambito biomedico, ha una disposizione esagonale dei pori con diametro generalmente maggiore di 6 nm, raggiunge anche i 20 nm. Le pareti dei pori sono più spesse rispetto a MCM-41. Inoltre può presentare una microporosità all'interno della parete dei mesopori, interconnettendoli.
- SBA-11: ha struttura cubica e pori più piccoli
- SBA-12: struttura esagonale tridimensionale e pori piccoli.
- SBA-16: pori grandi e struttura a gabbia cubica.

Per la sperimentazione in questa tesi è stata utilizzata una silice tipo SBA-15 modificata con pori grandi [15].

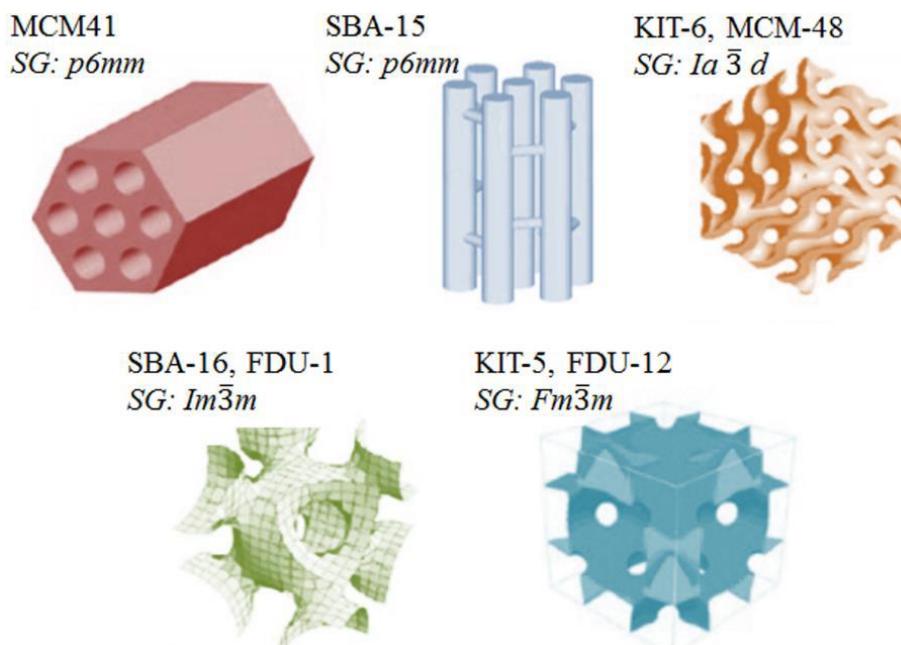


Figura 2.2: Esempi della struttura di diverse particelle di silice mesoporosa [50].

2.2 Applicazioni bio

2.2.1 Drug Delivery Systems

Le particelle di silice mesoporosa sono ampiamente studiate in campo biomedico come Drug Delivery Systems (DDS), ovvero come strumenti per il trasporto e il rilascio in maniera controllata di farmaci nonché per la loro consegna in precise zone dell'organismo e/o in presenza di precise condizioni.

Il farmaco verrà “caricato” sulla particella creando condizioni tali da favorire il suo adsorbimento sulla superficie interna ed esterna. La superficie all'interno dei pori presenta alcuni vantaggi rispetto a quella esterna: è protetta dall'ambiente esterno e grazie alla sua struttura fa sì che farmaci normalmente non solubili possano stabilizzarsi in forma quanto più possibile amorfa e di essere trasportati all'interno dell'organismo. Il mantenimento di una struttura amorfa, meno stabile di una cristallina, può favorire il rilascio del farmaco nel caso di molecole poco solubili in acqua [12].

Le aperture dei pori possono essere chiuse mediante apposite molecole formando veri e propri “tappi” o “porte” in grado di aprirsi in condizioni specifiche rispondendo a pH, temperatura, raggi UV, infrarossi, azione di enzimi, potenziale di ossidazione o campi magnetici [10]. Tale possibilità può essere di grande utilità per farmaci che posseggono un'elevata tossicità o comunque gravi effetti collaterali. Sarà infatti possibile dirigerne il rilascio solo verso i bersagli desiderati riducendo al minimo i danni collaterali.

Lo scopo principale per le MSP è quindi ospitare al loro interno farmaci altrimenti di difficile somministrazione in modo che possano esercitare la loro funzione solo quando necessaria.

La dimensione controllata ed uniforme dei pori permette di applicare modelli ai dati di natura cinetica [10]. Ciò può portare a una fine regolazione delle somministrazioni riducendo le dosi necessarie, il numero di somministrazioni e gli effetti collaterali indesiderati. Nel caso di un farmaco con potenti effetti collaterali, come quelli chemioterapici, un'elevata concentrazione può causare gravi danni evitabili mediante un rilascio controllato.

La superficie interna dei pori può essere funzionalizzata alterando: l'interazione del farmaco con essa, la sua quantità adsorbita e la cinetica con cui esso viene rilasciato [10]. La superficie esterna delle particelle può essere funzionalizzata mediante l'uso di specifici ligandi, recettori o anticorpi monoclonali [11]. Lo scopo è far sì che la MSP tenda naturalmente ad interagire in maniera specifica con cellule o molecole bersaglio dirigendo verso di loro l'azione del farmaco.

Un campo di applicazione recente riguarda i vaccini subunità (antigeni o tossine attenuate ottenuti tramite tecnologia del DNA ricombinante) che potrebbero mostrare vantaggi dall'accoppiamento con silici mesoporese che le proteggono all'interno dei pori; pur essendo altamente efficaci nel causare una risposta immunitaria con minimi effetti collaterali essi sono facilmente degradati da enzimi [10].

Più consolidato è l'utilizzo delle MSP in combinazione con proteine. Essendo molto grandi richiedono specifiche configurazioni dei pori per ospitarle, evitando l'adsorbimento sulla superficie esterna che esporrebbe le proteine a fenomeni deleteri. In altri casi l'adsorbimento sulla superficie esterna si rivela molto utile nel permettere alle particelle di dirigere in maniera efficace il rilascio come sopra indicato. [10]

Le MSP possono favorire la trasfezione, quindi permettono un sicuro e funzionale trasporto di fragile materiale genetico all'interno delle cellule semplificando le terapie geniche. Esse incontrano gravi difficoltà per via della labilità di DNA e RNA durante il lungo percorso compiuto per raggiungere le cellule bersaglio e ricevono anche il vantaggio di un rilascio mirato. [10]

2.2.2 Biocompatibilità

La grande popolarità delle particelle di silice mesoporosa è dovuta anche alla loro biocompatibilità.

Le particelle di silice una volta all'interno dell'organismo vengono circondate da una corona proteica, uno strato di proteine che ricopre in maniera dinamica la superficie esterna delle particelle e che è in grado di nasconderle all'organismo. Modificando la carica superficiale, l'idrofobia/idrofilia o la dimensione dei pori sarà possibile regolare questa corona e modulare stabilità e tossicità. [45]

La silice amorfa che compone le particelle è biodegradabile dall'organismo. La superficie delle MSP viene degradata per idrolisi in acido ortosilicico impedendo che le particelle si accumulino fino a diventare tossiche. Il processo avviene in tre step: prima l'acqua viene adsorbita sulla superficie, poi avviene l'idrolisi vera e propria con la trasformazione dei silossani in silanoli e infine la dissoluzione del silicio come acido ortosilicico. Maggiore sarà la superficie esposta, maggiore sarà la velocità con cui avverrà la degradazione. [45]

Una certa tossicità delle silici mesoporose è dovuta a due meccanismi che dipendono dalla natura della superficie, a sua volta legata alla tecnica usata per rimuovere il tensioattivo [45]:

- I silanoli ($-Si - OH$) presenti sulla superficie perdono il proprio idrogeno diventando $-Si - O^-$. Questi gruppi ionici sono molto reattivi e riescono a distruggere la membrana plasmatica reagendo con i fosfolipidi contenenti tetraalchilammonio.
- I silossani, anch'essi presenti sulla superficie, formano anelli (composti da 3 silossani) estremamente reattivi e in grado di causare membranolisi.

Essendo fenomeni superficiali possono essere arginati modificando la superficie stessa. La porosità ha un effetto sulla tossicità; si è rilevato che essa limita gli effetti avversi e in particolare riduce l'effetto emolitico conseguente alla membranolisi [11]. Ciò si suppone sia conseguenza della diminuzione della concentrazione dei silanoli sulla superficie esterna [11].

La dimensione delle particelle non ha dato risultati univoci, alcuni studi hanno evidenziato che particelle piccole tendono ad accumularsi più facilmente nei tessuti [11], altri studi hanno evidenziato che a dimensioni maggiori corrisponde una maggiore citotossicità [8].

I normali dosaggi impiegati nei test in vivo su topi sono compresi tra 1 e 50 mg/kg ed essi si sono rivelati in grado di sopportare fino a 80 mg/kg [45]. LD₅₀, dosaggio che comporta la morte del 50% dei soggetti esposti, è fissato a 1000 mg/kg [51] facendo sperare che dosaggi maggiori di quelli usuali per i DDS comportino limitati rischi.

Fu et al. [52] hanno osservato che, in seguito a somministrazione endovenosa in modelli murini, le MSP si accumulano principalmente nel fegato e nella milza che però non vengono interessati da altre forme di somministrazione. Nel caso di somministrazione per via intramuscolare o ipodermica hanno evidenziato la capacità di adsorbire, seppur lentamente, attraverso diverse barriere biologiche; nel topo sono stati però osservati fenomeni infiammatori. La maggior concentrazione di particelle di silice mesoporosa è stata riscontrata nelle urine e nelle feci e la somministrazione orale ne incrementa la concentrazione. [11]

I test sull'uomo sono limitati, uno dei principali è stato effettuato su pazienti con melanoma metastatico a cui è stata fatta una singola iniezione di C dots [53], [54], particelle di silice ibridate con un pigmento fluorescente utilizzate come marcatori nel bioimaging [11]. I risultati hanno dimostrato che i C dots sono adatti all'uso umano e ben tollerati [11]. Un altro studio, riguardante particelle di silice mesoporosa ordinate come carrier di fenofibrato svolto su 12 candidati, ha dimostrato, oltre che l'efficacia come DDS, anche la buona tolleranza dei volontari alle particelle [55]. Bukara et al. [55] riportano che gli eventi avversi, tutti di bassa gravità, hanno interessato il 25% dei soggetti: sono state riscontrate piccole lesioni, nausea e dolori alla schiena; in almeno un caso si ritiene che si tratti di effetti collaterali del farmaco stesso e non abbiano relazione con la silice. Nessuna anomalia è stata riscontrata durante la visita medica dei vari soggetti, né ne sono apparse a seguito di test clinici; i segni vitali dei soggetti sono rimasti inalterati.

2.2.3 Coagulazione

Come già anticipato nel capitolo precedente, diversi dispositivi medici utilizzati come emostatici topici si basano su materiali contenenti silice come zeoliti e caolinite [1], [2]. Juang et al. [9] hanno ipotizzato una diretta correlazione tra il fattore XII della coagulazione e il terreno ricco di silicio.

Le proprietà emostatiche delle silici sono note da molto tempo come dimostra lo studio di Margolis [56] risalente al 1961. La scelta di adottare particelle di silice è stata una naturale evoluzione per ovviare ai limiti imposti dalle zeoliti, come affermano anche Dai et al. [7] che hanno realizzato delle particelle ibride xerogel di silice/chitosano. Le particelle di silice mesoporosa sono in grado di adsorbire grandi quantità di acqua senza che ciò comporti un aumento di temperatura a differenza di quello che avviene utilizzando delle zeoliti.

Inoltre, come già detto, le particelle di silice sono caratterizzate, grazie alla ionizzazione dei silanoli [45], da una superficie negativa che è in grado di attivare il FXII [9].

Juang et al. [9] hanno sperimentato l'effetto di diversi tipi di suolo (prelevato da boschi, spiagge e rive dei fiumi) sulla coagulazione utilizzando sia topi privi di FXII che topi normali, evidenziando che l'applicazione di terreno sulla ferita è in grado di dare un effetto emostatico consistente e paragonabile con quello esercitato dalla caolinite. Ciò dimostra che parte dell'azione emostatica esercitata è dovuta all'attivazione del fattore XII che si occupa della stabilizzazione del coagulo una volta formato.

Oltre all'attivazione del sopracitato fattore della coagulazione, le MSP sono in grado di incentivare la coagulazione del sangue adsorbendo l'acqua presente e concentrando piastrine e fattori della coagulazione che interagiranno più facilmente. L'adsorbimento avviene perché gli idrossili dei silanoli presenti sulla superficie formano legami idrogeno con l'acqua che raggiunge la superficie interna dei pori per capillarità [57]. La dimensione dei pori stessa fungerà da setaccio impedendo l'ingresso alle cellule ematiche.

Chen et al. [8] hanno indagato la dipendenza dalla dimensione dei pori e dalla dimensione delle particelle del potenziale coagulante delle MSP. Per farlo hanno utilizzato 6 campioni di MSP diversi, i primi tre avevano particelle di dimensione pari a circa 60 nm e un diametro dei pori rispettivamente circa 6, 11 e 15 nm. Mentre gli altri tre campioni avevano tutti un diametro dei pori di circa 5 nm e dimensione dei pori diversa di circa 100, 150, 220 nm. Il potenziale ζ ha dimostrato che tutti i campioni possedevano tutti una carica negativa e quindi erano in grado di attivare FXII; l'aumento della dimensione dei pori comportava una maggiore carica superficiale, invece non sembra vi sia una correlazione tra la carica e la dimensione delle particelle. Incrementando la dimensione dei pori si osserva un incremento dell'attivazione di

FXII poiché esso riesce più facilmente a diffondere dentro e fuori di essi. Anche la curvatura delle superfici ha un effetto sulla coagulazione: nel documento si afferma che particelle con dimensione maggiore, quindi con minor curvatura, portano ad una maggiore coagulazione. Tale fenomeno non si osserva per le particelle porose e gli autori propongono che la presenza dei pori riduca l'effetto della superficie esterna, rendendo secondario il contributo della dimensione. Il test TEG ha evidenziato come particelle con pori più grandi fossero in grado di ridurre il tempo di formazione del coagulo in maniera consistente e di aumentare anche la forza massima (indicata come MA nei risultati del test); il migliore è risultato essere il campione con dimensione media dei pori di 15 nm e dimensione media delle particelle di 60 nm. I test di biocompatibilità hanno mostrato che la dimensione dei pori ha un effetto positivo, mentre la dimensione delle particelle ne ha uno negativo. Test in vivo su conigli a cui è stata recisa l'arteria femorale hanno dimostrato una sostanziale riduzione dei tempi necessari alla formazione del coagulo in seguito all'applicazione delle particelle scelte. È stata anche incrementata enormemente la sopravvivenza rispetto ai soggetti di controllo sulla cui ferita è stata applicata solo compressione con una garza.

Da ciò possiamo dedurre che la caratteristica più importante per garantire l'efficacia delle silici mesoporose è la dimensione dei pori, più grandi sono più veloce sarà la formazione del coagulo e maggiore sarà la sua forza. La dimensione delle particelle stesse ha quasi nessun effetto nel promuovere la coagulazione, ma potrebbe dare problemi riguardo la biocompatibilità.

L'applicazione delle silici mesoporose può avvenire sotto forma di polvere direttamente sulla ferita. Ciò è molto vantaggioso poiché non servono, ad esempio, la refrigerazione o la necessità di preparazioni preventive, vi sono però diversi svantaggi [57]:

- È difficile far entrare correttamente la polvere all'interno della ferita perché essa finirà per galleggiare nel sangue vista la sua bassa densità.
- È difficile applicare compressione sulla ferita in maniera controllata una volta applicata la polvere per via della sua incomprimibilità.
- In situazioni concitate è facile che la polvere venga dispersa nell'ambiente finendo per arrecare disturbo agli operatori e potenzialmente danneggiare le apparecchiature presenti.
- In caso sia necessario operare il debridement esso risulta ostacolato dalla miscela di sangue e polvere e aumenta la probabilità di procurare dolore al paziente.
- Lo spazio tra le diverse particelle cambierà durante l'applicazione rendendo imprevedibile il fluire per capillarità dell'acqua attraverso di esse.

Un'alternativa è la trasformazione della polvere in granuli mantenendone così i vantaggi e compensando i diversi svantaggi. I granuli mantengono la capillarità tra le diverse particelle, esercitano una maggiore azione coagulante, vengono dispersi più facilmente nella ferita e si riduce il rischio di dispersione nell'ambiente del pulviscolo [57].

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali

Pluronic P123 ((EO)₂₀(PO)₇₀(EO)₂₀; HO(CH₂CH₂O)₂₀(CH₂CH(CH₃)O)₇₀(CH₂CH₂O)₂₀H) Sigma-Aldrich®, ortosilicato tetraetile (TEOS; SiC₈H₂₀O₄ 99,999%) Sigma-Aldrich®, acido cloridrico (HCl, 37%) Sigma-Aldrich®, cloruro di potassio (KCl, in polvere, cristallino, ≥ 99,0%) Sigma-Aldrich®, mesitilene (1,3,5-trimetilbenzene, C₉H₁₂, 98%) Sigma-Aldrich®, ninidrina (C₉H₆O₄) Sigma-Aldrich®, acido tranexamico (C₈H₁₅NO₂) Sigma-Aldrich®, metanolo (CH₃OH) Merck®, potassio fosfato monobasico (KH₂PO₄, ACS reagenti ≥ 99,0%), idrossido di sodio (NaOH, ≥ 98%, pellet anidro) Sigma-Aldrich®, membrana idrofila per dialisi (Spectra/Por, cut off 12-14kDa) Spectrum® e acqua deionizzata (grado LC-MS) Merck®.

3.2 Metodi

3.2.1 Sintesi

Per la sintesi delle microsfere di silice mesoporosa (MSM) sono state impiegate le quantità e la metodologia proposta da Wang et al. [15]; nell'articolo vengono sintetizzate diverse silici variando il rapporto molare di KCl e TEOS (tetraetil ortosilicato), quella da noi scelta presenta un rapporto molare KCl/TEOS pari a 2.

TEOS è il precursore della silice, P123 svolge il ruolo di agente templante dirigendo la formazione della struttura porosa e il mesitilene è un agente rigonfiante impiegato per far aumentare la dimensione dei pori.

23,6 g di HCl vengono disciolti in 120 g di H₂O deionizzata a temperatura ambiente, a questa soluzione vengono poi aggiunti 4,0 g di Pluronic e 6,1 g di KCl. La soluzione viene agitata, con un agitatore magnetico, fino a risultare trasparente e vengono quindi aggiunti 3,0 g di TMB (mesitilene). Si procede con l'agitazione per ulteriori 2 ore, sempre a temperatura ambiente, dopodiché vengono aggiunti goccia a goccia gli 8,5 g di TEOS continuando ad agitare per circa 10 minuti. A questo punto la miscela è posta in un contenitore di PTFE (Politetrafluoroetilene) immerso in un bagno di olio per garantire il mantenimento di una temperatura costante. Si lascia la soluzione senza agitazione per 24 ore a 35°C, per poi aumentare la temperatura a 100°C per ulteriori 24 ore. Differentemente a quanto riportato nel paper, si è sfruttato il contenitore con tappo per operare un trattamento idrotermale, avvalendosi dell'incremento di pressione corrispondente all'aumento di temperatura. Al termine si procede a lavare con acqua deionizzata e filtrare il precipitato così ottenuto al fine di rimuovere i sali e le componenti liquide non desiderate per poi procedere all'essiccazione a 60°C per eliminare l'acqua residua. A differenza di quanto riportato nell'articolo non si è proceduto all'essiccazione in presenza di vuoto. Una volta essiccato il campione viene calcinato in un forno a 500°C senza controllo dell'aumento di temperatura. Il processo schematizzato è riportato nella Figura 3.1.

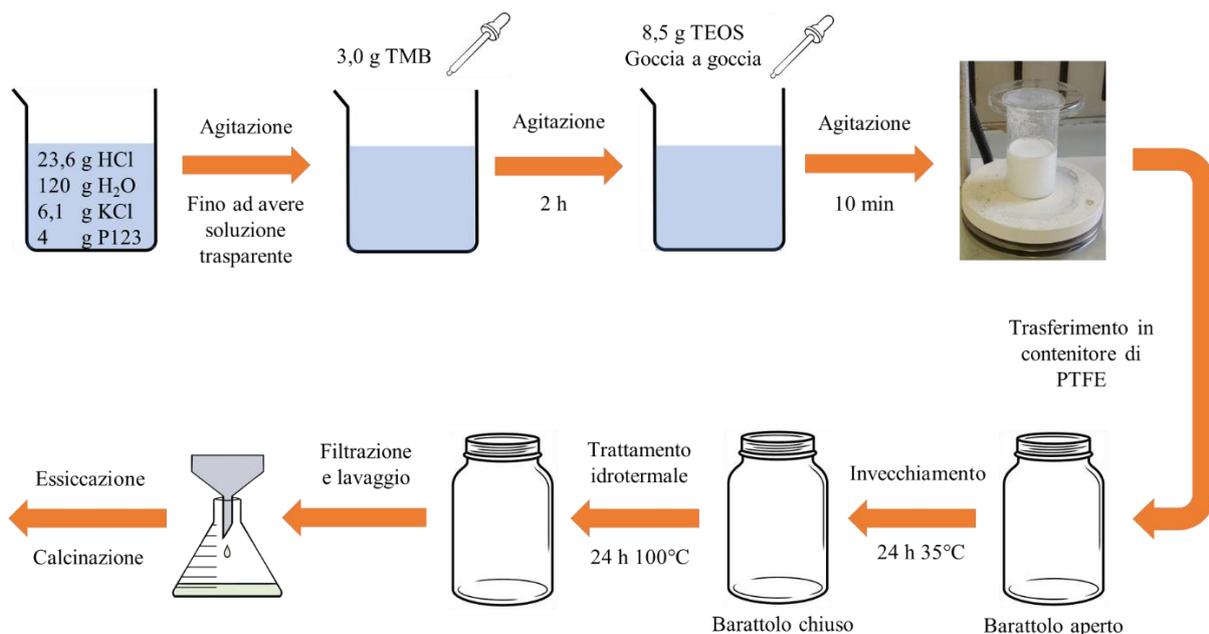


Figura 3.1 Rappresentazione schematica della sintesi della silice mesoporosa.

3.2.2 Impregnazione

Per caricare la silice è stata impiegata la tecnica chiamata Incipient Wetness Impregnation. Il principio è molto simile a quello di una semplice impregnazione per adsorbimento con il vantaggio che il volume di soluzione impiegato è limitato a quello contenuto nei pori [58]. Il processo prevede di bagnare la silice goccia a goccia con la soluzione contenente il farmaco, il liquido riempirà rapidamente i pori per capillarità e il farmaco verrà adsorbito sulla superficie interna [58]. In questo modo si evita il trasporto del farmaco dal bulk della soluzione alla superficie dei pori; esso si troverà già all'interno e sarà soggetto solo al moto superficiale o a quello diffusivo in base alla sua concentrazione. Il basso volume di soluzione impiegato rende la tecnica molto indicata nel caso di farmaci costosi poiché permette di usarne minime quantità ed il processo risulta facilmente controllabile, specialmente se si procederà per impregnazioni successive [58].

L'acido tranexamico presenta un'elevata solubilità in acqua, pari a 167 g/L [44] ed è quindi possibile operare l'impregnazione della silice senza l'utilizzo di solventi particolari.

Vista l'assenza di riferimenti in letteratura riguardo l'impregnazione di silici mesoporose con acido tranexamico si sono valutati altri casi di impregnazione del farmaco in particelle di altri materiali impiegate sempre come carrier di TXA. Nei lavori trovati [17], [18], [59], [60] il quantitativo di principio attivo varia dal 0,5% w/w al 10% w/w; si è adottato il valore intermedio di 5% w/w, superiore ai quantitativi comunemente impregnati che si aggirano intorno al 2-3% w/w. Si è deciso di ottenere 300 mg di silice impregnata, quindi 285 mg di silice e 15 mg di acido tranexamico.

Il volume dei pori misurato ammonta a circa 1,27 cm³/g che si traducono nell'impiego di 0,36 ml di soluzione. Una volta bagnata, la silice è stata lasciata asciugare a temperatura ambiente per un giorno.

3.2.3 Rilasci

Sono state impiegate due tecniche per i rilasci: dissoluzione in becker e cella di Franz. In entrambe viene utilizzata come fase ricevente acqua deionizzata e la temperatura viene mantenuta a 35°C.

Nel caso della dissoluzione si procede inserendo il campione di silice impregnata in un dato volume di acqua deionizzata sotto costante agitazione, al fine di rendere le condizioni omogenee.

30 mg di silice impregnata, TXA@MSM, vengono immersi in 30 ml di acqua distillata. Il prelievo dei campioni è effettuato a 30 minuti e 1 ora, si è scelto di effettuare due prove.

Il procedimento prevede l'utilizzo di una siringa dotata di filtro, una piccola parte della silice è aspirata e rimossa dalla soluzione ad ogni prelievo; il volume prelevato viene reintegrato con acqua deionizzata.

La cella di Franz è uno strumento utilizzato per simulare la permeazione di sostanze attraverso la pelle e permette di raccogliere i campioni in maniera discontinua [61]. Possono anche essere utilizzati tessuti umani ed animali, ma per semplicità si è ricorso a un film di idrocellulosa. Nella Figura 3.2 sono riportati in maniera schematica gli elementi che compongono la cella di Franz, una pinza o ganascia terrà sigillate la camera donatrice e quella ricevente evitando perdite e mantenendo tesa la membrana. Saranno utilizzati due agitatori magnetici, uno nella camera donatrice e uno nella camera ricevente per mantenere condizioni uniformi.

La cella utilizzata ospita 1 ml di soluzione nella camera donatrice e 4 ml di soluzione nella camera ricevente. Nella fase donatrice saranno inseriti 10 mg di acido tranexamico.

Il prelievo dei campioni è effettuato a 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 3 ore e 4 ore mediante la totale rimozione della fase ricevente dall'apposito accesso, sostituendola con un egual volume di acqua deionizzata.

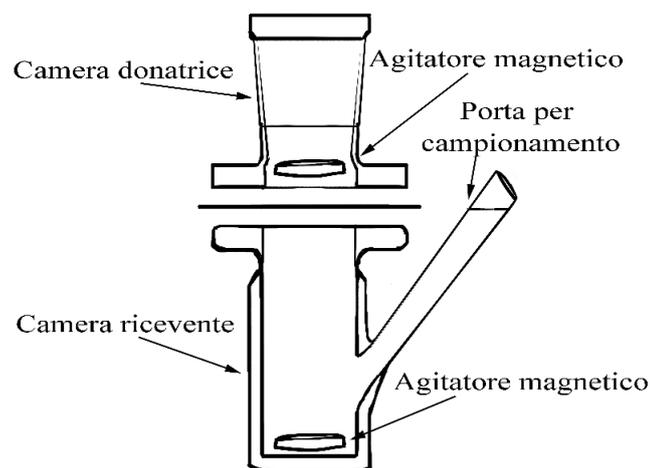


Figura 3.2: Rappresentazione schematica di una cella di Franz.

Ogni campione prelevato dalle due tipologie di rilascio viene trattato con ninidrina come descritto da Ansari et al. [62] e nella sezione 3.3.5 e sottoposto a spettroscopia UV-Visibile.

3.3 Caratterizzazione

3.3.1 Fisisorbimento di azoto

Il fisisorbimento avviene ogni qualvolta un gas, chiamato adsorbato, entra in contatto con la superficie di un solido, chiamato adsorbente, e si hanno interazioni come le forze di van der Waals e legami idrogeno tra i due. Il processo ci permetterà di identificare diverse caratteristiche del materiale poroso che intendiamo studiare, quali: la superficie specifica, la distribuzione della dimensione dei pori, la loro dimensione media (diametro) e il loro volume totale. Tutto ciò tramite l'utilizzo di un gas dalle proprietà note, comunemente azoto, argon o anidride carbonica.

Il risultato della prova è una isoterma di adsorbimento che presenta sull'asse delle ascisse la pressione relativa (rapporto tra pressione istante per istante e pressione di saturazione), mentre sull'asse delle ordinate la quantità di gas adsorbita. Le isoterme possono essere classificate in sei categorie due delle quali si dividono in altre due sottocategorie [63]; la forma delle isoterme corrispondente alle varie classi è riportata nella Figura 3.3.

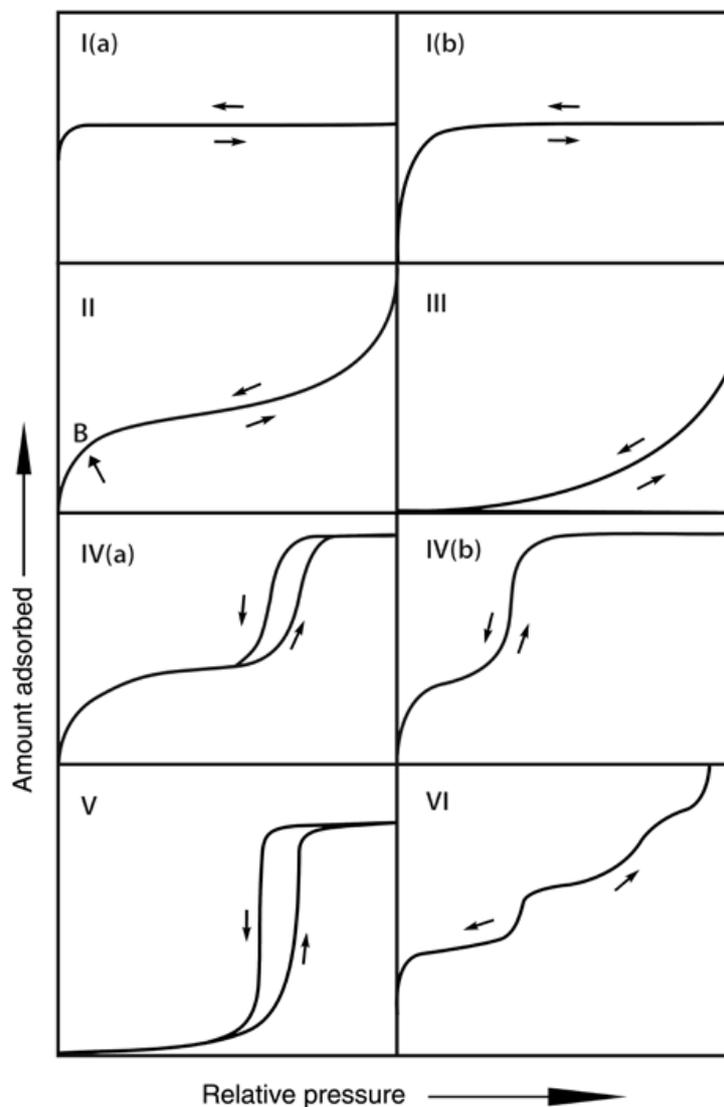


Figura 3.3: Classificazione delle isoterme di adsorbimento [63].

Le particelle mesoporose presentano isoterme di tipo IV in cui, oltre alle interazioni adsorbato-adsorbente, sono presenti interazioni tra molecole condensate [63]. Le isoterme IV(a) sono caratterizzate da un coppia di isteresi che si presenta nel caso la dimensione dei pori superi i 4 nm e l'adsorbato sia azoto a 77 K. Invece si hanno isoterme IV(b), senza isteresi, quando il diametro dei pori è inferiore a quello critico o i pori sono conici o cilindrici rastremati.

I diversi tipi di cappi di isteresi sono dovuti a complessi fenomeni che intervengono durante la fase di desorbimento, le forme dei cappi sono raggruppate in cinque classi; una di esse è ulteriormente divisa in due sottoclassi [63]. Ogni classe è associata ad una tipologia di pori, le forme dei cappi sono riportate in Figura 3.4.

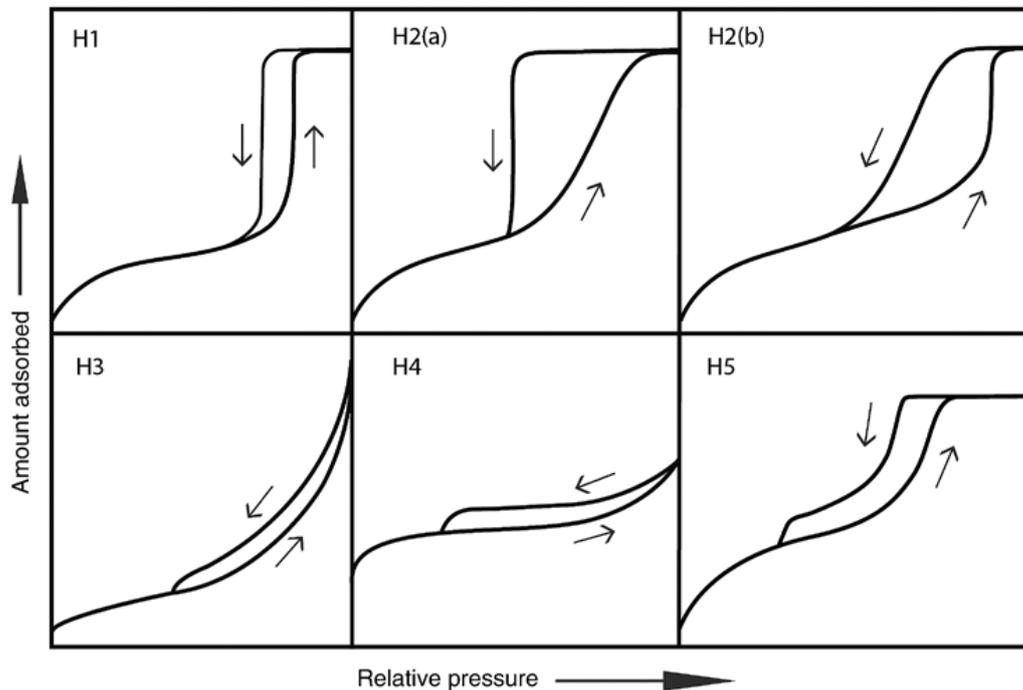


Figura 3.4: Classificazione dei cappi di isteresi [63].

È stato impiegato lo strumento *ASAP 2020 Plus* della *Micromeritics* con azoto liquido, esso richiede che venga utilizzato un campione di circa almeno 50 mg di polvere. La polvere dovrà essere degasata, operazione compiuta dallo strumento stesso, per due ore a 150 °C per rimuovere eventuali adsorbati e inquinanti. Nel caso di materiale impregnato la temperatura viene abbassata a 70°C.

Il modello BET (Brauner Emmet Teller) è stato impiegato per determinare la superficie specifica delle particelle (SS_{BET}). Invece per determinare la distribuzione della dimensione dei pori sono stati impiegati due modelli diversi BJH (Barrett, Joyner e Halenda) e DFT. Ciò perché il modello BJH sottostima di circa un 20-30% la dimensione dei pori con diametro minore o uguale a 10 nm [63], mentre il modello DFT rischia di sovrastimare la dimensione dei pori.

Si è reso necessario effettuare un'ulteriore analisi con il metodo DFT della silice non impregnata utilizzando *Quantachrome AUTOSORB-1 instrument*.

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

L'analisi del campione mediante Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier ci restituisce uno spettro caratteristico del campione studiato, sull'asse delle ascisse sarà riportato il numero d'onda del fotone incidente, mentre sull'asse delle ordinate l'assorbanza o la trasmittanza.

I picchi presenti nello spettro corrispondono a specifici gruppi funzionali, ognuno di essi ha associato un intervallo di numeri d'onda. I picchi però potrebbero essere spostati al di fuori della loro banda caratteristica dall'elettronegatività dei gruppi adiacenti o a causa della disposizione spaziale della molecola [64]. Per un singolo gruppo potremmo avere bande caratteristiche diverse dovute alle molteplici vibrazioni a cui possono essere soggetti i vari legami; possiamo avere diversi tipi di allungamenti, deformazioni o flessioni [64].

Per l'analisi è stato impiegato lo spettrofotometro *Bruker Equinox 55 con detector MCT*, con risoluzione di 2 cm^{-1} e raffreddato con azoto liquido.

I campioni di silice pura e impregnata sono stati trasformati in pastiglie mediante l'uso di pressione; ogni pastiglia viene quindi inserita in una bustina d'oro forata e infine posta in una cella con finestre di KBr permeabili ai raggi infrarossi. Per ottenere un'analisi corretta il campione viene degasato per circa un'ora alla pressione residua di 0,1 Pascal.

3.3.3 Diffrazione a Raggi X (XRD)

La diffrazione a raggi X viene impiegata nello studio di solidi cristallini. Essa permette di identificarne le fasi cristalline e le dimensioni dei cristalli. I raggi X hanno una lunghezza d'onda paragonabile alla distanza tra i piani cristallini del materiale, essi vengono emessi verso il campione dove avverrà il fenomeno della diffrazione. Il fascio diffratto raggiungerà quindi il detector. Il risultato dell'analisi è un grafico che riporta sull'asse delle ascisse il doppio dell'angolo tra fascio e materiale (2θ) e sull'asse delle ordinate l'intensità del fascio. [65]

Per l'analisi XRD è stato impiegato il diffrattometro *Panalytical X'Pert³ Powder* (Cu $K\alpha$ radiation), impiegando un porta campioni di alluminio per ospitare le silici. Le analisi sono state svolte per valori di angolo 2θ compreso tra 5° e 60° .

3.3.4 Analisi Termogravimetrica (TGA)

L'analisi Termogravimetrica permette di valutare la perdita di peso conseguente ad una completa o parziale degradazione del materiale all'aumentare della temperatura. Se la temperatura di degradazione è sufficientemente diversa è possibile identificare le quantità dei singoli composti presenti in una miscela.

Il risultato dell'analisi è un grafico che riporta sull'asse delle ascisse la temperatura o il tempo (il processo prevede un aumento lineare della temperatura nel tempo quindi i due dati sono equivalenti) e sull'asse delle ordinate la perdita di massa percentuale del campione. Confrontando la perdita di massa tra campione impregnato di farmaco e non impregnato sarà possibile stimare la massa di farmaco degradata, la variazione di massa percentuale si ottiene con la Formula 3.1.

$$\Delta m\% = \frac{m_{iniziale} - m_{finale}}{m_{finale}} * 100 \quad (3.1)$$

È stato impiegato *TGA 92.16-18 SETARAM*, i due campioni di silice (tal quale e impregnata) di circa 6,60 mg sono stati sottoposti singolarmente ad un incremento di temperatura di $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ da circa $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $800\text{ }^\circ\text{C}$ in aria.

3.3.5 Spettroscopia UV-Visibile

La spettroscopia UV-Visibile di assorbimento è una tecnica che prevede di impiegare fotoni allo scopo di eccitare le molecole presenti. I fotoni emessi dalla sorgente e isolati da un monocromatore saranno assorbiti dalle molecole e non raggiungeranno il rivelatore posto dietro il campione. Si otterrà quindi uno spettro con la lunghezza d'onda sull'ascissa e assorbanza sull'asse delle ordinate. Sarà necessario inserire un riferimento, chiamato bianco, per escludere tutti i composti indesiderati presenti nella soluzione da analizzare, comunemente i solventi.

I campioni vengono analizzati utilizzando *Lambda 25 Perkin Elmer*, si adoperano cuvette di quarzo in cui viene inserita la soluzione da analizzare, la lunghezza d'onda dei fotoni è compresa tra 190 nm e 750 nm.

L'acido tranexamico non risulta visibile nello spettro UV-Visibile ed è quindi necessario trattare la soluzione con ninidrina. Essa assumerà una tonalità di viola visibile dallo strumento con un picco di assorbimento a circa 570 nm [62].

La ninidrina (2,2-dihydroxyindene-1,3-dione), la formula di struttura è riportata nella Figura 3.5, appartiene alla classe degli idanoni e viene impiegato come indicatore di colore; si presenta come cristalli o polvere di colore giallo o giallo pallido [66].

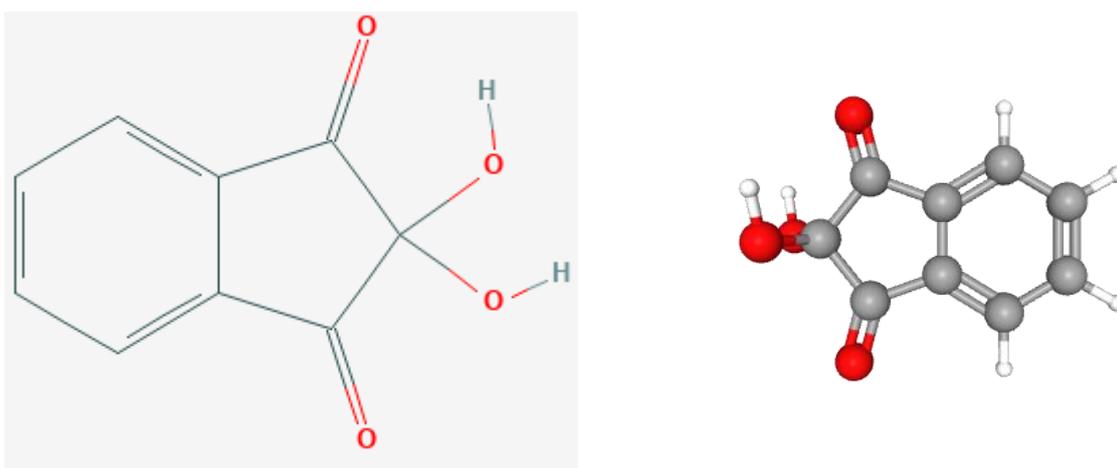


Figura 3.5: Formula di struttura 2D e 3D della ninidrina [66].

Per lo svolgimento delle analisi abbiamo utilizzato la procedura proposta da Ansari et al. [62] che prevede di aggiungere alla soluzione da analizzare 2 ml di una soluzione di ninidrina allo 0,2% in metanolo e 1 ml di buffer fosfato a pH 8.0. La miscela così ottenuta va mantenuta per 20 minuti a 90 ± 5 °C in un bagno d'olio per permettere la reazione della ninidrina, riportata in Figura 3.6.

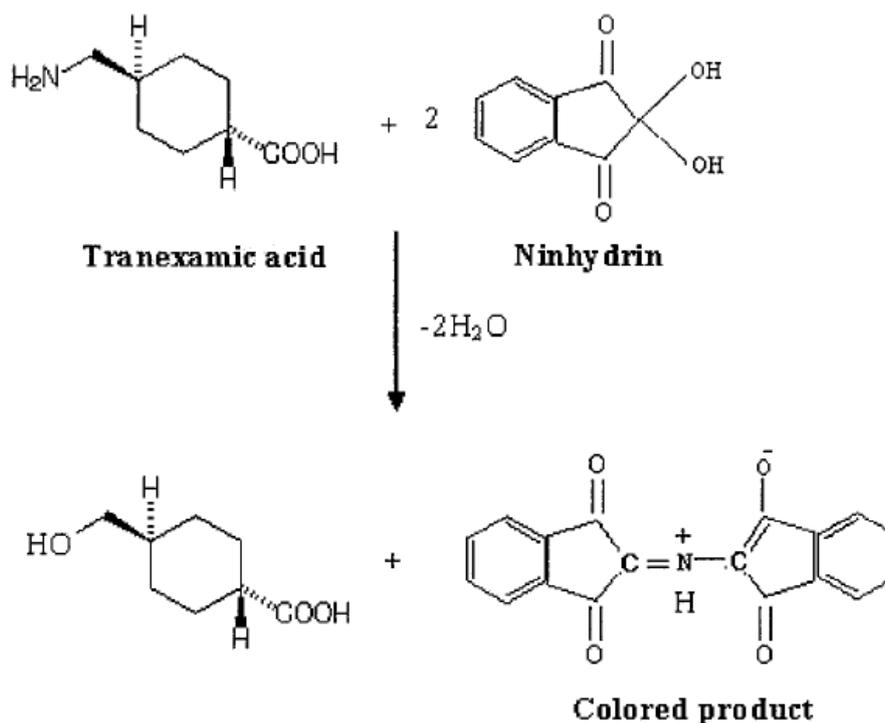


Figura 3.6: Reazione di ninidrina e acido tranexamico [62].

Una volta raffreddata si porta il volume della miscela a 10 ml con acqua deionizzata per poi trasferire il tutto in una cuvetta. Si osserverà a questo punto un cambiamento di colore della soluzione che assumerà una tonalità di viola tanto più scura quanto maggiore sarà la concentrazione di TXA.

Per il bianco si procede miscelando 1 ml di buffer e 2 ml di metanolo, riscaldando poi il tutto per 20 minuti a 90 °C per poi raffreddarlo e infine si porta il volume a 10 ml con acqua deionizzata.

Risulta quindi necessario preparare una retta di taratura analizzando campioni a concentrazione nota di acido tranexamico dopo trattamento con ninidrina per determinare la loro assorbanza. Si parte da una soluzione madre di acido tranexamico 1 mg/ml in acqua deionizzata per realizzare le soluzioni figlie da studiare. Nella Tabella 3.1 sono riportate concentrazioni utilizzate e le assorbanze ottenute.

Tabella 3.1: Concentrazioni e assorbanze ottenute delle soluzioni figlie di TXA in acqua deionizzata.

Concentrazione (µg/ml)	Assorbanza
0	0
1	0,04043
3	0,09750
5	0,18554
10	0,40825

Dalla Tabella 3.1 si procede con un'interpolazione lineare per ottenere la retta di taratura vera e propria, riportata in Figura 3.7.

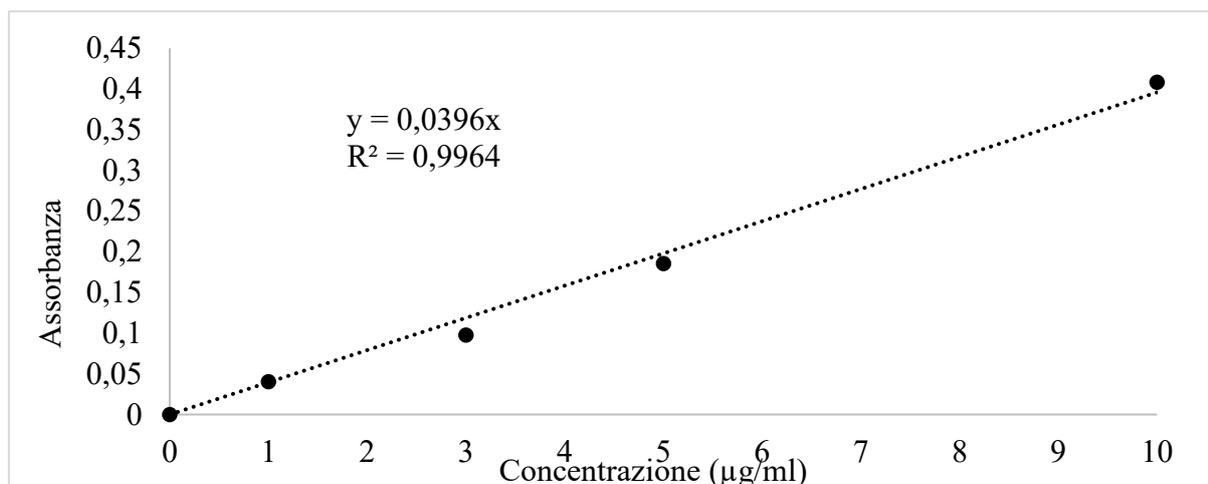


Figura 3.7: Prima retta di taratura di acido tranexamico in acqua deionizzata.

Ottenuta l'equazione della retta interpolante $y = 0,0396x$ sarà possibile determinare la concentrazione di farmaco presente nei vari prelievi effettuati nei rilasci, descritti nel capitolo 4, inserendo l'assorbanza osservata come y e ottenendo la concentrazione come x. Per ricavare la quantità effettiva dovremo poi considerare i diversi fattori di diluizione applicati nel processo e i volumi delle soluzioni riceventi.

Nel caso del rilascio con cella di Franz viene analizzata anche la fase donatrice, la grande assorbanza del campione ha richiesto di aggiungere un punto alla retta di taratura, 20 mg/ml con assorbanza 0,87423. La nuova retta è riportata in Figura 3.8.

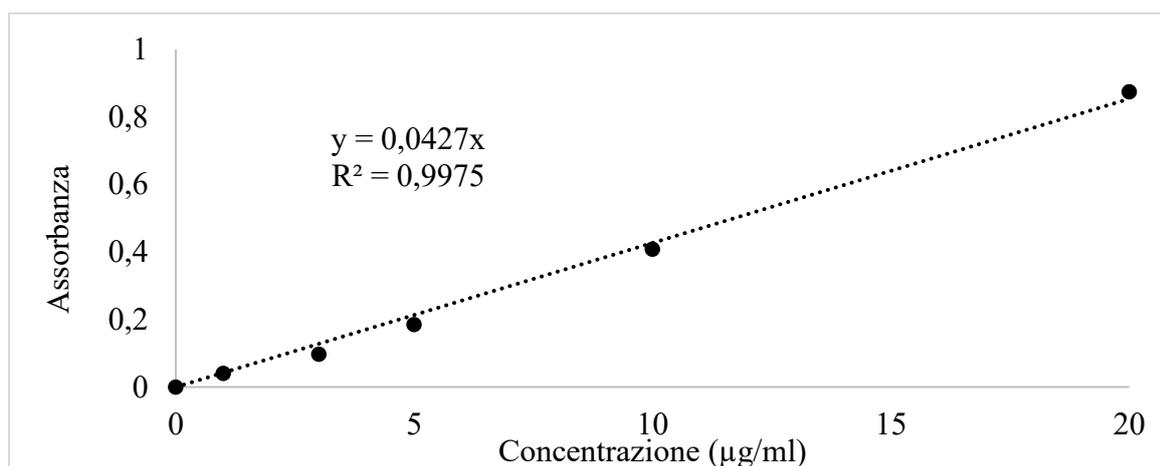


Figura 3.8: Seconda retta di taratura di acido tranexamico in acqua deionizzata.

La nuova retta interpolante è $y = 0,0427x$ e viene impiegata solo per analizzare i campioni ottenuti dalla cella di Franz.

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

La microscopia a scansione elettronica a emissione di campo permette di osservare direttamente la morfologia delle particelle e ricavare indirettamente la loro dimensione media.

Per la caratterizzazione è stato usato *FESEM FEI QUANTA 200F*, le immagini ottenute hanno scale diverse: 50 μm , 10 μm , 5 μm , 2 μm e 1 μm ; che corrispondono ad ingrandimenti che vanno da 1.000 X a 50.000 X. Per il campione utilizzato non è stato necessario ricorrere alla metallizzazione.

4. Risultati

La sintesi ha prodotto circa 2 g di silice dopo la calcinazione. Di questi, 300 mg sono stati impregnati, come descritto nella sottosezione 3.2.2, per essere caratterizzati e utilizzati nei test di rilascio.

4.1 Caratterizzazione della Silice non impregnata (MSM)

Come già anticipato nella sezione 4.3 per la caratterizzazione della silice mesoporosa, Mesoporous Silica Microspheres (MSM), sono stati utilizzati: Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM), Diffrazione a Raggi X (XRD), Fisisorbimento di azoto e Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR).

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

Le particelle di silice mesoporosa sintetizzate secondo la procedura riportata nella sottosezione 3.2.1 sono state analizzate con la tecnica FESEM ottenendo le immagini riportate in Figura 4.1.

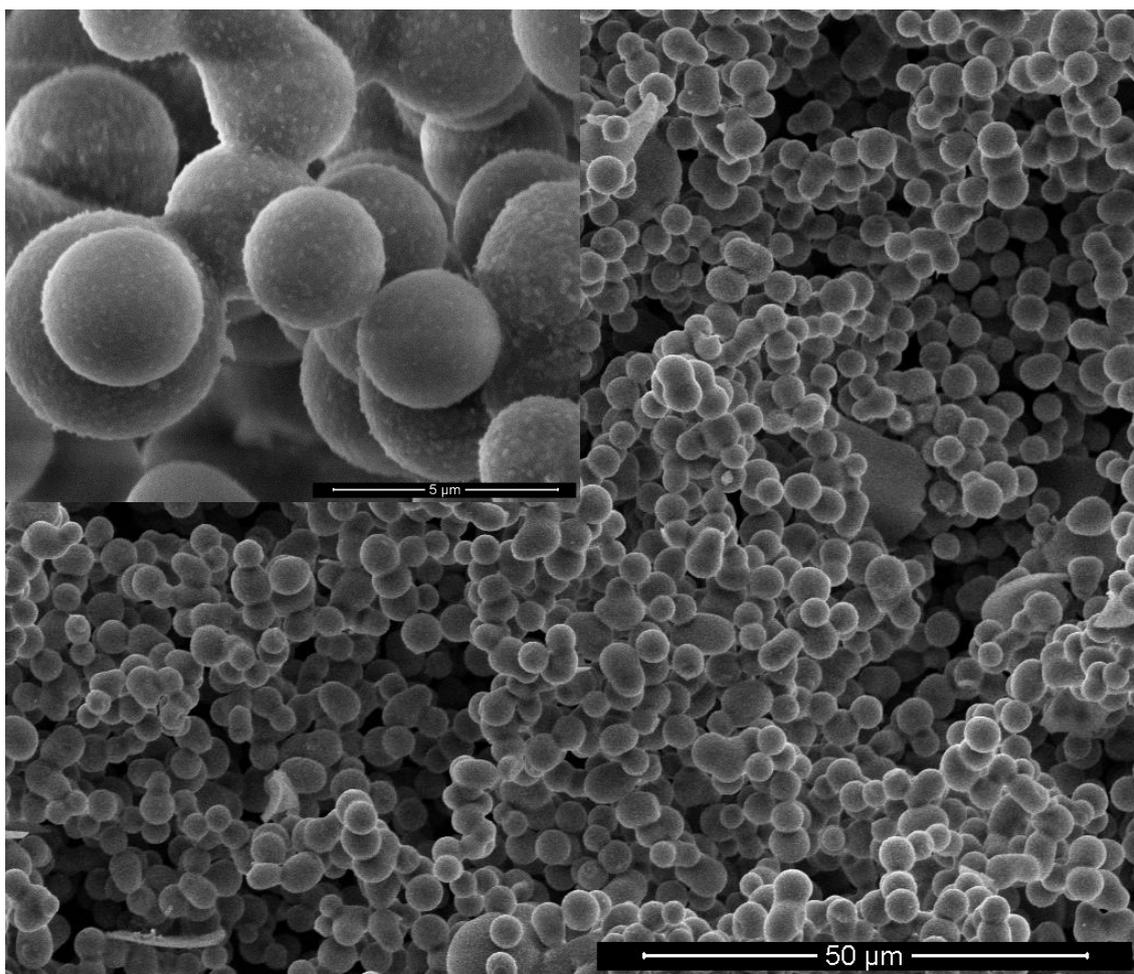


Figura 4.1: Immagini delle particelle di silice ottenute tramite FESEM, scala a 50 μm (ingrandimento 1.000 X) e ingrandimento in scala 5 μm (ingrandimento 10.000 X).

Dalle immagini si vede chiaramente la morfologia sferica delle particelle che conferma i risultati precedentemente riportati da Wang et al. [15]. Avendo dimensione dell'ordine di grandezza dei micrometri le particelle possono essere chiamate microsfe.

Utilizzando il software ImageJ [67] si è valutata la dimensione media delle particelle in quanto è risultato chiaro che non avessero una dimensione uniforme. È stato calcolato il diametro di 73 particelle identificate in tre ingrandimenti in scala 10 μm (ingrandimento 5.000 X) ottenuti dall'immagine in scala 50 μm riportata in Figura 4.1. Si è ottenuto un diametro medio di circa 3 μm e una distribuzione della dimensione riportata in Figura 4.2, nella quale si osserva un massimo per particelle di taglia compresa tra 3,25 e 3,5 μm e un massimo secondario per particelle di taglia compresa tra 2 e 2,25 μm .

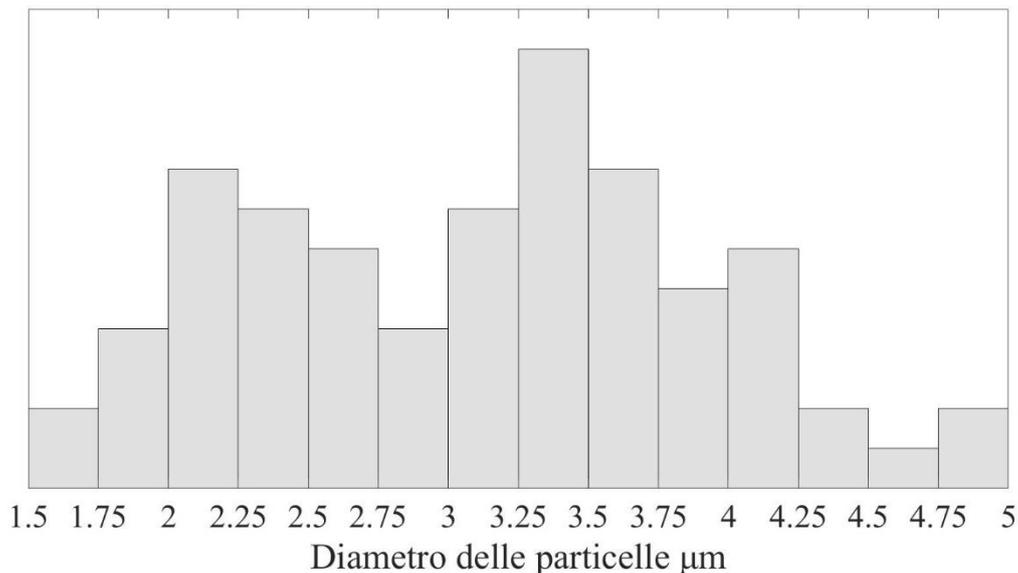


Figura 4.2: Distribuzione della dimensione (diametro in μm) delle particelle di silice.

4.1.2 Diffrazione a raggi X (XRD)

Per confermare che le particelle siano composte da silice amorfa è stata impiegata la diffrazione a raggi X ad alti angoli (2θ compreso tra 5° e 60°) ottenendo lo spettro riportato in Figura 4.3.

Nello spettro non sono presenti i picchi caratteristici di una struttura cristallina confermando di aver ottenuto una silice amorfa.

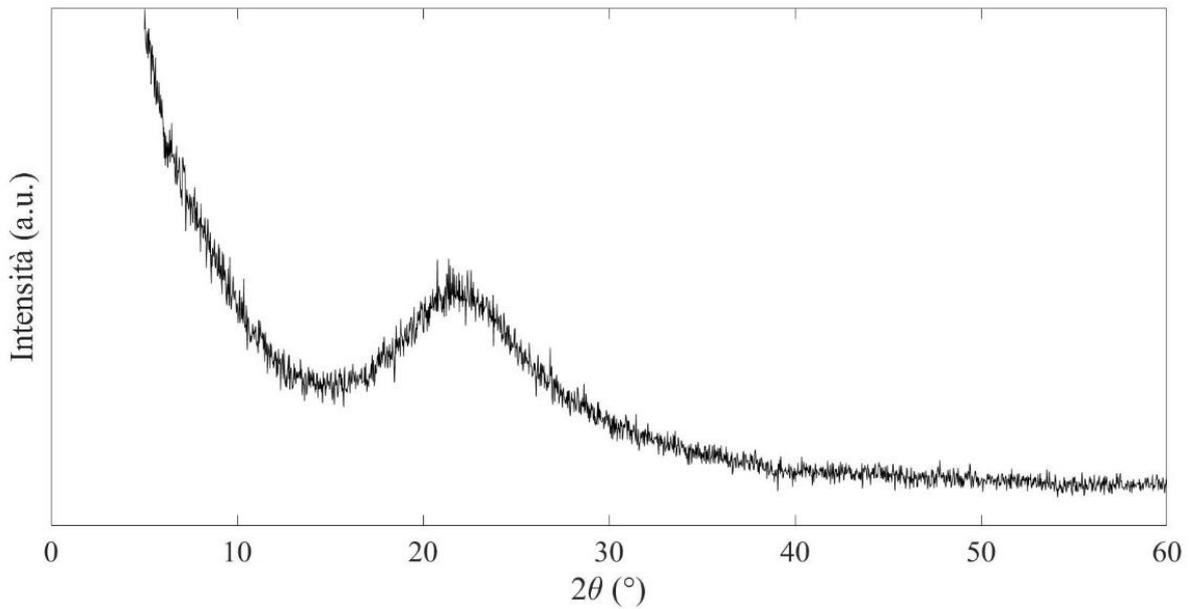


Figura 4.3: Spettro XRD ad alti angoli della silice non impregnata (MSM).

4.1.3 Fisisorbimento di azoto

Dal fisisorbimento di azoto è ottenuta l'isoterma riportata in Figura 4.4.

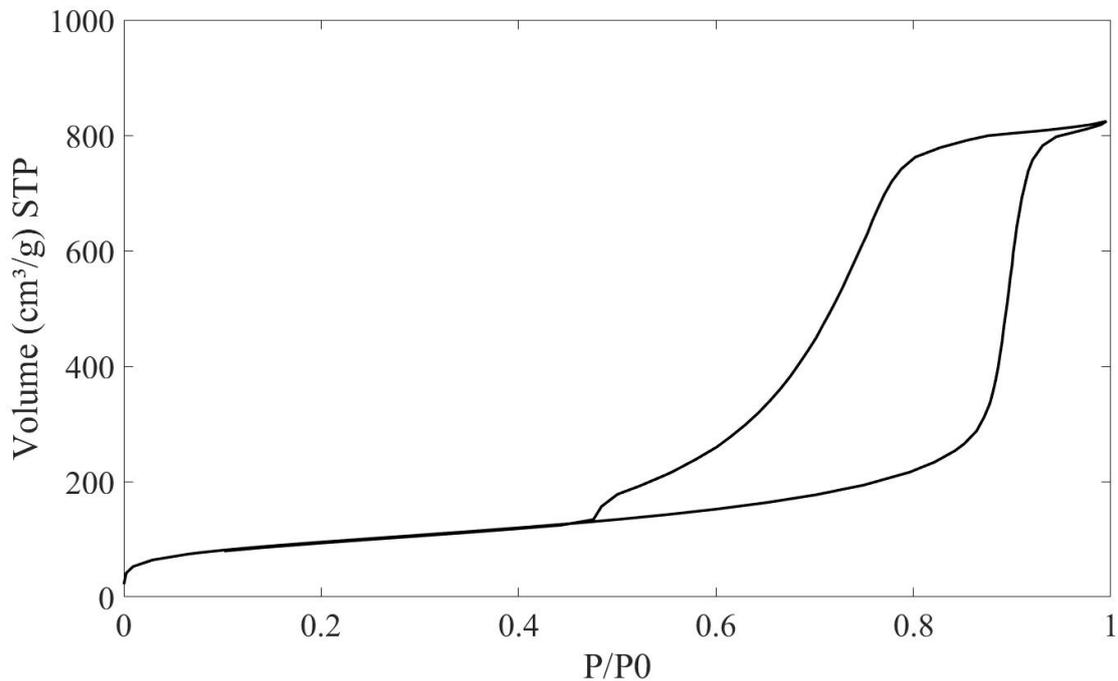


Figura 4.4: Isotherme di adsorbimento e desorbimento della silice non impregnata.

Le curve appartengono chiaramente ad un'isoterma di tipo IV, quindi ad un materiale mesoporoso [63]. Il coppia di isteresi può essere ricondotto al tipo H5 [63]. Un coppia di isteresi H5 è caratteristico di materiali con una struttura porosa disordinata e disomogenea che presenta sia pori liberi sia pori parzialmente ostruiti (a "collo di bottiglia").

Per la determinazione della distribuzione dei pori e la loro dimensione media si è ricorso ai modelli BJH e DFT per ottenerne un limite superiore ed uno inferiore a quella che può essere la dimensione reale dei pori.

La distribuzione ottenuta con il modello BJH è riportata in Figura 4.5.

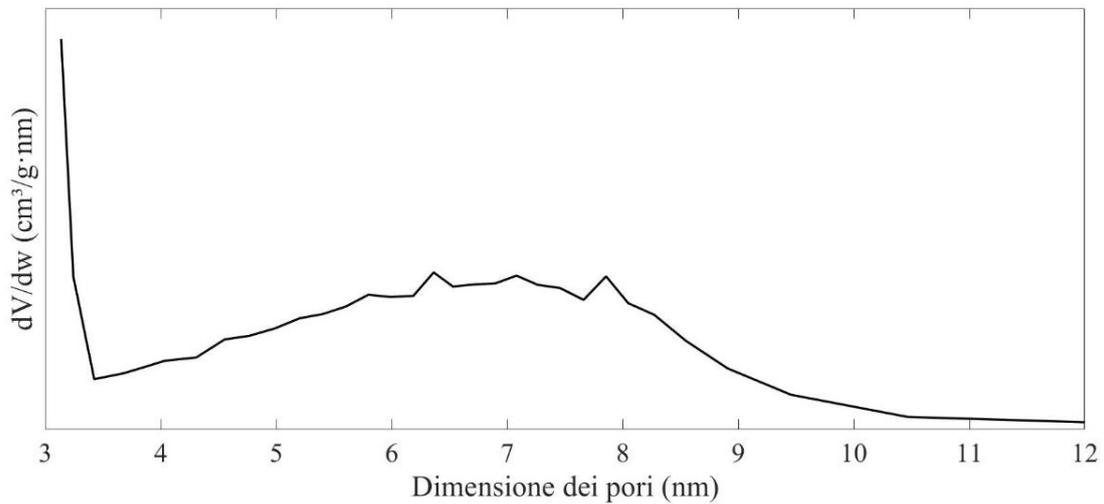


Figura 4.5: Distribuzione dei pori ottenuta applicando il metodo BJH sul ramo di desorbimento.

La distribuzione dei pori ottenuta sul ramo di desorbimento evidenzia la presenza di pori eterogenei con diametro compreso tra 4 e 9 nm. Il diametro medio può essere stimato intorno a 7 nm.

La distribuzione dei pori ottenuta tramite il modello DFT è riportata in Figura 4.6. Si osserva una distribuzione unimodale con il picco centrato a circa 25 nm.

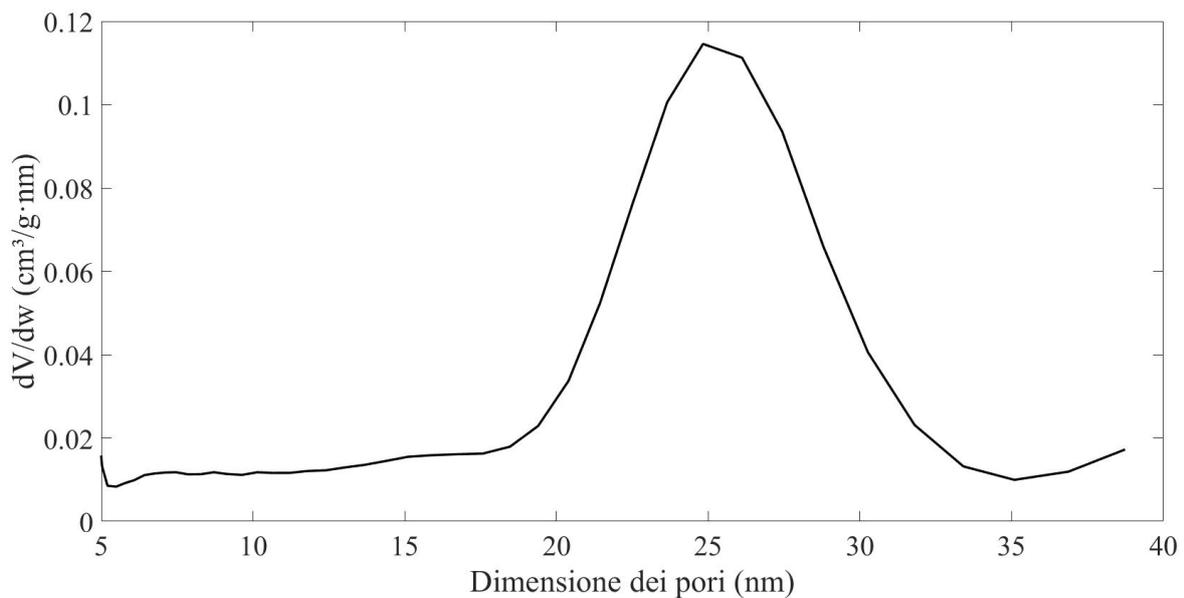


Figura 4.6: Distribuzione della dimensione dei pori ottenuta tramite modello DFT.

La dimensione dei pori risultante dal modello BJH sulla retta di desorbimento e quella risultante dal modello DFT sono estremamente diverse, la dimensione media può essere assunta maggiore di 7 nm e minore di 25 nm.

Per maggiore accuratezza si è ricorso ad un secondo strumento, il Quantachrome, per ottenere un'ulteriore distribuzione dei pori dal modello DFT. Il valore ottenuto per il diametro medio dei pori di 12,5 nm.

Applicando la teoria BET all'isoterma si ottengono area superficiale specifica (SSA_{BET}) e volume dei pori, riportati nella Tabella 4.1 insieme a un valore indicativo del diametro medio dei pori.

Tabella 4.1 Risultati ottenuti dal fisisorbimento di azoto.

Campione	SSA_{BET} (m ² /g)	Volume pori (cm ³ /g)	Dimensione dei pori (nm)
MSM	342	1,27	> 12

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

In Figura 4.7 è riportato lo spettro FT-IR delle microsfele di silice mesoporosa. Si osserva una prima banda a 3740 cm⁻¹ caratteristica della vibrazione dei silanoli isolati ($-Si-OH$) presenti sulla superficie del materiale. Intorno a 3500 cm⁻¹ è presente una banda larga causata dallo stretching di silanoli interagenti per legame a idrogeno [64]. Le tre bande sotto 2200 cm⁻¹ sono dovute alle armoniche dei modi di reticolo dovuti ai tetraedri SiO₄.

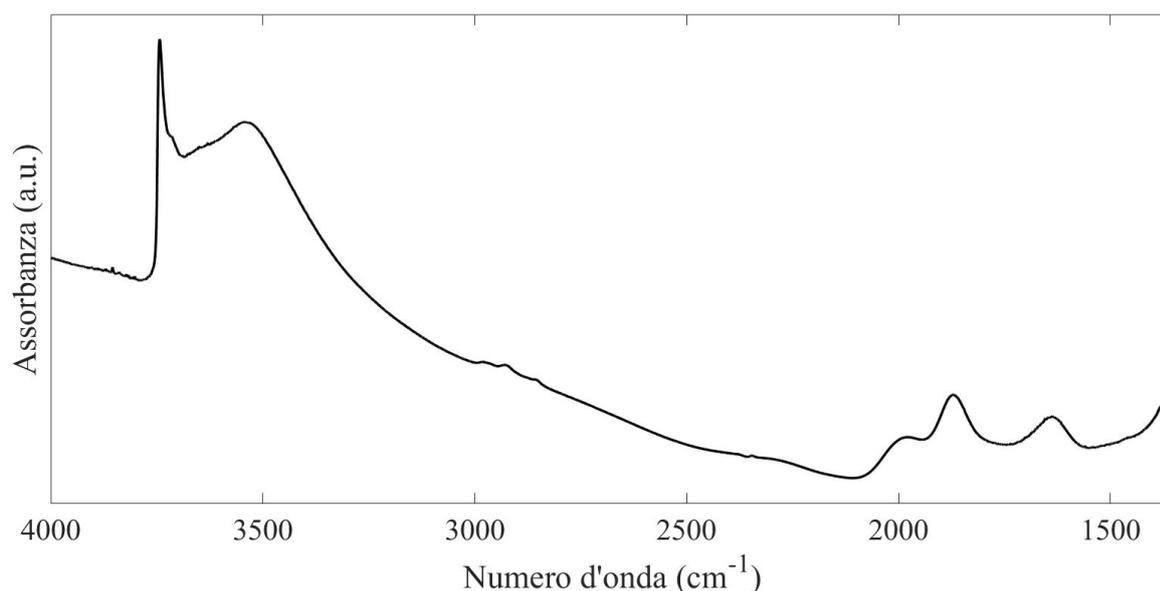


Figura 4.7: Spettro FT-IR del campione di mesosfere di silice mesoporosa (MSM).

4.2 Caratterizzazione della silice impregnata (TXA@MSM)

Per la caratterizzazione della microsfere di silice mesoporosa impregnata con il 5% w/w di TXA (chiamata TXA@MSM) sono stati impiegati: Analisi Termogravimetrica (TGA), Diffrazione a Raggi X (XRD), Fisisorbimento di azoto, Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR).

4.2.1 Analisi Termogravimetrica (TGA)

La TGA evidenzia una perdita di massa tra i 100°C e i 150°C a causa dell'evaporazione dell'umidità residua nel campione, l'acido tranexamico si degrada invece per temperature superiori a 150°C ed è tutto degradato entro i 600°C. La perdita di peso di MSM tra 150°C e 600°C è dovuta alla perdita di silanoli dalla superficie della silice e ammonta a circa lo 0,49% w/w, la perdita di massa di TXA@MSM nello stesso intervallo è invece 5,18% w/w e comprende sia la perdita dei silanoli sia dell'acido tranexamico. Sottraendo la perdita percentuale di MSM a quella di TXA@MSM, rimuovendo così in maniera approssimativa il contributo della perdita dei silanoli, si ottiene una diminuzione di circa il 4,7% della massa totale della silice impregnata. Il valore di 4,7% w/w è in accordo con il contenuto nominale di 5% w/w che si è voluto ottenere mediante impregnazione e rappresenta un risultato soddisfacente. Il profilo della TGA è riportato in Figura 4.8.

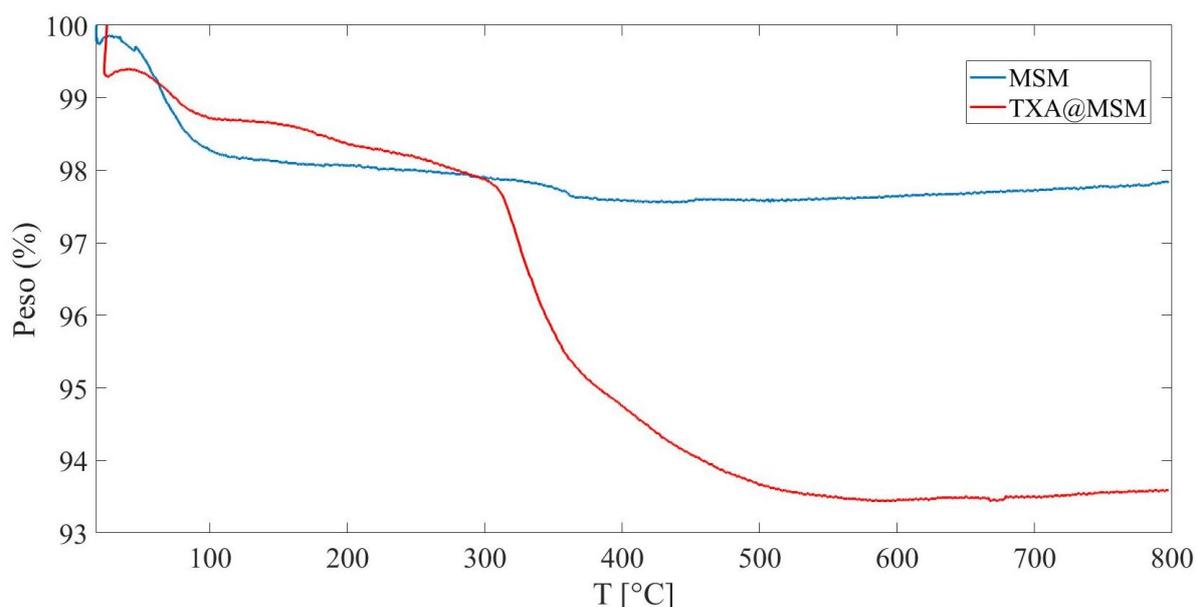


Figura 4.8: Curve termogravimetriche del campione di silice non impregnata (MSM) in blu e del campione di silice impregnata (TXA@MSM) in rosso

4.2.2 Diffrazione a raggi X (XRD)

Lo spettro XRD ad alti angoli riportato in Figura 4.9 non presenta nuovi picchi che rivelino una struttura cristallina, evidenziando che il farmaco è presente allo stato amorfo all'interno della silice.

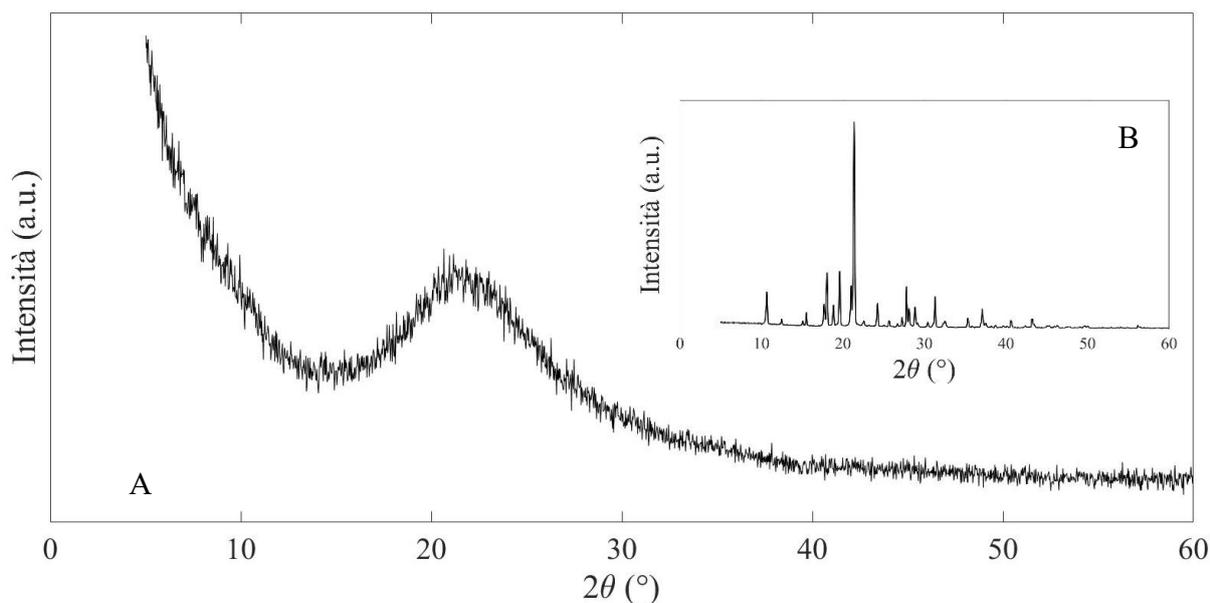


Figura 4.9: Spettro XRD ad alti angoli della silice impregnata (TXA@MSM) A e dell'acido tranexamico in polvere B.

4.2.3 Fisisorbimento di azoto

In Figura 4.10 sono riportate entrambe le coppie di isoterme ottenute analizzando sia MSM sia TXA@MSM. È facilmente osservabile che non vi sono cambiamenti rilevanti in seguito all'impregnazione con il farmaco. Si tratta sempre di un isoterma di tipo IV con un coppia di isteresi di tipo H5, avremo sempre una parte dei pori con l'ingresso parzialmente ostruito [63].

Sono riportate le distribuzioni della dimensione dei pori ottenute con il metodo BJH in Figura 4.11 sia di MSM sia di TXA@MSM. Le differenze tra le due distribuzioni sono trascurabili.

Nella Figura 4.12 è invece riportata la distribuzione delle dimensioni dei pori ottenuta con il metodo DFT per i due campioni. Anche qui le variazioni sono trascurabili.

La superficie specifica delle mesosfere è riportata insieme al volume dei pori nella Tabella 4.2. Dal confronto con la silice tal quale si può vedere una diminuzione della SS_{ABET} e del volume dei pori che testimoniano l'effettiva deposizione del farmaco sulla superficie interna dei pori. Questi dati, insieme all'evidenza di una trascurabile variazione della distribuzione dei pori, alla luce dell'elevato valore della loro dimensione media, suggeriscono che le molecole di TXA siano distribuite omogeneamente sulla superficie interna dei mesopori. È inoltre importante notare che non si osservano nuovi fenomeni di occlusione dei pori dovuti alla presenza delle molecole di farmaco.

Tabella 4.2: Superficie specifica (SSA_{BET}) e volume dei pori ottenute tramite l'applicazione della teoria BET alla silice non impregnata (MSM) e a quella impregnata con il farmaco (TXA@MSM).

Campione	SSA_{BET} (m^2/g)	Volume pori (cm^3/g)
MSM	342	1,27
TXA@MSM	325	1,22

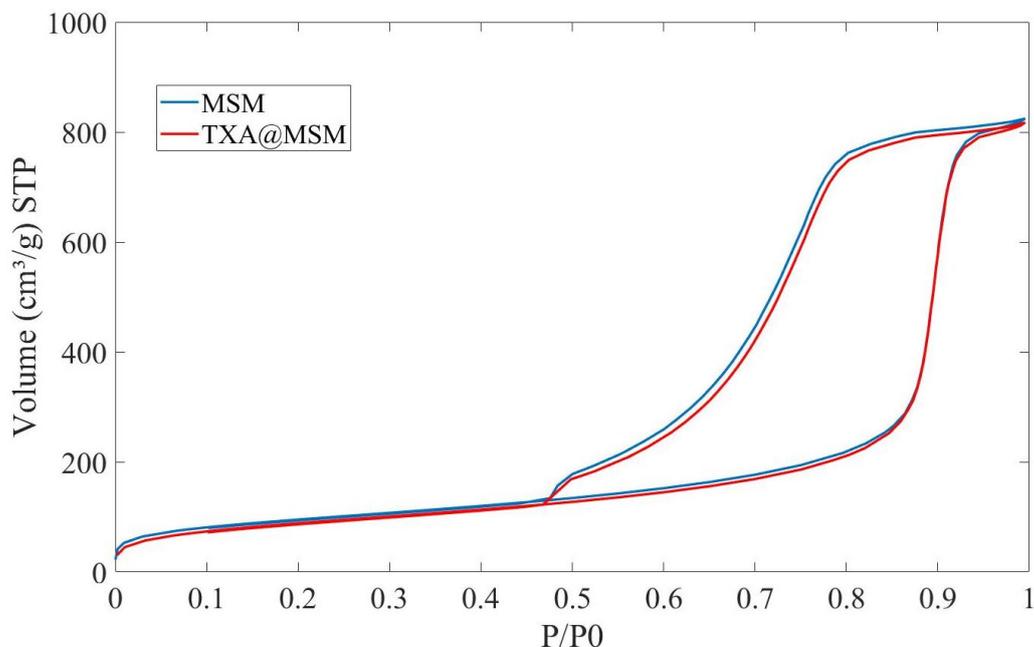


Figura 4.10: Isotherme di adsorbimento e desorbimento di un campione di silice non impregnata (MSM) in blu e di uno di silice impregnata (TXA@MSM) in rosso.

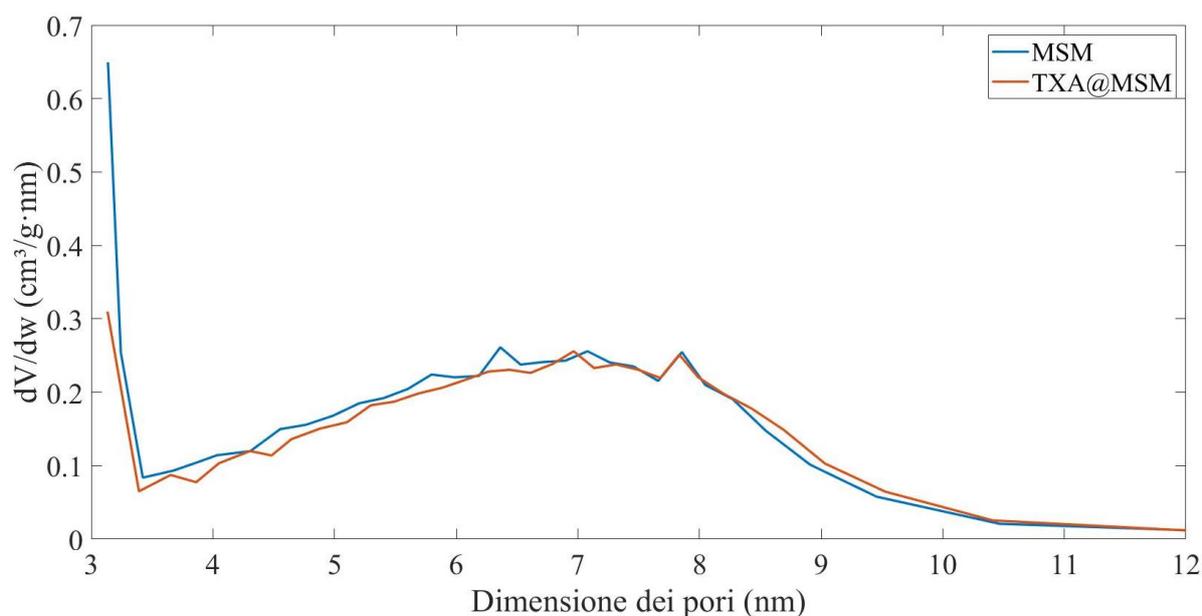


Figura 4.11: Distribuzioni della dimensione dei pori di silice impregnata (TXA@MSM), in rosso, e non impregnata (MSM), in blu, ottenute con il metodo BJH applicato al ramo in desorbimento.

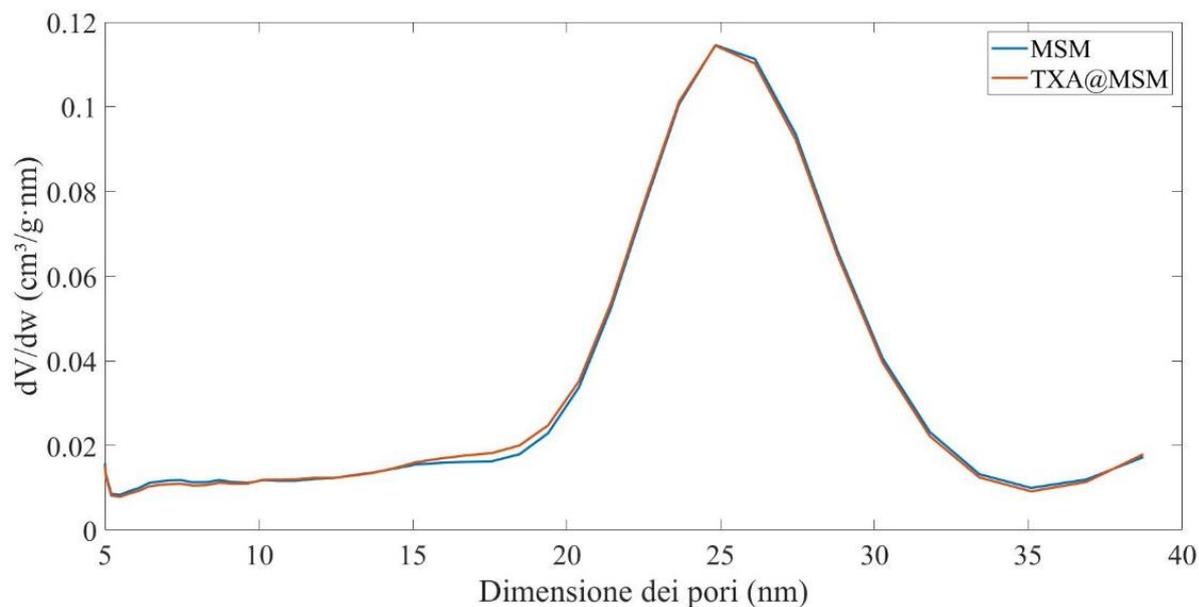


Figura 4.12: Distribuzioni della dimensione dei pori di silice impregnata (TXA@MSM), in rosso, e non impregnata (MSM), in blu, ottenute con il metodo DFT.

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

Dallo spettro FT-IR si osserva la presenza dell'acido tranexamico, testimoniata dalle nuove bande che compaiono nello spettro riportato nella Figura 4.13.

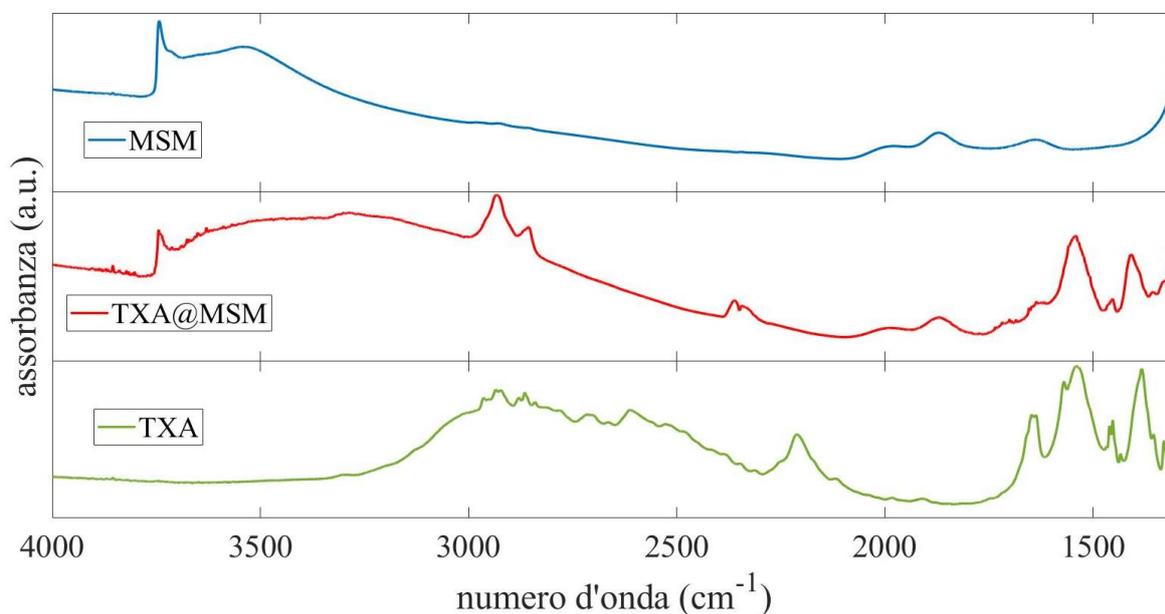


Figura 4.13: Spettri FT-IR della silice non impregnata (MSM) in blu, non impregnata (TXA@MSM) in rosso e acido tranexamico in KBr in verde.

Nello spettro FT-IR relativo alla silice impregnata la banda caratteristica dei silanoli isolati a 3740 cm^{-1} risulta meno intensa, ciò suggerisce l'interazione tra le molecole del farmaco e i silanoli sulla superficie della silice mediante legame a idrogeno. Coerentemente, tra 3700 cm^{-1} e 2500 cm^{-1} , si osserva un ampio assorbimento attribuito alla vibrazione di specie OH e NH impegnate in legami idrogeno. I picchi tipici dell'acido tranexamico sono visibili a numeri d'onda minori di 1800 cm^{-1} . In particolare si osservano deboli bande a 1710 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , assegnate rispettivamente al stretching del carbonile e al bending dell'amminogruppo delle molecole di TXA. Bande più intense si osservano a numeri d'onda sotto 1600 cm^{-1} (1540 cm^{-1} , 1410 cm^{-1}) attribuite alla forma zwitterione dell'acido tranexamico (gruppo $-NH_3^+$, gruppo carbossilato) [64]. I due picchi intorno a 2932 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} sono caratteristici dei $-CH_2-$ presenti nell'anello alchilico centrale dell'acido tranexamico [64].

4.3 Rilasci

Sono state effettuate tre differenti prove di rilascio, due tramite semplice dissoluzione della polvere in acqua deionizzata e la terza mediante cella di Franz.

4.3.1 Test di dissoluzione

I dati dei due rilasci, svolti nelle medesime condizioni, sono riportati nella Tabella 4.3 e nella Tabella 4.4. Per maggiore chiarezza si traducono le percentuali rilasciate in funzione del tempo di prelievo (calcolate rispetto alla quantità presente nel materiale) in un diagramma, Figura 4.14.

Tabella 4.3: Risultati del primo test di dissoluzione di TXA@MSM in acqua deionizzata.

Tempo (h)	Assorbanza	Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	TXA (μg)	%
0	0	0	0	0
0,5	0,07106	35,89	1077	71,78
1	0,09178	46,35	1391	92,81

Tabella 4.4: Risultati del secondo test di dissoluzione di TXA@MSM in acqua deionizzata.

Tempo (h)	Assorbanza	Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	TXA (μg)	%
0	0	0	0	0
0,5	0,08097	40,89	1227	81,79
1	0,09004	45,47	1364	90,95

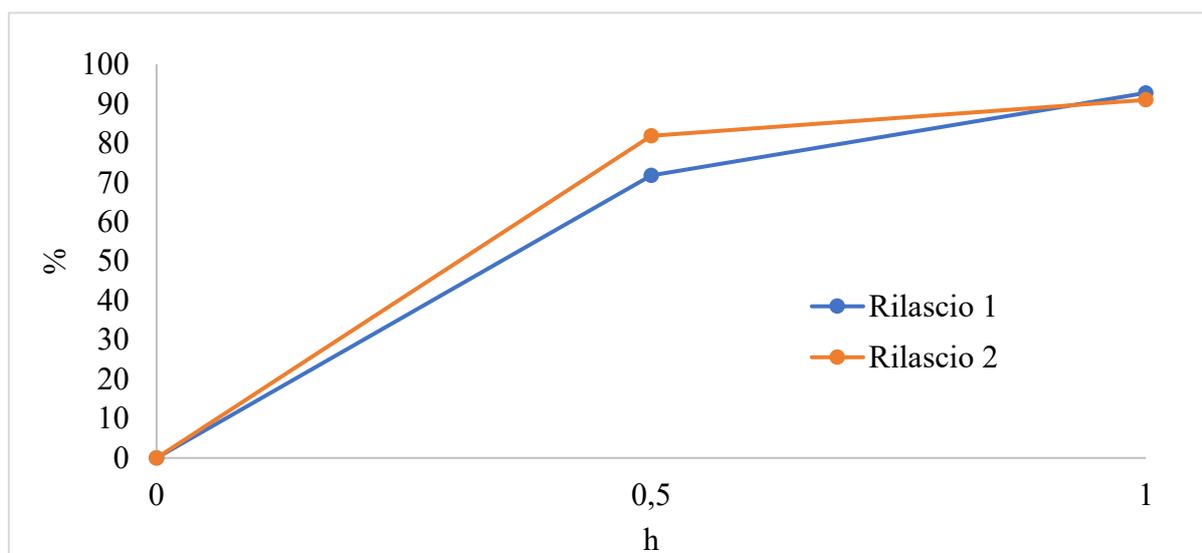


Figura 4.14: Diagramma che riporta la percentuale di acido tranexamico rilasciato ai diversi tempi di prelievo nel primo test di dissoluzione in blu e nel secondo test in arancione

Nel primo test ad un'ora la quantità rilasciata di acido tranexamico è il 92,81%, la quasi totalità dei 15 mg che sono stati caricati dentro la silice, questo è un ottimo risultato poiché, come detto nella sezione 1.3, la massima efficacia del TXA si raggiunge se esso viene somministrato entro un'ora dall'evento traumatico. Questo rapido rilascio è quindi adatto all'impiego in situazioni di primo soccorso.

I due rilasci hanno dato risultati molto simili, il secondo presenta un rilascio maggiore nella prima mezz'ora, un incremento rispetto al primo test di poco meno del 10%, mentre ad un'ora i risultati sono molto simili con il primo campione che ha rilasciato circa il 2% in più.

Tenendo conto dell'assenza di pubblicazioni riguardanti l'adsorbimento di acido tranexamico su silici mesoporose, questi risultati possono essere confrontati in certa misura con quelli ottenuti dall'impregnazione di particelle diverse con acido tranexamico.

Li et al. [17] riportano l'impregnazione di microparticelle composite di chitosano/alginate con 2% w/w di TXA che svolgono il ruolo, come nel nostro caso, di agenti emostatici in situazioni di primo intervento. Il test di rilascio è stato eseguito tramite immersione delle particelle in PBS (pH 7,4) a 37°C e sotto agitazione. Il profilo del rilascio è riportato in Figura 4.15. Osservando la curva "A" si nota un rapidissimo rilascio (specialmente rispetto a quello di TXA@MSM), dopo un minuto si raggiunge la presenza in soluzione del 64% dell'acido tranexamico impregnato inizialmente e dopo tre minuti viene raggiunto il massimo del 88%.

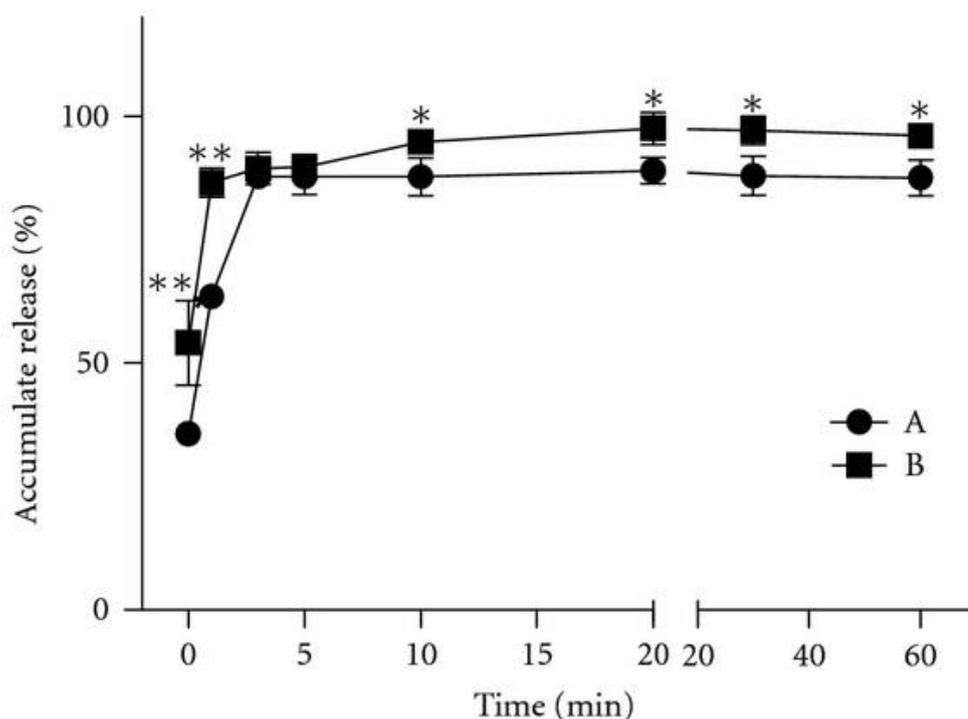


Figura 4.15: Diagramma che riporta il profilo del rilascio di particelle composite di chitosano/alginate in PBS pH 7,4 (A) e in plasma sanguigno anticoagulato (B) [17].

Sarda et al. [60] hanno impregnato idrossiapatite con il 3% w/w di acido tranexamico, in questo caso l'obiettivo è realizzare un materiale emostatico che abbia un'azione più prolungata da utilizzare per applicazioni ortopediche o dentali. Anche in questo caso viene impiegato PBS come medium in una cella a flusso continuo con cella di diametro 12 mm (6 ml) e una pompa a pistone. In Figura 4.16 è riportato il profilo di rilascio ottenuto dagli autori della pubblicazione. Il rilascio è particolarmente più lento rispetto a TXA@MSM, nelle prime sei ore viene rilasciato il 20% dell'acido tranexamico impregnato.

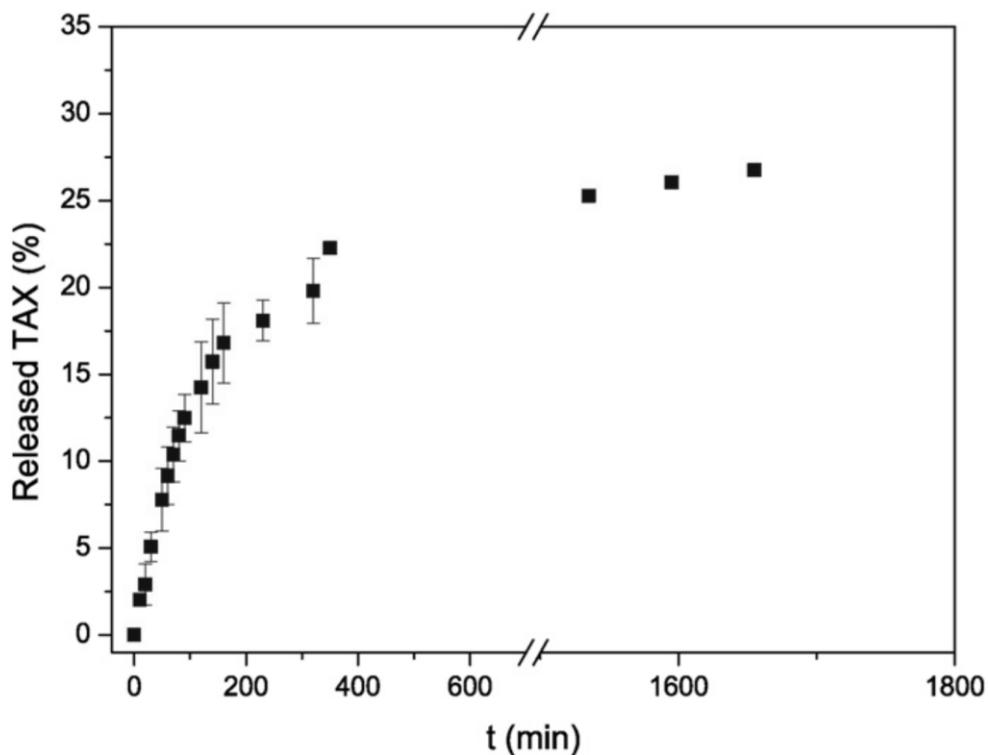


Figura 4.16: Diagramma che riporta la percentuale di TXA, rispetto a quella presente nel campione post impregnazione, rilasciata in PBS da idrossiapatite in cella a flusso continuo [60].

Spugne di alginato e alginato-ialuroniche, entrambe impregnate con TXA 2% w/v, sono state invece studiate da Catanzano et al. [68] per essere impiegate come agenti emostatici in pratiche odontotecniche, ad esempio l'estrazione di un dente. Anche in questo caso il medium impiegato nei test di rilascio è PBS (pH 7,4), in esso le spugne vengono immerse e la temperatura è mantenuta a 37°C. I risultati del rilascio sono riportati in Figura 4.17. Si osservano tre curve riferite rispettivamente a spugne di solo alginato (ALG), alginato e acido ialuronico al 10% w/w (ALG/HA₁₀) e alginato e acido ialuronico al 20% w/w (ALG/HA₂₀). In tutti e tre i casi i rilasci sono piuttosto rapidi e nello specifico per ALG/HA₁₀ i risultati sono paragonabili a quelli ottenuti con TXA@MSM.

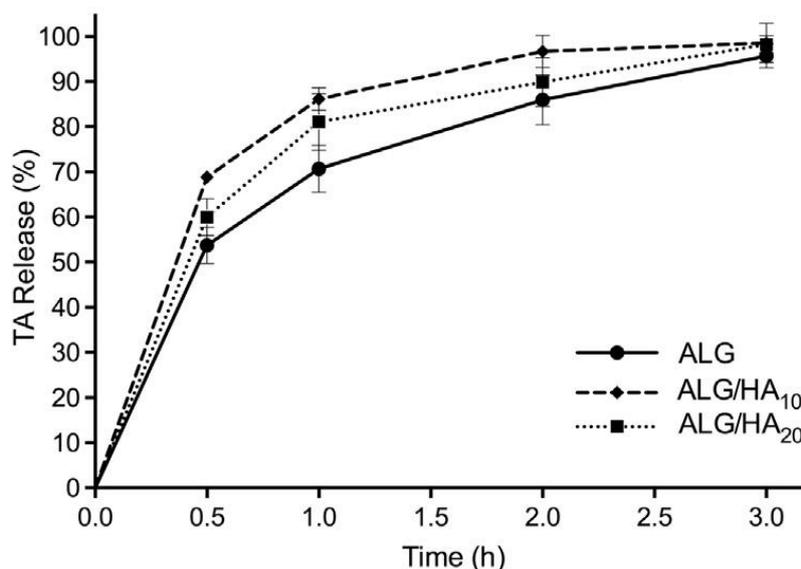


Figura 4.17: Diagramma che riporta la percentuale di TXA, rispetto a quella presente nel campione post impregnazione, rilasciata in PBS da spugne di solo alginato (ALG), alginato e acido ialuronico al 10% w/w (ALG/HA₁₀) e alginato e acido ialuronico al 20% w/w (ALG/HA₂₀) [68].

In contemporanea al secondo rilascio è stato anche predisposto un test per verificare il comportamento delle mesosfere di silice in acqua e se la presenza del farmaco potesse alterarle. La silice non impregnata (MSM) è stata immersa in acqua deionizzata nelle stesse condizioni di miscelazione, temperatura, volume e concentrazione del rilascio.

Passate quattro ore il secondo campione di rilascio per dissoluzione e il campione di silice tal quale sono stati rimossi per filtrazione ed essiccati. Sono stati poi realizzati due spettri FT-IR riportati in Figura 4.18.

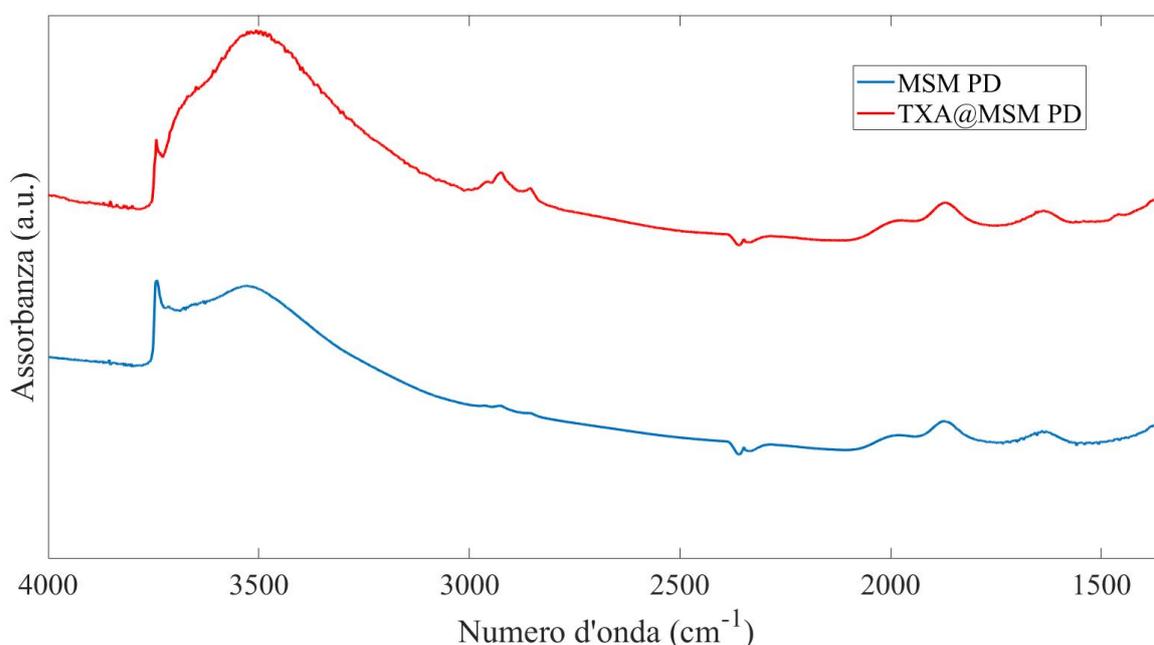


Figura 4.18: Spettri FT-IR della silice impregnata (TXA@MSM PD) in rosso e della silice non impregnata (MSM PD) in blu dopo il test di dissoluzione (Post Dissoluzione, PD).

Si può osservare che lo spettro della silice impregnata presenta la banda caratteristica dei silanoli interagenti tra 3700 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} di intensità maggiore, a indicare una modifica della superficie ovvero una sua maggiore idratazione. Inoltre, lo spettro non presenta sotto 1800 cm^{-1} i picchi relativi all'acido tranexamico.

L'evidenza di una maggiore idratazione della silice post rilascio, ovvero di una maggiore popolazione di silanoli, è un dato promettente in quanto i nuovi ossidrili superficiali potrebbero incrementare l'azione della silice verso il fattore XII della coagulazione [9]. È comunque da sottolineare che il fenomeno riguarda l'immersione del sistema TXA@MSM in acqua deionizzata, ovvero una condizione diversa da quella della reale applicazione prevista.

4.3.2 Cella di Franz

I risultati del rilascio in cella di Franz sono riportati nella Tabella 4.5, alcuni dati sono esposti in maniera grafica in Figura 4.19 e in Figura 4.20.

Tabella 4.5: Risultati del test di rilascio in cella di Franz di TXA@MSM in acqua deionizzata.

Tempo (h)	Assorbanza	Concentrazione ($\mu\text{g/ml}$)	TXA (μg)	%	% _{tot}
00min	0	0	0	0	0
00min-30min	0,03546	4,152	16,61	3,322	3,322
30min-01h	0,01499	1,755	7,021	1,404	4,726
01h-02h	0,04434	2,596	10,38	2,077	6,803
02h-03h	0,02841	1,663	6,653	1,331	8,133
03h-04h	0,01809	1,059	4,237	0,847	8,981

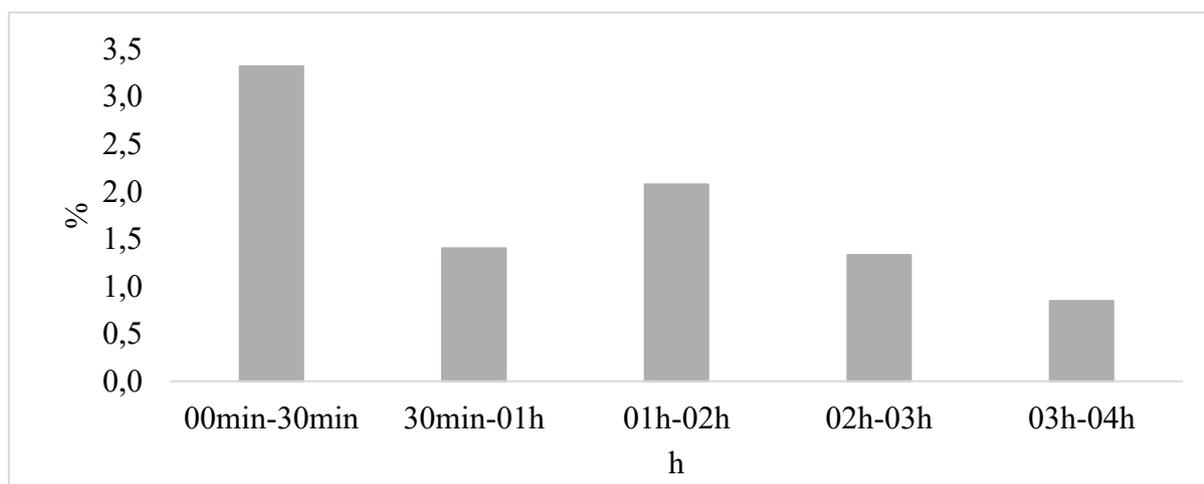


Figura 4.19: Rappresentazione della percentuale rilasciata usando cella di Franz in ogni intervallo di tempo.

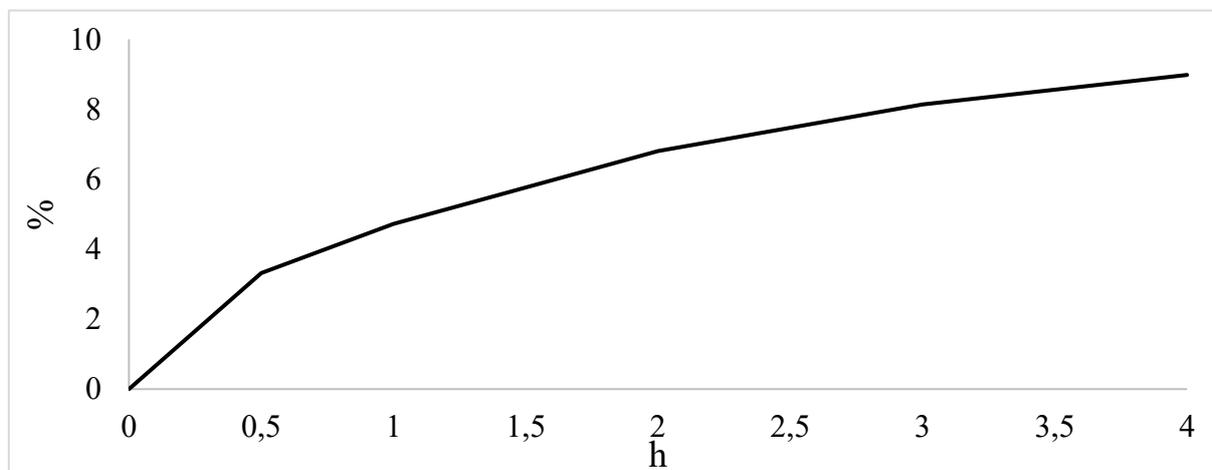


Figura 4.20: Rilascio cumulativo di TXA@MSM osservato con la cella di Franz.

Nella cella di Franz la crescita è continua anche se ben lontana dal 100%. Il farmaco si muove dalla soluzione donatrice a quella ricevente raggiungendo un rilascio finale del 8,98% in 4 ore. Dopo un'ora si raggiunge un modesto 3,32%, confrontando tale dato con quelli ottenuti dai test di dissoluzione è evidente che la membrana di nitrocellulosa offra un consistente ostacolo al passaggio del farmaco.

Caratterizzando la fase donatrice al termine delle 4 ore si osserva una concentrazione di acido tranexamico pari a circa il 94% di quella teoricamente presente nella silice impregnata. Questa quantità è stata rilasciata dalla silice, ma non ha attraversato la membrana. Il totale nelle due fasi, donatrice e ricevente, supera di poco il 100%, indicando che tutto il TXA è stato rilasciato, pur non avendo raggiunto la soluzione ricevente.

Questi dati confermano quanto osservato nel test di dissoluzione.

I risultati possono essere confrontati a grandi linee con quelli ottenuti dai test di rilascio, riportati in Figura 4.21, compiuti da Saporito et al. [59] su medicazioni spugnose composte da acetato di chitosano impregnato con 0,75% w/w di acido tranexamico. Viene impiegata una membrana di acetato di cellulosa e la cella è mantenuta termostata a 32°C, il medium è soluzione salina (NaCl 0,9% w/v).

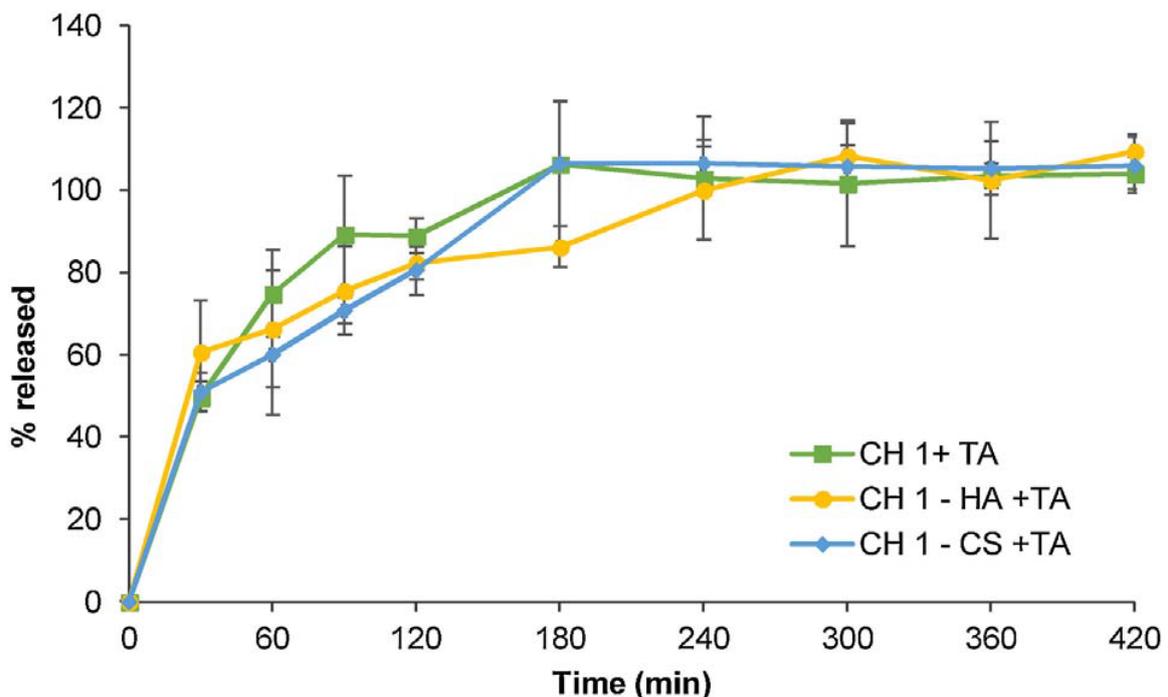


Figura 4.21: profili dei rilasci di TXA in cella di Franz di medicazioni composte da chitosano (CH 1 +TA), chitosano e acido ialuronico (CH 1 – HA + TA) e chitosano e condroitin sodio solfato bovino 100 EP (CH 1 – CS + TA) [59].

Tutti e tre i tipi di medicazione, chitosano (CH 1 +TA), chitosano e acido ialuronico (CH 1 – HA + TA) e chitosano e Condroitin sodio solfato bovino 100 EP (CH 1 – CS + TA), presentano rilasci molto più rapidi di TXA@MSM, raggiungendo circa il 100% del farmaco impregnato al raggiungere delle 4 ore. Ciò in un certo senso conferma il rilascio totale di TXA osservato con TXA@MSM, ma l'attraversamento della membrana di acetato di cellulosa (cut off di 0,45 μm) è enormemente maggiore rispetto a quello della membrana di nitrocellulosa

(cut off 12-14 kDa, circa 2-4 nm); le due membrane hanno pori la cui dimensione differisce di più di due ordini di grandezza.

Lo spettro FT-IR del campione TXA@MSM recuperato al termine del test di rilascio è riportato in Figura 4.22: non sono presenti picchi che testimonino la presenza di acido tranexamico [64] al suo interno, confermando il rilascio totale in accordo con i risultati discussi precedentemente.

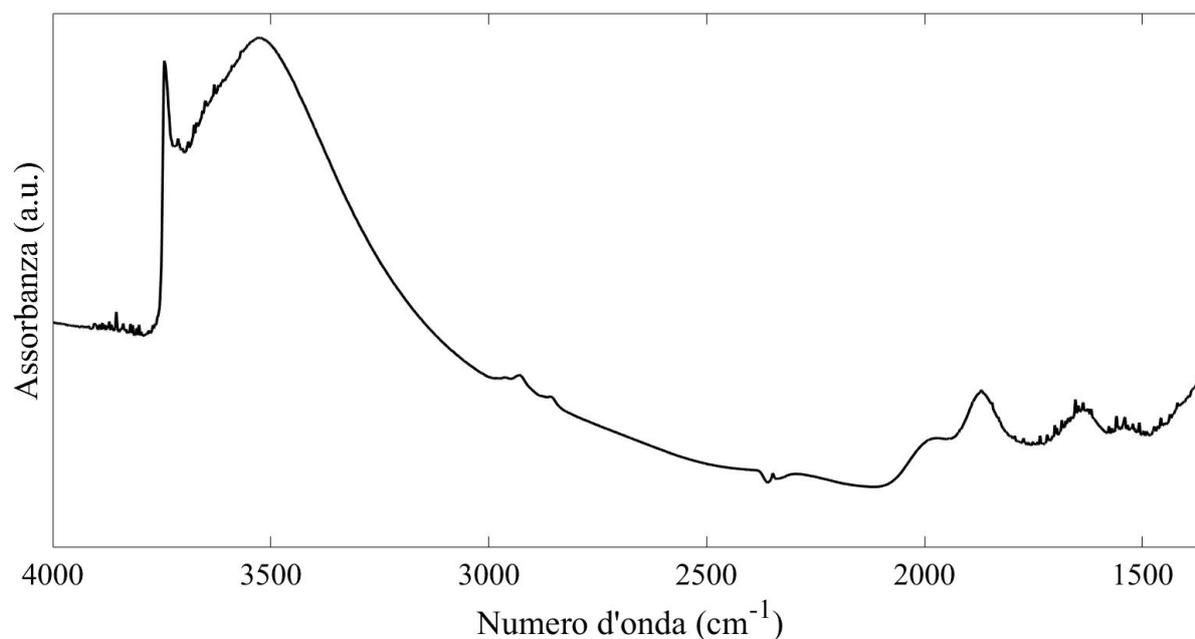


Figura 4.22: Spettro FT-IR della silice impregnata (TXA@MSM NR) dopo rilascio in cella di Franz per quattro ore in acqua deionizzata.

5. Conclusioni

L'obiettivo del lavoro di tesi è stato l'ottenimento, per la prima volta, di particelle di silice mesoporosa con pori di almeno 10 nm contenenti acido tranexamico al 5% w/w. Esse opereranno come agenti emostatici sfruttando sia la naturale azione emostatica svolta dalla silice sia rilasciando il farmaco in meno di un'ora in modo che esso eserciti efficacemente la sua azione stabilizzante dei coaguli, aumentando sensibilmente la sopravvivenza dei soggetti.

Il progetto è innovativo poiché in letteratura non sono stati trovati casi di impregnazione di silice con acido tranexamico. Sono presenti invece studi riguardanti silici contenenti altri farmaci emostatici [19] o l'impiego di acido tranexamico caricato in supporti diversi dalla silice, ad esempio particelle di chitosano/alginato [17] o di amido [18].

Si è scelto di impiegare silici con pori di almeno 10 nm prendendo come riferimento il lavoro di Chen et al. [8]. Questi autori hanno verificato che per le silici mesoporese è l'incremento della dimensione dei pori, non quella delle particelle, ad incidere sulla capacità del materiale di favorire la coagulazione del sangue. Pori grandi riducono i tempi di coagulazione e inducono coaguli più resistenti.

Si è deciso di impiegare il processo di sintesi descritto da Wang et al. [15], che permette di ottenere particelle sferiche di SBA-15 del diametro di alcuni micrometri e pori con diametro fino a 24,5 nm. Il processo è stato modificato aggiungendo un trattamento idrotermale in corrispondenza dell'invecchiamento a 100 °C e adottando per la calcinazione un profilo termico più rapido rispetto a quello raccomandato di 1 °C/min.

Si è ottenuta una silice nella forma di particelle sferiche con dimensione media di circa 3 µm, come visibile dalle immagini ottenute tramite FESEM. Il fisisorbimento di azoto ha prodotto un'isoterma di tipo IV con coppia di isteresi di tipo H5, indicando la presenza di mesopori sia parzialmente ostruiti (a "collo di bottiglia") sia liberi e una porosità disordinata.

Con il metodo BET la superficie specifica risulta essere meno della metà di quella riportata da Wang et al. [15], 342 m²/g invece di 843 m²/g. Anche il volume dei pori ottenuto è più piccolo di quello riportato, 1,27 cm³/g rispetto a 2,03 cm³/g. Questa diminuzione è dovuta probabilmente al processo di calcinazione svolto senza controllo del profilo di temperatura.

La distribuzione della dimensione dei pori del campione è stata ottenuta applicando il metodo BJH sui dati in desorbimento e il metodo DFT ai risultati ricavati utilizzando due strumenti diversi. Le dimensioni stimate dalle distribuzioni ottenute tramite DFT corrispondono a un diametro medio superiore a 12 nm, in ottimo accordo con l'obiettivo di almeno 10 nm.

Lo spettro FT-IR della silice tal quale non presenta picchi che rivelino la presenza di impurezze e il pattern XRD conferma l'ottenimento di una silice amorfa.

Una volta confermato il raggiungimento delle proprietà desiderate, si è ricorso per l'impregnazione all'Incipient Wetness Impregnation, allo scopo di ottimizzare la quantità di acido tranexamico utilizzata e la durata del processo.

L'analisi termogravimetrica ha confermato il raggiungimento del 5% w/w desiderato. Lo spettro FT-IR della polvere post impregnazione mostra la presenza di picchi identificabili con la presenza di TXA. Il metodo BET applicato sui risultati del fisisorbimento di azoto ha evidenziato una variazione minima sia del volume poroso sia della dimensione dei pori. Considerando inoltre l'elevato valore dei diametri dei pori, questi dati sono compatibili con la deposizione del farmaco sulla superficie dei mesopori. Tali risultati indicano, inoltre, che sarà con molta probabilità possibile impregnare il materiale con quantità di farmaco superiori.

Per studiare il rilascio del farmaco sono stati impiegati la dissoluzione della polvere in un becher contenente acqua deionizzata e la cella di Franz con acqua deionizzata sia come soluzione ricevente sia come solvente nella soluzione donatrice. Per simulare condizioni quanto più simili a quelle reali i processi si sono svolti a 35°C e sotto costante agitazione mediante un agitatore magnetico.

Le informazioni ottenute mediante i test di rilascio confermano anch'esse il successo dell'impregnazione del TXA e la capacità della silice nel rilasciare il farmaco in tempi congrui a quelli indicati dal test CRASH-2 [16]. La somministrazione del farmaco entro un'ora dall'evento incidentale garantisce la massima efficacia nell'incrementare la probabilità di sopravvivenza del paziente; entro tre ore si ottiene comunque un consistente incremento della sopravvivenza.

Il farmaco è stato efficacemente rilasciato direttamente in acqua deionizzata raggiungendo più del 70% del quantitativo presente nella silice in mezz'ora e poco più del 90% in un'ora. Ciò lascia ampio margine per un'applicazione efficace nei casi di primo soccorso.

Lo spettro FT-IR ottenuto analizzando il materiale dopo il secondo test di dissoluzione non presenta picchi relativi all'acido tranexamico, ma una banda relativa ai silanoli interagenti più pronunciata, ciò a testimoniare una probabile idratazione della superficie a seguito del rilascio del farmaco.

Il test di rilascio in cella di Franz è stato impiegato per valutare le quantità rilasciate negli intervalli di tempo tra i campionamenti. In quattro ore poco meno del 9% del farmaco impregnato ha attraversato la membrana di nitrocellulosa, di cui un terzo nella prima mezz'ora. La nitrocellulosa offre quindi un consistente ostacolo al passaggio del farmaco.

Le condizioni di questo rilascio sono diverse rispetto a quelle precedenti, la temperatura rimane la stessa, ma il rapporto tra massa di silice impregnata e volume di acqua aumenta di un ordine di grandezza passando da 30 mg/30 ml a 10 mg/1 ml.

Al termine delle quattro ore è stata analizzata anche la concentrazione di farmaco nella fase donatrice, in essa era presente circa il 94% del quantitativo impregnato. Ciò porta il totale rilasciato durante il test a circa il 100% del farmaco. La polvere raccolta filtrando la fase donatrice è stata analizzata ottenendo uno spettro FT-IR privo di picchi caratteristici del TXA, confermando così il rilascio totale del farmaco.

Confrontando i profili dei rilasci della silice per dissoluzione con quelli ottenuti da altri materiali si osserva che: le particelle di chitosano/alginato in PBS (pH 7,4) [17] hanno un rilascio sensibilmente più rapido, un "burst release", mentre spugne composte da solo alginato e da alginato e acido ialuronico [68] hanno un andamento molto più simile a quello osservato per TXA@MSM. L'idrossiapatite [60] rilascia il farmaco in maniera molto più lenta, non rendendolo adatto ad essere impiegato nelle condizioni previste di primo soccorso. Le differenze riscontrate nei vari risultati dipendono sia dalla natura intrinseca dei materiali sia dalla differente soluzione ricevente; è possibile che in presenza del PBS la silice sia in grado di rilasciare più velocemente di quanto faccia in acqua deionizzata.

Per quanto riguarda il rilascio in cella di Franz in 4 ore la percentuale rilasciata dalle medicazioni a base di chitosano [59] e quella di TXA@MSM sono entrambe vicine al 100% del quantitativo di farmaco impregnato. La membrana di acetato di cellulosa ha una dimensione dei pori di più di due ordini di grandezza maggiore rispetto a quella di nitrocellulosa impiegata per TXA@MSM; ciò è in grado di giustificare il maggior ostacolo, riscontrato dall'acido tranexamico nel raggiungere la camera donatrice, osservato in questo progetto.

Le condizioni osservate nei test di rilascio sono però molto diverse dalle condizioni reali, infatti in una ferita aperta non potremo mai avere un ambiente chiuso; saremo in presenza di un consumo del farmaco e il sangue nelle prime fasi continuerà a fluire in maniera dinamica. La composizione del sangue stesso sarà naturalmente molto diversa e i risultati dei test di rilascio potrebbero essere differenti.

Tenendo conto che il tempo di un'ora, preso come limite di riferimento, è ottenuto studiando casi in cui la somministrazione avviene per via endovenosa [16], possiamo assumere che una somministrazione topica di acido tranexamico, direttamente nella ferita, richieda tempi meno stringenti. Questa elasticità potrebbe in parte compensare eventuali rilasci meno rapidi in condizioni reali.

Si conclude quindi che gli obiettivi della tesi sono stati ampiamente raggiunti con risultati soddisfacenti. Visti anche i dati presenti in letteratura, ci si aspetta che il futuro dispositivo dimostrerà la sua efficienza nel favorire la coagulazione nei test specifici a cui verrà sottoposto.

6. Sviluppi futuri

Per sviluppare il progetto sono proponibili diverse attività sperimentali future.

La silice tal quale e quella post impregnazione andranno sottoposte a test che ne dimostrino la reale efficacia come agenti emostatici. I test in vitro sono molteplici, i principali da utilizzare sono: aPTT (activated Partial Thromboplastin Time), PT (Prothrombin Time), CBT (Capillarity Bleeding Time), TEG (Thromboelastography) e andrà valutata l'adesione delle piastrine alle particelle [6], [8], [19], [69], [70]. Oltre a questi andrebbero effettuati anche test in vivo e valutata la citotossicità e la biocompatibilità delle particelle.

Per garantire l'efficacia andrebbero anche studiate altre tipologie di silice mesoporosa, sia tal quali sia impregnate. Tutto ciò al fine di essere sicuri che le caratteristiche scelte apportino un vantaggio sensibile al dispositivo.

Viste le ridotte variazioni ottenute per quanto riguarda la dimensione dei pori e la superficie delle particelle è estremamente probabile il successo di un'impregnazione con quantitativi di farmaco ancora superiori (in grado di andare incontro alla necessità di somministrare dosaggi maggiori). Andrebbe quindi studiato il risultato di un'impregnazione della silice con il 10% w/w di acido tranexamico.

Il materiale scelto potrebbe essere migliorato arricchendolo di nuove proprietà. Nelle condizioni di primo soccorso è facile che si incorra nella contaminazione della ferita con conseguente rischio della comparsa di infezioni e complicanze. Per questo motivo è logico dotare il materiale di proprietà antibatteriche, ad esempio inserendo nella struttura ioni argento o zinco come proposto rispettivamente da Dai et al. [6] e Hou et al. [70].

Gli ioni zinco (Zn^{2+}) sono in grado di: favorire lo sviluppo e la formazione delle ossa, favorire l'angiogenesi (la formazione di nuovi vasi sanguigni), facilitare il processo di guarigione delle ferite ed esercitare la sopra citata azione antibatterica [71]. Lo zinco può essere facilmente inserito nella struttura silicea aggiungendo nitrato di zinco ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) insieme al TEOS durante il processo di sintesi [70].

Gli ioni argento (Ag^+) sono ampiamente usati come antibatterici e impiegati in bendaggi, cateteri e coating [71]. Gli Ag^+ possono essere inseriti nella silice immergendola prima della calcinazione in una soluzione di nitrato di argento [6].

Come riportato da Dai et al. [6] e Hou et al. [70] un'ulteriore modifica attuabile è l'inserimento di ioni calcio (Ca^{2+}) mediante l'aggiunta di nitrato di calcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) insieme a TEOS durante la sintesi (medesimo processo per Zn^{2+}). Il calcio nella cascata del complemento prende il nome di fattore IV della coagulazione, la sua azione è spiegata nella sezione 1.1. L'aggiunta di calcio è quindi teoricamente in grado di accentuare l'azione emostatica del dispositivo facilitando e/o accelerando alcuni dei processi coinvolti nella coagulazione.

Oltre all'acido tranexamico si potrebbe valutare l'impregnazione con un secondo principio attivo in grado di favorire la guarigione del paziente o di alleviarne le sofferenze. Si potrebbe ad esempio tentare di impiegare un farmaco analgesico quindi un antidolorifico che migliori la condizione del paziente e ne semplifichi il trattamento.

Per ultimo va studiata la formulazione con cui somministrare le particelle di silice al paziente. Il progetto si è inizialmente concentrato sull'idea di polveri o composti granulari per via della loro semplicità di applicazione e per la possibilità di essere conservate stabili a temperatura ambiente senza particolari accorgimenti. Altre opzioni sono ad esempio l'utilizzo di creme e gel oppure di sacchetti e garze che limitino la dispersione e facilitino la rimozione delle polveri [57].

BIBLIOGRAFIA

- [1] O. Chiara *et al.*, “A systematic review on the use of topical hemostats in trauma and emergency surgery,” *BMC Surg.*, vol. 18, no. 1, p. 68, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12893-018-0398-z.
- [2] S. Pourshahrestani, E. Zeimaran, I. Djordjevic, N. A. Kadri, and M. R. Towler, “Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 1255–1268, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.09.008.
- [3] L. Huang, G. L. Liu, A. D. Kaye, and H. Liu, “Advances in Topical Hemostatic Agent Therapies: A Comprehensive Update,” *Adv. Ther.*, vol. 37, no. 10, pp. 4132–4148, Oct. 2020, doi: 10.1007/s12325-020-01467-y.
- [4] J. K. Wright *et al.*, “Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent,” *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care*, vol. 57, no. 2, pp. 224–230, 2004, doi: 10.1097/01.TA.0000105916.30158.06.
- [5] M. A. Schreiber and D. J. Neveleff, “Achieving Hemostasis With Topical Hemostats: Making Clinically and Economically Appropriate Decisions in the Surgical and Trauma Settings,” *AORN J.*, vol. 94, no. 5, pp. S1–S20, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.aorn.2011.09.018.
- [6] C. Dai *et al.*, “Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5364–5375, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.052.
- [7] C. Dai, C. Liu, J. Wei, H. Hong, and Q. Zhao, “Molecular imprinted macroporous chitosan coated mesoporous silica xerogels for hemorrhage control,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 30, pp. 7620–7630, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.049.
- [8] Z. Chen *et al.*, “Blood clot initiation by mesoporous silica nanoparticles: Dependence on pore size or particle size?,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 44, pp. 7146–7154, 2016, doi: 10.1039/c6tb01946c.
- [9] L. J. Juang *et al.*, “Coagulation factor XII contributes to hemostasis when activated by soil in wounds,” *Blood Adv.*, vol. 4, no. 8, pp. 1737–1745, Apr. 2020, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000425.
- [10] F. Farjadian, A. Roointan, S. Mohammadi-Samani, and M. Hosseini, “Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment,” *Chem. Eng. J.*, vol. 359, no. June 2018, pp. 684–705, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.cej.2018.11.156.
- [11] R. Narayan, U. Nayak, A. Raichur, and S. Garg, “Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, p. 118, Aug. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030118.
- [12] Y. Zhou *et al.*, “Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 8, no. 2, pp. 165–177, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.007.
- [13] I. Roberts, “Tranexamic acid in trauma: how should we use it?,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 13, no. S1, pp. S195–S199, Jun. 2015, doi: 10.1111/jth.12878.
- [14] H. Lier, M. Maegle, and A. Shander, “Tranexamic Acid for Acute Hemorrhage,” *Anesth. Analg.*, vol. 129, no. 6, pp. 1574–1584, Dec. 2019, doi: 10.1213/ANE.0000000000004389.

- [15] 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, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.micromeso.2005.11.042.
- [16] F. Oлдashi *et al.*, "Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial," *Lancet*, vol. 376, no. 9734, pp. 23–32, Jul. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60835-5.
- [17] D. Li, P. Li, J. Zang, and J. Liu, "Enhanced Hemostatic Performance of Tranexamic Acid-Loaded Chitosan/Alginate Composite Microparticles," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, pp. 1–9, 2012, doi: 10.1155/2012/981321.
- [18] H. Su, S. Wei, F. Chen, R. Cui, and C. Liu, "Tranexamic acid-loaded starch hemostatic microspheres," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 11, pp. 6245–6253, 2019, doi: 10.1039/C8RA06662K.
- [19] C. Wang *et al.*, "Tannic acid-loaded mesoporous silica for rapid hemostasis and antibacterial activity," *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 12, pp. 3318–3331, 2018, doi: 10.1039/C8BM00837J.
- [20] "Coagulazione - Enciclopedia Treccani," *Enciclopedia Treccani*. <https://www.treccani.it/enciclopedia/coagulazione> (accessed Feb. 05, 2021).
- [21] J. C. Cardenas, C. M. Rein-Smith, and F. C. Church, "Overview of Blood Coagulation and the Pathophysiology of Blood Coagulation Disorders," in *Encyclopedia of Cell Biology*, vol. 1, Elsevier, 2016, pp. 714–722.
- [22] R. L. C. Adams and R. J. Bird, "Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants.," *Nephrology (Carlton)*, vol. 14, no. 5, pp. 462–70, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1440-1797.2009.01128.x.
- [23] C. M. Nelson DL, "Principi di Biochimica di Lehninger," *Lehninger Princ. Biochem.*, vol. 7. ed. ita, pp. XXVI, 1254 p., 2006.
- [24] S. Palta, R. Saroa, and A. Palta, "Overview of the coagulation system," *Indian J. Anaesth.*, vol. 58, no. 5, p. 515, 2014, doi: 10.4103/0019-5049.144643.
- [25] S. P. Grover and N. Mackman, "Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 331–338, Mar. 2019, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.312130.
- [26] M. Hoffman and D. M. Monroe, "Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–11, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.hoc.2006.11.004.
- [27] J. F. Vojacek, "Should We Replace the Terms Intrinsic and Extrinsic Coagulation Pathways With Tissue Factor Pathway?," *Clin. Appl. Thromb.*, vol. 23, no. 8, pp. 922–927, Nov. 2017, doi: 10.1177/1076029616673733.
- [28] G. Lippi, M. Franchini, M. Montagnana, and E. J. Falavero, "Inherited disorders of blood coagulation," *Ann. Med.*, vol. 44, no. 5, pp. 405–418, 2012, doi: 10.3109/07853890.2011.576698.
- [29] R. B. Zotz, N. Zotz, and C. Sucker, "Procoagulant Drugs," in *Perioperative Hemostasis*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, pp. 205–219.
- [30] M. Franchini and P. M. Mannucci, "Adjunct agents for bleeding," *Curr. Opin.*

- Hematol.*, vol. 21, no. 6, pp. 503–508, Nov. 2014, doi: 10.1097/MOH.0000000000000084.
- [31] S. H. James, “Hematology Pharmacology,” *AACN Adv. Crit. Care*, vol. 20, no. 2, pp. 177–192, Apr. 2009, doi: 10.4037/15597768-2009-2009.
- [32] European Medicines Agency, “EMA/600265/2018 - Epoetin alfa Hexal,” 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/epoetin-alfa-hexal-epar-summary-public_en-0.pdf (accessed Jan. 28, 2021).
- [33] Y. An *et al.*, “No Benefit of Hemostatic Drugs on Acute Upper Gastrointestinal Bleeding in Cirrhosis,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2020, pp. 1–11, Jun. 2020, doi: 10.1155/2020/4097170.
- [34] K. L. Ryan, D. S. Cortez, E. J. Dick, and A. E. Pusateri, “Efficacy of FDA-approved hemostatic drugs to improve survival and reduce bleeding in rat models of uncontrolled hemorrhage,” *Resuscitation*, vol. 70, no. 1, pp. 133–144, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.resuscitation.2005.11.008.
- [35] National Center for Biotechnology Information, “PubChem Compound Summary for CID 16142534, Fibrinogen gamma-chain(397-411),” *National Center for Biotechnology Information*, 2021. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fibrinogen-gamma-chain_397-411 (accessed Jan. 28, 2021).
- [36] National Center for Biotechnology Information, “PubChem Compound Summary for CID 17506, Etamsylate,” 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etamsylate>. (accessed Jan. 28, 2021).
- [37] R. P. Garay, C. Chiavaroli, and P. Hannaert, “Therapeutic Efficacy and Mechanism of Action of Ethamsylate, a Long-Standing Hemostatic Agent,” *Am. J. Ther.*, vol. 13, no. 3, pp. 236–247, May 2006, doi: 10.1097/01.mjt.0000158336.62740.54.
- [38] M. J. Madurska, K. A. Sachse, J. O. Jansen, T. E. Rasmussen, and J. J. Morrison, “Fibrinolysis in trauma: a review,” *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.*, vol. 44, no. 1, pp. 35–44, Feb. 2018, doi: 10.1007/s00068-017-0833-3.
- [39] S. J. Kim, J.-Y. Park, T. Shibata, R. Fujiwara, and H. Y. Kang, “Efficacy and possible mechanisms of topical tranexamic acid in melasma,” *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 41, no. 5, pp. 480–485, Jul. 2016, doi: 10.1111/ced.12835.
- [40] P. M. Mannucci and M. Levi, “Prevention and Treatment of Major Blood Loss,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 356, no. 22, pp. 2301–2311, May 2007, doi: 10.1056/NEJMra067742.
- [41] European medicines Agency, “Antifibrinolytic medicines - Article-31 referral - Annex III (tranexamic acid),” 2013. https://www.ema.europa.eu/documents/referral/antifibrinolytic-medicines-article-31-referral-annex-iii-tranexamic-acid_en.pdf (accessed Jan. 30, 2021).
- [42] T. Kheirbek *et al.*, “Unjustified Administration in Liberal Use of Tranexamic Acid in Trauma Resuscitation,” *J. Surg. Res.*, vol. 258, pp. 125–131, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jss.2020.08.045.
- [43] C. Guerriero, J. Cairns, P. Perel, H. Shakur, and I. Roberts, “Cost-Effectiveness Analysis of Administering Tranexamic Acid to Bleeding Trauma Patients Using Evidence from the CRASH-2 Trial,” *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e18987, May 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018987.

- [44] National Center for Biotechnology Information, “PubChem Compound Summary for CID 5526, Tranexamic acid,” 2021.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tranexamic-acid> (accessed Jan. 30, 2021).
- [45] M. A. Downing and P. K. Jain, “Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, properties, and biomedical applications,” in *Nanoparticles for Biomedical Applications*, Elsevier, 2020, pp. 267–281.
- [46] Y. Piao, A. Burns, J. Kim, U. Wiesner, and T. Hyeon, “Designed Fabrication of Silica-Based Nanostructured Particle Systems for Nanomedicine Applications,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 18, no. 23, pp. 3745–3758, Dec. 2008, doi: 10.1002/adfm.200800731.
- [47] B. Singh *et al.*, “Functional Mesoporous Silica Nanomaterials for Catalysis and Environmental Applications,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 93, no. 12, pp. 1459–1496, Dec. 2020, doi: 10.1246/bcsj.20200136.
- [48] J. S. Beck *et al.*, “A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 27, pp. 10834–10843, Dec. 1992, doi: 10.1021/ja00053a020.
- [49] J. G. Croissant, Y. Fatieiev, A. Almalik, and N. M. Khashab, “Mesoporous Silica and Organosilica Nanoparticles: Physical Chemistry, Biosafety, Delivery Strategies, and Biomedical Applications,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 4, p. 1700831, Feb. 2018, doi: 10.1002/adhm.201700831.
- [50] S. Savic, K. Vojisavljevic, M. Počuča-Nešić, K. Zivojevic, M. Mladenovic, and N. Knezevic, “Hard Template Synthesis of Nanomaterials Based on Mesoporous Silica,” *Metall. Mater. Eng.*, vol. 24, no. 4, Dec. 2018, doi: 10.30544/400.
- [51] T. Liu *et al.*, “Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 6, pp. 1657–1668, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.035.
- [52] C. Fu, T. Liu, L. Li, H. Liu, D. Chen, and F. Tang, “The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 10, pp. 2565–75, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.043.
- [53] E. Phillips *et al.*, “Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, no. 260, pp. 260ra149-260ra149, Oct. 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3009524.
- [54] M. Benezra *et al.*, “Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 7, pp. 2768–2780, Jul. 2011, doi: 10.1172/JCI45600.
- [55] K. Bukara *et al.*, “Ordered mesoporous silica to enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs: Proof of concept in man,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 108, no. September, pp. 220–225, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.08.020.
- [56] J. Margolis, “The effect of colloidal silica on blood coagulation,” *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, vol. 39, no. 3, pp. 249–258, Jun. 1961, doi: 10.1038/icb.1961.25.
- [57] H. Hong *et al.*, “Novel porous silica granules for instant hemostasis,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 82, pp. 78930–78935, 2016, doi: 10.1039/C6RA13999J.
- [58] 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. July, p. 101906, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101906.
- [59] F. Saporito *et al.*, “Freeze dried chitosan acetate dressings with glycosaminoglycans and tranexamic acid,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 184, no. August 2017, pp. 408–417, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.066.
- [60] S. Sarda, F. Errassifi, O. Marsan, A. Geffre, C. Trumel, and C. Drouet, “Adsorption of tranexamic acid on hydroxyapatite: Toward the development of biomaterials with local hemostatic activity,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 66, pp. 1–7, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.04.032.
- [61] C. H. Salamanca, A. Barrera-Ocampo, J. C. Lasso, N. Camacho, and C. J. Yarce, “Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–10, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030148.
- [62] T. M. Ansari, A. Raza, and A. Rehman, “Spectrophotometric Determination of Tranexamic Acid in Pharmaceutical Bulk and Dosage Forms,” *Anal. Sci.*, vol. 21, no. 9, pp. 1133–1135, 2005, doi: 10.2116/analsci.21.1133.
- [63] 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.
- [64] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts*, 3rd ed. JOHN WILEY & SONS, LTD, 2001.
- [65] W. D. J. Callister and D. G. Rethwisch, *Fundamentals of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach, 5th Edition*, 5th ed. Wiley, 2018.
- [66] National Center for Biotechnology Information, “PubChem Compound Summary for CID 10236, Ninhydrin,” 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ninhydrin>. (accessed Feb. 09, 2021).
- [67] “ImageJ.” <https://imagej.net/> (accessed Mar. 13, 2021).
- [68] O. Catanzano, V. D’Esposito, P. Formisano, J. S. Boateng, and F. Quaglia, “Composite Alginate-Hyaluronan Sponges for the Delivery of Tranexamic Acid in Postextractive Alveolar Wounds,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 107, no. 2, pp. 654–661, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.xphs.2017.09.026.
- [69] Z. Chen *et al.*, “A rapid hemostatic sponge based on large, mesoporous silica nanoparticles and N -alkylated chitosan,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 43, pp. 20234–20245, 2018, doi: 10.1039/C8NR07865C.
- [70] Y. Hou *et al.*, “Influences of mesoporous zinc-calcium silicate on water absorption, degradability, antibacterial efficacy, hemostatic performances and cell viability to microporous starch based hemostat,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 340–349, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.094.
- [71] S. Sánchez-Salcedo, S. Shruti, A. J. Salinas, G. Malavasi, L. Menabue, and M. Vallet-Regí, “In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO₂-CaO-P₂O₅ meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 30, pp. 4836–4847, 2014, doi: 10.1039/C4TB00403E.